Московский государственный университет

им. М.В. Ломоносова

Химический факультет

Кафедра аналитической химии

С.В. Мугинова

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К КУРСУ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

для студентов I-го курса

факультета фундаментальной медицины МГУ

Ответственный редактор

профессор Т.Н. Шеховцова

Москва-2007 г.

Настоящее методическое пособие составлено в соответствии с программой дисциплины "Аналитическая химия для студентов медицинских факультетов университетов" и календарным планом учебных занятий по аналитической химии студентов I-го курса факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова и является вторым дополненным, переработанным изданием.

Методическое пособие представлено пятью разделами. *Раздел I* включает программу курса и календарный план. *Раздел II* является руководством к практикуму по аналитической химии и содержит описание работ по химическим (титриметрическим), некоторым инструментальным (атомная спектроскопия, спектрофотометрия, люминесценция, потенциометрия) и гибридным (хроматография) методам анализа. Этот раздел подготовлен на основе учебного пособия "Основы аналитической химии. Практическое руководство" под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высш. шк., 2001. Кроме того, в *Раздел II* включены новые практические задачи по определению аскорбиновой кислоты методами кислотно-основного и окислительно-восстановительного титрования, комплексонометрическому определению Mn(II), флуориметрическому определению рибофлавина. В конце описания практических задач по различным темам приведены теоретические вопросы, которые позволят студенту лучше подготовиться к выполнению и сдаче теории практической работы. *Раздел III* представлен типовыми вариантами рубежных контрольных работ, а также домашними заданиями с методическими рекомендациями по их выполнению. *Раздел IV* включает шкалу рейтинговой оценки знаний студентов по позициям, предусмотренным календарным планом. *Раздел V* содержит перечень правил техники безопасности студентов в химической лаборатории при выполнении практических работ.

Автор выражает глубокую признательность ответственному редактору профессору Т.Н. Шеховцовой за ценные советы и замечания, профессору В.М. Иванову, доцентам Ю.А. Барбалату и А.В. Иванову, ассистенту Е.М. Рехарской за сотрудничество при разработке и внедрении новых практических задач.

Все замечания и пожелания студентов и преподавателей будут приняты автором с глубокой благодарностью.

Медик без довольного познания химии
совершенен быть не может (М.В. Ломоносов)

Введение

Программа курса аналитической химии для студентов факультета фундаментальной медицины ставит целью изучение теоретических основ химических (титриметрических), инструментальных (спектроскопических и электрохимических) методов анализа и методов разделения и концентрирования (хроматографических), а также ознакомление с возможностями их практического применения. Календарный план этого курса включает *лекции, семинары, рубежные контрольные работы, практические занятия, домашние задания*.

При подготовке к контрольным и домашним работам, а также к сдаче теории практической задачи рекомендуется руководствоваться вопросами, приведенными в конце каждой главы *Раздела III* и в *Разделе IV*. Необходимым требованием для ответа на вопросы является умение четко, лаконично изложить теоретические знания; написать соответствующие формулы, уравнения реакций; провести расчеты с использованием физико-химических справочных величин.

При оценке работы студента в практикуме большое внимание будет уделено не только результатам экспериментальных работ, но и технике их выполнения с учетом особенностей отдельных методов анализа. Например, при выполнении практических работ по титриметрическим методам анализа следует освоить технику взвешивания, научиться правильно пользоваться химической посудой (бюреткой, пипеткой, мерной колбой), знать особенности приготовления первичных и вторичных стандарных растворов, а также операции при титровании. При выполнении экспериментальных работ в практикумах по инстументальным методам анализа необходимо иметь представление об основных узлах используемых приборов и принципе их работы, независимо от того, выполняет студент задачу самостоятельно или в присутствии инженера.

Кроме того, будет оцениваться качество оформления практических работ. Методические рекомендации по оформлению каждой практической задачи приведены в *Разделе II* в конце каждой работы.

Ниже приведен список учебников и учебных пособий, рекомендуемых для самостоятельного изучения. Далее в *Разделах II* и *III* будет дана более детальная информация о литературе по каждой теме. Во избежание повторения при этом литературных источников для них вводится цифровое обозначение.

Литература

[1]. Лекции.

[2]. Основы аналитической химии. В двух книгах. / Под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высш. шк., 2004. 361, 503 с.

[3]. Основы аналитической химии. Практическое руководство. / Под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высш. шк., 2001. 463 с.

[4]. Основы аналитической химии. Задачи и упражнения. / Под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высш. шк., 2004. 412 с.

[5]. Васильев В.П. Аналитическая химия. В двух книгах. М.: Дрофа, Кн. 1. 2004. 368 с.; Кн. 2. 2005. 383 с.

[6]. Дорохова Е.Н., Прохорова Г.В. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. М.: Высш. шк., 1991. 255 с.

[7]. Дорохова Е.Н., Прохорова Г.В. Задачи и упражнения по аналитической химии. М.: Мир, 2001. 267 с.

[8]. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1989. 446 с.

Раздел I

Программа курса и календарный план

Введение. Предмет аналитической химии, ее структура. Место аналитической химии в системе наук, связь с практикой. Значение аналитической химии в развитии медицины.

Метрологические основы химического анализа. Аналитический сигнал. Контрольный опыт. Способы определения концентрации веществ. Метод и методика. Классификация погрешностей анализа: абсолютная, относительная, систематическая и случайная. Признаки систематических погрешностей и способы их выявления. Закон нормального распределения случайных погрешностей. Правильность и воспроизводимость. Проверка правильности анализа. Стандартные образцы. Статистическая обработка

результатов анализа. Сравнение результатов двух методов по статистическим критериям.

Графическое представление данных анализа. Характеристики чувствительности методов анализа: коэффициент чувствительности, предел обнаружения, нижняя и верхняя границы определяемых содержаний. Селективность метода.

Химические методы анализа. Титриметрические методы. Классификация. Требования, предъявляемые к реакциям в титриметрическом анализе. Способы титрования: прямое, обратное, косвенное, заместительное. Кривые титрования. Скачок титрования, точка эквивалентности и конечная точка титрования. Способы фиксирования конечной точки титрования. Первичные стандартные растворы и требования к ним. Фиксаналы. Вторичные стандартные растворы. Источники погрешностей в титриметрии.

Кислотно-основное равновесие и титрование. Протолитическая теория кислот и оснований Бренстеда-Лоури. Равновесие в системе кислота - сопряженное основание - растворитель. Константы кислотности и основности. Влияние природы растворителя на силу кислот и оснований.

Первичные и вторичные стандартные растворы в кислотно-основном титровании. Построение и анализ кривых титрования одно- и многоосновных кислот и оснований. Влияние различных факторов на величину скачка титрования. Кислотно-основные индикаторы. Индикаторные погрешности и их оценка. Примеры практического применения метода кислотно-основного титрования.

Реакции комплексообразования и комплексонометрическое титрование. Понятие о комплексном соединении. Основные характеристики комплексообразователя и лигандов (координационное число и дентатность). Типы и свойства комплексных соединений, используемых в аналитической химии. Ступенчатое комплексообразование. Термодинамическая и кинетическая устойчивость комплексов. Константы устойчивости. Использование комплексных соединений в химическом анализе.

Органические реагенты. Понятие о функционально-аналитической группе. Основные типы соединений, образуемых с участием органических реагентов. Хелаты и внутрикомплексные соединения.

Использование аминополикарбоновых кислот (комплексонов) в титриметрическом анализе. Металлохромные индикаторы, требования к ним. Кривые комплексонометрического титрования. Факторы, влияющие на скачок. Практическое применение комплексонометрического титрования для определения кальция и магния, меди и цинка, железа и алюминия, марганца в растворах чистых солей и при совместном присутствии.

Окислительно-восстановительное равновесие и титрование. Электродный потенциал. Уравнение Нернста. Стандартный и формальный (реальный) окислительно-восстановительные потенциалы. Факторы, влияющие на величину окислительно-восстановительного потенциала: концентрации окисленной и восстановленной форм, ионная сила, температура, pH раствора, процессы комплексообразования и осаждения. Направление и константа равновесия окислительно-восстановительных реакций.

Кривые окислительно-восстановительного титрования. Факторы, влияющие на величину скачка титрования. Обнаружение конечной точки титрования.

Методы окислительно-восстановительного титрования: йодометрия, перманганатометрия, дихроматометрия, аскорбинометрия, ферриметрия. Первичные и вторичные стандартные растворы, фиксирование конечной точки титрования в указанных методах. Применение окислительно-восстановительного титрования для определения меди(II), железа(II, III), органических окислителей и восстановителей.

Использование титриметрических методов анализа в медицинских исследованиях.

Инструментальные методы анализа. Спектроскопические методы. Взаимодействие вещества с электромагнитным излучением. Спектры атомов и молекул, их происхождение и использование в аналитической химии. Важнейшие характеристики спектральных линий (положение в спектре, интенсивность, ширина). Спектры испускания (эмиссионные) и поглощения (абсорбционные).

Атомно-эмиссионный и атомно-абсорбционный методы. Сущность методов. Источники атомизации и возбуждения, их характеристики. Физические процессы в источниках атомизации и возбуждения. Возможности, преимущества и недостатки методов атомной спектроскопии.

Практическое использование методов в анализе медицинских и биологических объектов.

Спектрофотометрический метод. Сущность метода. Основной закон светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера. Причины отклонения от основного закона светопоглощения. Фотометрические реакции, требования к ним и выбор оптимальных условий их проведения. Применение спектрофотометрического метода для определения элементов и органических соединений.

Люминесцентные методы. Классификация видов люминесценции по источникам возбуждения, механизму и длительности свечения. Схема Яблонского. Флуоресценция и фосфоресценция. Закон Стокса-Ломмеля. Правило зеркальной симметрии Левшина. Факторы, влияющие на интенсивность люминесценции. Тушение люминесценции. Спектральные и физико-химические помехи. Метрологические характеристики и аналитические возможности метода. Идентификация и определение витаминов люминесцентным методом.

Метрологические характеристики оптических методов анализа, их сравнительный анализ.

Электрохимические методы. Общая характеристика и классификация методов. Электрохимическая ячейка. Индикаторные электроды и электроды сравнения. Равновесные и неравновесные электрохимические системы. Обратимые и необратимые электрохимические реакции. Факторы, влияющие на обратимость электродного процесса.

Прямая потенциометрия. Сущность метода. Измерение потенциала. Ионометрия. Типы ионоселективных электродов, их характеристики: электродная функция, коэффициент селективности, время отклика. Практическое применение ионометрии: определение pH, фторид-, нитрат-ионов, ионов натрия и калия в различных объектах.

Потенциометрическое титрование. Способы нахождения конечной точки титрования. Индикаторные электроды в кислотно-основном, окислительно-восстановительном, комплексонометрическом и осадительном титровании.

Применение электрохимических методов в анализе биологических объектов.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ЗАНЯТИЙ

ЛЕКЦИИ	СЕМИНАРЫ
1. Предмет аналитической химии, её цели и задачи, значение в развитии медицины. Кислотно-основное равновесие и титрование.	***1.*** Кислотно-основное равновесие. Расчет pH. Способы выражения концентраций в титриметрии. ***Самостоятельная работа 1.***
2. Равновесие в растворах комплексных соединений. Органические реагенты, их использование в химическом анализе.	***2.*** Построение кривых кислотно-основного титрования. Индикаторные погрешности. ***Самостоятельная работа 2.***
3. Комплексонометрическое титрование.	***3.*** Метрологические основы химического анализа.
4. Окислительно-восстановительное равновесие.	***Контрольная работа №1*** по расчету pH, равновесию в растворах комплексных соединений, методам кислотно-основного и комплексонометрического титрования.
5. Окислительно-восстановительное титрование.	***4.*** Расчет стандартных и формальных потенциалов. Расчет констант равновесия окислительно-восстановительных реакций.
6. Спектроскопические методы анализа. ***Самостоятельная работа 4.***	***Контрольная работа №2*** по расчету стандартных, формальных потенциалов, констант окислительно-восстановительного равновесия, методам окислительно-восстановительного титрования.
7. Электрохимические методы анализа. ***Самостоятельная работа 5.***	**ЗАЧЁТ**

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ
Занятие 1. Беседа по технике эксперимента. Кислотно-основное титрование. Приготовление первичного стандартного раствора $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ (из фиксанала) и вторичного стандартного раствора NaOH. Стандартизация раствора NaOH.
Занятие 2. Определение аскорбиновой кислоты методом кислотно-основного титрования. **Дом. задание №1.** *Построение кривой кислотно-основного титрования аскорбиновой кислоты. Выбор индикатора, оценка типа и знака индикаторной погрешности.*
Занятие 3. Определение формальдегида, солей аммония методом кислотно–основного титрования. ***Самостоятельная работа 3.***
Занятие 4. Комплексонометрическое определение Cu(II), Mn(II), CaO и MgO при совместном присутствии (работа по выбору).
Занятие 5. Определение аскорбиновой кислоты методом окислительно-восстановительного титрования. **Дом. задание №2.** *Метрологическая обработка результатов кислотно-основного или окислительно-восстановительного титрования аскорбиновой кислоты.*
Занятия 6-8. ***Работа 1.*** Спектрофотометрическое определение Fe(III) с сульфосалициловой кислотой, Mn(II) с формальдоксимом, Cr(VI) с дифенилкарбазидом. ***Работа 2.*** Определение Na и K методом фотометрии пламени. ***Работа 3.*** Определение Cu методом атомно-абсорбционной спектрометрии. ***Работа 4.*** Определение рибофлавина флуоресцентным методом. ***Работа 5.*** Потенциометрическое определение Co(II), HCl. ***Работа 6.*** Определение фторид- или нитрат- ионов методом ионометрии. ***Работа 7.*** Разделение и идентификация аминокислот методом бумажной и тонкослойной хроматографии.

Хроматографические методы. Определение хроматографии. Понятие о подвижной и неподвижной фазах. Классификация методов по агрегатному состоянию фаз, по

механизму разделения, по технике выполнения. Хроматограммы и способы их получения (фронтальный, вытеснительный, элюентный). Характеристики хроматограмм. Селективность и эффективность хроматографического разделения. Теория теоретических тарелок. Кинетическая теория. Качественный и количественный хроматографический анализ.

Принципы жидкостной и газовой хроматографии. Требования к подвижным и неподвижным фазам. Планарная хроматография. Общие принципы разделения. Техника выполнения бумажной и тонкослойной хроматографии. Способы получения плоскостных хроматограмм (восходящей, нисходящей, круговой, двумерной).

Применение хроматографии для разделения и определения неорганических и органических веществ при анализе медицинских и биологических объектов.

Раздел II

Практикум по аналитической химии

Глава 1. Титриметрические методы

1.1. Введение

Титриметрический анализ основан на точном измерении объема реагента с точно известной концентрацией (*титранта*), израсходованного на реакцию с определяемым (*титруемым*) веществом. Процесс прибавления небольшими порциями раствора титранта к анализируемому раствору до момента завершения химической реакции между ними называют *титрованием*. Момент титрования, когда количество добавленного титранта химически эквивалентно количеству титруемого вещества, называется *точкой эквивалентности*. Экспериментально момент эквивалентности установить в общем случае невозможно, может быть зафиксирован лишь момент завершения химической реакции — *конечная точка*

титрования. Конечную точку титрования устанавливают визуально или инструментально, с индикатором или без него (например, по собственной окраске титранта).

В зависимости от типа используемой реакции различают несколько методов титриметрического анализа: кислотно-основное, окислительно-восстановительное, комплексонометрическое, осадительное титрование. Во всех методах титриметрического анализа используют два типа рабочих растворов:

а) *первичные стандартные растворы* готовят растворением точной навески вещества (первичного стандарта) в определенном объеме растворителя (в мерной посуде); концентрацию таких растворов рассчитывают по результатам взвешивания.

б) *вторичные стандартные растворы* готовят в больших бутылях, примерно требуемой концентрации. Точную концентрацию таких растворов устанавливают путем их *стандартизации* (методом титрования) по первичным стандартным растворам с относительной погрешностью, обычно не превышающей $\pm$ 0,1%.

Объемы растворов измеряют с помощью пипетки, бюретки и мерных колб. При заполнении пипетки или бюретки ее необходимо предварительно несколько раз ополоснуть этим же раствором. *Внимание! Процесс титрования следует повторять* ***не менее трех раз*** *при расхождении в результатах, не превышающем* $\pm$ ***0,10 мл****.*

Расчет результатов титриметрического анализа основан на *законе эквивалентов*, в соответствии с которым вещества реагируют между собой в эквивалентных количествах ($n_1=n_2$), тогда для двух стехиометрически реагирующих веществ справедливо соотношение:

$$c_1V_1=c_2V_2,$$

где c_1 и c_2 — молярные концентрации эквивалентов определяемого вещества и титранта, а V_1 и V_2 — объемы анализируемого раствора и раствора титранта, мл, соответственно.

Эквивалент — условная или реальная частица, которая может присоединять, высвобождать, замещать один ион водорода в кислотно-основных реакциях или быть эквивалентна одному электрону в окислительно-восстановительных реакциях*. Фактор эквивалентности* (f) — число, показывающее, какая

доля реальной частицы вещества эквивалентна одному иону водорода или одному электрону в кислотно-основных и окислительно-восстановительных реакциях соответственно. Фактор эквивалентности и эквивалент данного вещества не являются постоянными величинами, а зависят от стехиометрии реакции, в которой они принимают участие. *Молярная масса эквивалента (Э)* — масса одного моля эквивалента вещества, равная произведению фактора эквивалентности на молярную массу вещества.

Единицей количества вещества эквивалента является *моль*. *Молярная концентрация эквивалента* — отношение числа молей эквивалентов растворенного вещества к объему раствора. Например, с(1/2 H_2SO_4) = 0,1000 М или 0,1000 М (1/2 H_2SO_4); с(1/5 $KMnO_4$) = 0,0500 М или 0,0500 М (1/5 $KMnO_4$).

Различают несколько методов титрования. При *прямом титровании* определяемое вещество непосредственно реагирует с титрантом. Для проведения анализа этим методом достаточно одного титрованного раствора. Содержание определяемого вещества рассчитывают по формуле:

$$m_A, г = \frac{c_T \cdot \overline{V}_T \cdot Э_A \cdot V_к}{V_a \cdot 1000},$$

где $c_т$ — молярная концентрация титранта, М; $V_т$ — среднее арифметрическое результатов параллельных титрований, мл; $V_к$ — объем колбы, мл; V_a — объем аликвоты, мл; $Э_A$ — молярная масса эквивалента определяемого вещества (А), г/моль.

В методах *обратного титрования* (или методах титрования по остатку) к точно измеренному объему (*аликвоте*) определяемого вещества добавляют заведомый избыток титранта $Т_1$ с концентрацией c_1, проводят реакцию до конца, а затем находят количество непрореагировавшего титранта $Т_1$ титрованием его другим реагентом $Т_2$ с концентрацией c_2. Таким образом, используют два титрованных раствора (основной - $Т_1$ и вспомогательный - $Т_2$).

Расчет проводят следующим образом:

$$m_A, г = \frac{\left(c_{T1} V_1 - c_{T2} \overline{V}_2\right) \cdot Э_A \cdot V_к}{V_a \cdot 1000},$$

так как на титрование определяемого вещества затрачивается количество титранта, равное разности, приведенной в скобках.

Третьим видом титриметрических определений является *заместительное титрование* (косвенное титрование). В этом методе к определяемому веществу добавляют специальный реагент, вступающий с ним в реакцию. Один из продуктов реакции затем оттитровывают раствором точно известной концентрации.

1.2. Кислотно-основное титрование в водных растворах

В основе метода кислотно-основного титрования в водных растворах лежит протолитическая реакция:

$$H_3O^+ + OH^- = H_2O.$$

В процессе кислотно-основного титрования изменяется pH раствора. При помощи этого метода определяют кислоты, основания, некоторые соли, азот, серу в органических соединениях и т.д.

Приготовление первичного стандартного раствора 0,1000 М (1/2 Na_2CO_3)

Рассчитывают навеску Na_2CO_3 (с точностью до 0,0001 г), необходимую для приготовления 250,0 мл 0,1000 М раствора. В весовом стаканчике на технических весах отбирают близкое к рассчитанному (с точностью до 0,01 г) количество Na_2CO_3, уточняют массу стаканчика с содой на аналитических весах. В горлышко мерной колбы емкостью 250,0 мл вставляют *сухую чистую* воронку, переносят содержимое стаканчика в колбу, взвешивают стаканчик с остатками соды. Рассчитывают навеску Na_2CO_3 по разности масс. Воронку многократно промывают водой, растворяют соду в небольшом количестве воды (~ 70 мл), разбавляют раствор до метки дистиллированной водой, закрывают пробкой и тщательно перемешивают (~ 15-20 раз).

Приготовление первичного стандартного раствора 0,1000 М (1/2 $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$) из фиксанала

Тщательно вымытую и ополоснутую дистиллированной водой мерную колбу емкостью 1 л заполняют примерно на 1/3

объема дистиллированной водой и вставляют в нее *сухую чистую воронку*. В ампуле с фиксаналом на ее боковой поверхности с помощью стеклянного бойка пробивают отверстие, удерживая ампулу над воронкой. Далее в воронку помещают боек длинным концом вверх и ударяют ампулу ее тонким вогнутым концом о боек. Содержимое ампулы переносят в мерную колбу, многократно промывают ампулу водой из промывалки, после чего ампулу выбрасывают, вынимают боек и воронку, ополоснув их предварительно водой несколько раз. Раствор в колбе разбавляют до метки, закрывают пробкой, тщательно перемешивают. На колбу приклеивают этикетку.

Аналогичным образом готовят из фиксанала ***стандартный 0,1000 М раствор HCl*** (для выполнения *работы 5)* с той лишь разницей, что содержимое ампулы во избежание потерь HCl вследствие ее летучести переносят в колбу по возможности быстро.

Приготовление вторичных стандартных растворов *HCl и NaOH*

0,1 М HCl. В бутыль, содержащую 2 л дистиллированной воды, вносят с помощью мерного цилиндра рассчитанное количество концентрированной HCl с пл. 1,17, тщательно перемешивают, закрывают бутыль сифоном и приклеивают этикетку.

0,1 М NaOH. В бутыль, содержащую 2 л дистиллированной воды, вносят с помощью мерного цилиндра рассчитанное количество 1 М раствора NaOH (приготовленного с добавлением $BaCl_2$), предварительно отлив из бутыли соответствующее количество миллилитров воды. Раствор тщательно перемешивают, закрывают бутыль сифоном с трубкой, заполненной натронной известью, приклеивают этикетку.

Работа 1

Стандартизация раствора соляной кислоты по карбонату натрия

$$Na_2CO_3 + 2HCl = H_2CO_3 + 2NaCl$$

Реагенты

Соляная кислота, HCl, 0,1 М раствор.

Карбонат натрия, Na_2CO_3, 0,1000 М (1/2 Na_2CO_3) стандартный раствор.

Индикатор: метиловый оранжевый, 0,1%-ный водный раствор.

Выполнение определения. В бюретку наливают раствор HCl. Отбирают пипеткой 10,00 мл стандартного раствора карбоната натрия, переносят в коническую колбу для титрования емкостью 100 мл, добавляют 1 каплю индикатора, 20 мл дистиллированнной воды (мерным цилиндром) и титруют раствором соляной кислоты до изменения окраски раствора из желтой в оранжевую.

Предварительно готовят *раствор-свидетель*, имеющий окраску, до которой следует титровать исследуемый раствор. Для этого в коническую колбу для титрования емкостью 100 мл вносят мерным цилиндром 40 мл дистиллированной воды, 1 каплю метилового оранжевого и 1-2 капли 0,1 М раствора соляной кислоты до появления светло-оранжевой окраски.

По результатам титрования рассчитывают точную концентрацию соляной кислоты.

Работа 2

Стандартизация раствора гидроксида натрия по щавелевой кислоте

$$H_2C_2O_4 + 2\ NaOH = Na_2C_2O_4 + 2H_2O$$

Реагенты

Гидроксид натрия, NaOH, 0,1 М раствор.

Щавелевая кислота, $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$, 0,1000 М (1/2 $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$).

Индикатор: фенолфталеин, 0,1%-ный раствор в 60%-ном этаноле.

Выполнение определения. В тщательно вымытую и ополоснутую раствором гидроксида натрия бюретку наливают раствор гидроксида натрия и закрывают бюретку трубкой с натронной известью. Отбирают пипеткой 10,00 мл раствора щавелевой кислоты, переносят в коническую колбу для

титрования ёмкостью 100 мл, добавляют 2-3 капли фенолфталеина, 20 мл дистиллированной воды и титруют раствором гидроксида натрия до появления бледно-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с. Титровать нужно по возможности быстро, раствор не следует перемешивать слишком интенсивно во избежание поглощения раствором CO_2 из воздуха.

По результатам титрования рассчитывают точную концентрацию гидроксида натрия.

Работа 3

Стандартизация раствора гидроксида натрия по соляной кислоте

Реагенты

Гидроксид натрия, NaOH, 0,1 М раствор.

Соляная кислота, HCl, 0,1000 М стандартный раствор.

Индикаторы: метиловый оранжевый, 0,1%-ный водный раствор; фенолфталеин, 0,1%-ный раствор в 60%-ном этаноле.

Выполнение определения. а*) Титрование с метиловым оранжевым.* В тщательно вымытую и затем ополоснутую раствором гидроксида натрия бюретку наливают раствор гидроксида натрия и закрывают бюретку трубкой с натронной известью. Ополоснув пипетку стандартным раствором HCl, отбирают пипеткой 10,00 мл этого раствора и переносят в коническую колбу для титрования емкостью 100 мл, добавляют мерным цилиндром 20 мл дистиллированной воды, 1 каплю метилового оранжевого и титруют раствором гидроксида натрия до изменения окраски раствора из красной через оранжевую в чисто-желтую.

б*) Титрование с фенолфталеином.* В колбу для титрования емкостью 100 мл помещают пипеткой 10,00 мл 0,1000 М стандартного раствора HCl, 2-3 капли фенолфталеина и титруют раствором NaOH из бюретки, закрытой трубкой с натронной известью, до появления бледно-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с. Титровать нужно по возможности *быстро*, раствор не следует перемешивать слишком

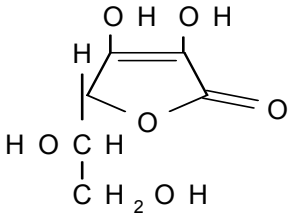
интенсивно во избежание поглощения раствором CO_2 из воздуха.

По результатам титрования рассчитывают точную концентрацию раствора гидроксида натрия.

Внимание! Раствор NaOH точно известной концентрации используют в дальнейшем для определения аскорбиновой кислоты (*работа 4*), формальдегида (*работа 5б*) и солей аммония (*работа 6*). Стандартный раствор HCl используют для определения формальдегида (*работа 5а*).

Работа 4

Определение аскорбиновой кислоты



Аскорбиновая кислота (витамин С, $C_6H_8O_6$) хорошо растворяется в воде (33,3 г в 100 мл воды). Это двухосновная кислота с константами кислотности, равными:

$K_{a,1}$ = 6,8·10^{-5} и $K_{a,2}$ = 2,7·10^{-12}. Отношение $K_{a,1}$: $K_{a,2}$ больше 10^4, но так как $K_{a,2}$ очень мала, практически можно оттитровать только один из двух ионов водорода енольных гидроксильных групп, применяя индикатор, изменяющий окраску в щелочной области pH (pT $\geq$ 8).

Методику можно использовать при определении аскорбиновой кислоты в фармацевтических препаратах.

Реагенты

Аскорбиновая кислота, твёрдый фармацевтический препарат.

Гидроксид натрия, NaOH, 0,1000 М стандартный раствор.

Индикатор фенолфталеин, 0,1%-ный раствор в 60%-ном этаноле.

Выполнение определения. Полученный от преподавателя коммерческий фармацевтический препарат аскорбиновой кислоты (порошок, m $\approx$ 2,5 г) помещают в весовой стаканчик, взвешивают стаканчик с содержимым на

аналитических весах, переносят препарат через чистую сухую воронку в мерную колбу емкостью 100,0 мл. Взвешивают стаканчик с остатками порошка. Рассчитывают навеску фармацевтического препарата по разности масс. Далее растворяют его в воде, как описано выше (*см. приготовление Na_2CO_3*). В колбу для титрования емкостью 100 мл помещают пипеткой 10,00 мл приготовленного раствора, добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия до бледно-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты в растворе по формуле:

$$m_{C_6H_8O_6}, г = \frac{c_{NaOH} \cdot \overline{V}_{NaOH} \cdot Э_{C_6H_8O_6} \cdot V_к}{V_{C_6H_8O_6} \cdot 1000},$$

где $Э_{C_6H_8O_6}$ — молярная масса эквивалента аскорбиновой кислоты, равная 176,13 г/моль.

Содержание аскорбиновой кислоты в фармацевтическом препарате рассчитывают по формуле:

$$w_{C_6H_8O_6}, \% = \frac{m_{C_6H_8O_6}}{m_{навески}} \cdot 100.$$

? Вопросы для самоконтроля

1. Какая реакция лежит в основе метода кислотно-основного титрования? Каковы основные положения протолитической теории Бренстеда-Лоури?
2. Какие требования предъявляют к реакциям, лежащим в основе титриметрического метода анализа?
3. Перечислите несколько (4-5) первичных стандартных веществ для установления концентрации растворов кислоты и щелочи.
4. Назовите вторичные стандартные растворы, применяемые в методе кислотно-основного титрования. Можно ли приготовить их по точным навескам?
5. Что такое химический эквивалент, фактор эквивалентности и молярная масса эквивалента?
6. Что такое точка эквивалентности? В какой области pH (кислой, нейтральной или щелочной) лежит точка

эквивалентности при титровании раствора: *а)* сильной кислоты сильным основанием; *б)* слабой кислоты сильным основанием; в) слабого основания сильной кислотой?

7. Что такое точка нейтральности? Какой смысл вкладывают в понятие "нейтральность" с позиций протолитической теории? Как рассчитать точку нейтральности в растворах воды, жидкого аммиака, этилового спирта?
8. Что такое конечная точка титрования? Какие соединения называют кислотно-основными индикаторами? Приведите примеры кислотно-основных индикаторов.
9. Что называют показателем титрования pT и интервалом перехода окраски индикатора? Как связаны константа кислотности и интервал перехода окраски индикатора?
10. Назовите типы индикаторных ошибок. Какие индикаторные ошибки следует учитывать при титровании с метиловым оранжевым и фенолфталеином в следующих системах: *а)* HCl + NaOH; *б)* CH_3COOH + NaOH; *в)* NH_3 + HCl; *г)* $NaCO_3$ + HCl?

[1], [2]. Кн. 1. Гл. 5. С. 97-114, Гл. 6.1. С. 116-136; Кн. 2. Гл. 9.2. С. 31-61; [3]. Гл. 3.1- 3.3. С. 222-242; [4]. С. 51-63; [5]. Кн. 1. Гл. 4-7. С. 60-165.

Работа 5

Определение формальдегида

Предложено два варианта определения формальдегида после его превращения в сульфопроизводное при взаимодействии с сульфитом натрия (*методика а*) или в оксим при взаимодействии с гидроксиламином (*методика б*). При взаимодействии формальдегида с сульфитом натрия выделяется эквивалентное ему количество OH^--ионов, которые оттитровывают стандартным раствором HCl в присутствии тимолфталеина:

$$H_2CO + Na_2SO_3 + H_2O = H_2C(OH)SO_3Na + NaOH.$$

Второй способ основан на количественном взаимодействии формальдегида с солянокислым

гидроксиламином, при этом на моль формальдегида выделяется моль ионов H^+, которые оттитровывают стандартным раствором NaOH в присутствии метилового оранжевого:

$$H_2CO + H_2NOH \cdot HCl = H_2C{=}NOH + H_2O + HCl.$$

Аналогично можно определять другие альдегиды, а также растворимые в воде кетоны с малой молярной массой.

Реагенты

Соляная кислота, HCl, 0,1000 М стандартный раствор.
Гидроксид натрия, NaOH, 0,1000 М стандартный раствор.
Сульфит натрия, Na_2SO_3, твёрдый реагент.
Гидроксиламин солянокислый, $H_2NOH{\cdot}HCl$, 0,3 М раствор.
Индикаторы: тимолфталеин, 0,1%-ный этанольный раствор; метиловый оранжевый, 0,1%-ный водный раствор.

Выполнение определения. а) *Титрование стандартным раствором HCl.* Анализируемый раствор в мерной колбе емкостью 100,0 мл, содержащий 13-20 мг формальдегида, разбавляют до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Отбирают пипеткой 10,00 мл этого раствора в колбу для титрования емкостью 100-200 мл, мерным цилиндром прибавляют один шпатель сульфита натрия и оставляют на 10 мин. Затем добавляют 3 капли тимолфталеина и титруют раствором HCl до полного обесцвечивания раствора синего цвета от одной капли титранта.

Рассчитывают содержание формальдегида в анализируемом растворе по формуле:

$$m_{CH_2O},\ г = \frac{c_{HCl} \cdot \overline{V}_{HCl} \cdot Э_{CH2O} \cdot V_к}{V_{CH_2O} \cdot 1000},$$

где $Э_{CH2O}$ – молярная масса эквивалента формальдегида, равная 30 г/моль.

б) Титрование стандартным раствором NaOH. Анализируемый раствор в мерной колбе емкостью 100,0 мл, содержащий 13-20 мг формальдегида, разбавляют до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Бюретку

заполняют стандартным раствором NaOH и закрывают ее трубкой с натронной известью. Отбирают пипеткой 10,00 мл анализируемого раствора в колбу для титрования емкостью 100-200 мл, прибавляют мерным цилиндром 10 мл раствора гидроксиламина и оставляют на 10 мин. В полученный раствор вводят 2 капли индикатора и титруют раствором NaOH до изменения окраски раствора из красной через оранжевую в чисто-желтую.

Рассчитывают содержание формальдегида в анализируемом растворе по формуле:

$$m_{CH_2O}, г = \frac{c_{NaOH} \cdot \overline{V}_{NaOH} \cdot Э_{CH2O} \cdot V_к}{V_{CH_2O} \cdot 1000},$$

где $Э_{CH_2O}$ - молярная масса эквивалента формальдегида, равная 30 г/моль.

Рекомендуется провести контрольный опыт, оттитровав 10,00 мл раствора гидроксиламина солянокислого раствором NaOH в присутствии метилового оранжевого. Объем NaOH, израсходованный на проведение контрольного опыта, вычитают из результата титрования анализируемого раствора.

Работа 6

Определение солей аммония формальдегидным методом

Одним из самых точных методов определения солей аммония является формальдегидный. Он основан на реакции:

$$4NH_4Cl + 6HCOH = (CH_2)_6N_4 + 4HCl + 6H_2O$$

Образующуюся в результате реакции соляную кислоту в количестве, эквивалентном содержанию аммонийной соли, титруют раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина.

Поскольку формальдегид часто загрязнен муравьиной кислотой, ее предварительно оттитровывают раствором NaOH также с использованием фенолфталеина в качестве индикатора.

Реагенты

Гидроксид натрия, NaOH, 0,1000 М стандартный раствор.

Формальдегид, CH_2O, 20%-ный раствор.

Индикатор: фенолфталеин, 0,1%-ный раствор в 90%-ном этаноле.

Выполнение определения. В колбу для титрования из бюретки вносят 5,00 мл раствора формальдегида и 4-5 капель фенолфталеина. Из капельницы по каплям добавляют 0,1000 М NaOH до появления бледно-розовой окраски.

К полученному раствору прибавляют аликвоту 10,00 мл анализируемого раствора, оставляют на 1-2 мин и титруют стандартным раствором гидроксида натрия до появления бледно-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Рассчитывают содержание NH_4Cl в анализируемом растворе по формуле:

$$m_{NH_4Cl}, г = \frac{c_{NaOH} \cdot \overline{V}_{NaOH} \cdot Э_{NH_4Cl} \cdot V_к}{V_{NH_4Cl} \cdot 1000}$$

? Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите методы титрования. В каком случае и почему применяют тот или иной метод?
2. Приведите примеры использования методов прямого, обратного, заместительного кислотно-основного титрования.
3. При каких условиях возможно ступенчатое титрование многоосновных кислот и оснований? Сколько скачков на кривых титрования серной, щавелевой, аскорбиновой и фосфорной кислот? Ответ аргументируйте.
4. Каковы предельные значения концентраций сильных и слабых кислот и оснований, а также констант кислотности и основности, при которых на кривой титрования наблюдается четко выраженный скачок титрования? Можно ли оттитровать раствором гидроксида натрия борную кислоту, соли аммония, соли уксусной, муравьиной, щавелевой кислот, угольную кислоту по второй ступени и фосфорную кислоту по третьей ступени?

5. Обоснуйте выбор индикатора в методиках определения формальдегида и солей аммония методом кислотно-основного титрования.

См. работу 4.

1.3. Комплексонометрическое титрование

Метод основан на реакции между ионами металлов и аминополикарбоновыми кислотами (*комплексонами*). В качестве титранта наиболее часто используют этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее двунатриевую соль (ЭДТА):

$$M^{n+} + Y^{m-} = MY^{(m-n)-},$$ где Y^{m-} - анион ЭДТА.

Работа 7

Определение меди(II)

Ионы меди образуют с ЭДТА комплексное соединение голубого цвета с константой устойчивости $6{,}3 \cdot 10^{18}$ (ионная сила 0,1; 20^0C). Условия прямого титрования меди определяются выбранным металлоиндикатором. В присутствии мурексида, образующего комплекс с медью зеленовато-желтого цвета, титрование можно проводить на холоду при pH 6 (условная константа устойчивости равна $1{,}4 \cdot 10^{14}$). 1,00 мл 0,0500 М раствора ЭДТА эквивалентен 3,177 мг меди.

Реагенты

ЭДТА, 0,0500 М стандартный раствор.

Металлоиндикатор: 1-(2-пиридилазо)-2-нафтол (ПАН*)* или мурексид (смесь с NaCl в соотношении 1:100).

Ацетатный буферный раствор, pH 5,0 и 6,0.

Выполнение определения. Анализируемый раствор в мерной колбе емкостью 100,0 мл, содержащий 100-200 мг меди(II), разбавляют до метки водой и хорошо перемешивают.

а) Титрование с ПАН. В коническую колбу для титрования ёмкостью 100 мл отбирают 10,00 мл анализируемого раствора

меди, прибавляют цилиндром 10 мл дистиллированной воды и 5 мл ацетатного буферного раствора с pH=5,0, после чего раствор нагревают почти до кипения. К горячему раствору добавляют 2-3 капли индикатора ПАН и сразу титруют стандартным раствором ЭДТА до перехода окраски раствора из фиолетовой в зелёную.

б*) Титрование с мурексидом.* Отбирают пипеткой 10,00 мл анализируемого раствора меди(II) в колбу для титрования емкостью 100 мл, мерным цилиндром прибавляют 20 мл дистиллированной воды, 5 мл ацетатного буферного раствора с pH=6,0, на кончике шпателя вносят 20-30 мг металлоиндикатора, растворяют его и полученный раствор титруют раствором ЭДТА до изменения окраски в чисто-фиолетовую. Измеряют объем израсходованного на титрование раствора ЭДТА, после чего в колбу для титрования вводят 1-2 мл ацетатного буферного раствора с pH=6,0 (или 1 каплю 2 М раствора NH_3). Если цвет раствора остается фиолетовым, титрование прекращают; если же после добавления буферного раствора (или раствора аммиака) окраска изменилась в желтую или желто-зеленую, продолжают титрование раствором ЭДТА до устойчивой фиолетовой окраски.

Рассчитывают содержание меди(II) в анализируемом растворе по формуле, аналогичной приведенным в предыдущих работах.

Работа 8

Определение марганца(II)

Для титриметрического определения марганца(II) используют преимущественно реакции окисления-восстановления. Марганец(II) окисляют до MnO_4^- и титруют последний восстановителем, чаще всего раствором соли Мора. Несмотря на высокую селективность этой реакции и ее широкое применение для анализа реальных объектов, метод имеет ряд недостатков. Во-первых, он предполагает использование различных реагентов ($(NH_4)_2S_2O_8$, $AgNO_3$, H_2SO_4), в том числе раствора титранта (соль Мора) с ограниченной устойчивостью. Во-вторых, требуется время на окисление Mn(II) в MnO_4^-, на разрушение избытка окислителя (персульфата аммония), на охлаждение раствора. В-третьих, MnO_4^- в слабокислых,

нейтральных и щелочных средах восстанавливается до MnO_2, поэтому его необходимо титровать сразу после получения.

Комплексонометрическое определение Mn(II) лишено указанных выше недостатков, так как его растворы в слабокислой среде устойчивы неограниченное время. Метод основан на образовании устойчивого этилендиамин-тетраацетата марганца(II) MnY^{2-} ($lg\beta$=13,8) (или другого комплексоната марганца(II)) с соотношением компонентов 1 : 1. Комплексонат образуется быстро и на холоду, устойчив неограниченное время.

Разработаны различные приемы повышения селективности комплексонометрического титрования марганца, позволяющие определять его в реальных объектах. Метод можно применять для стандартизации растворов $KMnO_4$. В качестве металлоиндикатора применяют эриохромовый черный Т, титрование проводят при pH≈10. Для предотвращения образования осадка $MnO(OH)_2$ в кислой среде перед добавлением буферного раствора вводят восстановитель – аскорбиновую кислоту.

Оптимальная концентрация ЭДТА – 0,05 М. 1,00 мл 0,0500 М раствора ЭДТА эквивалентен 2,747 мг Mn(II).

Реагенты

ЭДТА, 0,0500 М стандартный раствор.

Металлоиндикатор эриохромовый черный Т (смесь с NaCl в соотношении 1 :100).

Аммиачный буферный раствор, pH 10.

Аскорбиновая кислота, твердый реагент.

Выполненение определения. Раствор, полученный у преподавателя, в мерной колбе емкостью 50,0 мл, содержащий 60-120 мг марганца(II), разбавляют водой до метки и хорошо перемешивают. Отбирают пипеткой 10,00 мл раствора марганца(II) в колбу для титрования емкостью 100 мл, вносят шпателем 30-50 мг аскорбиновой кислоты, колбу взбалтывают до полного растворения аскорбиновой кислоты, добавляют мерным цилиндром 3-5 мл буферного раствора, на кончике шпателя вносят 20-30 мг металлоиндикатора и титруют полученный раствор раствором ЭДТА до изменения окраски раствора из винно-красной в чисто-голубую.

Рассчитывают содержание марганца в анализируемом растворе.

Примечание: 1. Для повышения правильности результатов титрования рекомендуется оттитровать используемый буферный раствор в тех же условиях.
2. Для предотвращения окисления аскорбиновой кислоты ее твердый препарат рекомендуется хранить в темной посуде с притертой крышкой, а после использования тщательно закрывать посуду.

Работа 9

Определение кальция и магния при совместном присутствии

Определение основано на том, что одну порцию раствора титруют в присутствии металлоиндикатора эриохромового черного Т и оттитровывают суммарно кальций и магний; в другой порции раствора сначала осаждают магний в виде гидроксида, а затем в присутствии индикатора мурексида оттитровывают только кальций.

Реагенты

ЭДТА, 0,0500 М стандартный раствор.
Аммиачный буферный раствор с pH 10 (67 г NH_4Cl и 570 мл 25%-ного NH_3 в 1 л раствора).
NaOH, 2 М раствор.
Металлоиндикаторы: эриохромовый черный Т, мурексид (смеси с NaCl в соотношении 1:100).

Выполнение определения. а) *Определение суммы кальция и магния.* В колбу для титрования емкостью 100 мл вносят пипеткой 10,00 мл анализируемого раствора, прибавляют мерным цилиндром 2-3 мл аммиачного буферного раствора, 15 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивают, прибавляют на кончике шпателя 20-30 мг эриохромового черного Т и вновь перемешивают до полного растворения индикатора. Титруют полученный раствор раствором ЭДТА до изменения окраски раствора из винно-красной в голубую.

б) *Определение кальция.* В колбу для титрования емкостью 100 мл отбирают пипеткой 10,00 мл анализируемого раствора, добавляют мерным цилиндром 2-3 мл раствора NaOH (при этом в осадок выделяется гидроксид магния), разбавляют водой до объема ~25 мл, прибавляют на кончике шпателя 20-30 мг мурексида до окрашивания раствора в розовый цвет и титруют раствором ЭДТА до изменения розовой окраски раствора в сине-фиолетовую.

Рассчитывают содержание CaO и MgO в анализируемом растворе по формулам:

$$m_{CaO}, г = \frac{V^{б}_{ЭДТА} \cdot c_{ЭДТА} \cdot Э_{CaO} \cdot V_к}{V_а \cdot 1000},$$

$$m_{MgO}, г = \frac{(\overline{V}^{а}_{ЭДТА} - \overline{V}^{б}_{ЭДТА}) \cdot c_{ЭДТА} \cdot Э_{MgO} \cdot V_к}{V_а \cdot 1000},$$

где $V^{а}_{ЭДТА}$ и $V^{б}_{ЭДТА}$ - объемы раствора ЭДТА, израсходованные на титрование с эриохромовым черным Т и мурексидом соответственно.

? Вопросы для самоконтроля

1. Чем объясняется ограниченность применения неорганических титрантов в комплексометрическом титровании?
2. Изложите сущность метода комплексонометрии.
3. Перечислите основные требования к реакциям, применяемым в методе комплексонометрического титрования.
4. В каких координатах строят кривую комплексонометрического титрования? Какие факторы влияют на величину скачка титрования?
5. Назовите способы обнаружения конечной точки титрования в комплексонометрии. Что такое металлоиндикаторы? Приведите примеры. Каким требованиям они должны удовлетворять?

6. Приведите графическую формулу ЭДТА. Какова дентатность ЭДТА? Опишите равновесия в растворе ЭДТА.
7. Какова стехиометрия комплексов ЭДТА с ионами металлов? Приведите графическую формулу комплексов двух- и трехзарядных ионов металлов с ЭДТА.
8. Объясните сущность прямого, обратного, вытеснительного и косвенного способов комплексонометрического титрования. В каких случаях применяют каждый из них?
9. Как повысить селективность комплексонометрического титрования? Поясните ответ на конкретных примерах.
10. Опишите условия комплексонометрического титрования *а)* марганца(II); *б)* меди(II); *в)* кальция и магния и *г)* меди и цинка при совместном присутствии.

[1]; [2]. Кн. 1. Гл. 6.2. С. 137-174; Кн. 2. Гл. 9.2.5. С. 61-83; [3]. Гл. 3.4. С. 242-252; [4]. С. 64-72; [5]. Кн. 1. Гл. 8-9. С. 166-206.

1.4. Окислительно-восстановительное титрование

В основе метода лежит реакция:

$$Ox_1 + Red_2 \Leftrightarrow Red_1 + Ox_2.$$

В процессе титрования изменяется соотношение концентраций окисленной и восстановленной форм определяемого вещества и титранта и, следовательно, изменяется окислительно-восстановительный потенциал.

Йодометрия

Метод йодометрии используют для определения окислителей. Определение проводят по методу заместительного титрования, используя в качестве заместителя йод, выделяющийся в результате реакции определяемого окислителя с избытком йодида калия; йод затем оттитровывают раствором тиосульфата.

Индикатором служит свежеприготовленный 1%-ный раствор крахмала. При взаимодействии крахмала (преимущественно его амилозной фракции) с йодом протекают

два процесса — комплексообразование и адсорбция, в результате которых образуется соединение синего цвета.

Приготовление первичного стандартного раствора 0,0500 М (1/6 $K_2Cr_2O_7$)

Стандартный раствор дихромата калия готовят в мерной колбе емкостью 200,0 мл по точной навеске, взятой на аналитических весах по разности масс (*см. приготовление раствора соды, работа 1*).

Приготовление вторичного стандартного раствора $Na_2S_2O_3$

Готовят 2 л 0,05 М раствора $Na_2S_2O_3 \cdot 5\ H_2O$ из его 1 М раствора в бутыли, закрытой сифоном с трубкой, заполненной натронной известью, и приклеивают этикетку.

Работа 10

Стандартизация раствора тиосульфата натрия по дихромату калия

Тиосульфат натрия не является стандартным веществом, поскольку его растворы неустойчивы в кислых средах, разлагаются под действием CO_2, а также окисляются кислородом воздуха. Первичными стандартными растворами по отношению к раствору $Na_2S_2O_3$ могут служить растворы различных окислителей, однако, с сильными окислителями (например, с дихроматом калия) тиосульфат натрия реагирует нестехиометрично, вследствие чего применяют заместительное титрование, проводя вначале стехиометрическую реакцию между дихроматом и йодидом:

$$Cr_2O_7^{2-} + 6I^- + 14H^+ = 2Cr^{3+} + 3I_2 + 7H_2O.$$

Йод, выделившийся в эквивалентном дихромату количестве, оттитровывают стандартным раствором тиосульфата:

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} = 2I^- + S_4O_6^{2-}.$$

Реагенты

Дихромат калия, $K_2Cr_2O_7$, 0,0500 М (1/6 $K_2Cr_2O_7$) стандартный раствор.
Серная кислота, H_2SO_4, 1 М раствор.
Иодид калия, KI, 5%-ный раствор.
Крахмал, свежеприготовленный 1%-ный раствор.
Тиосульфат натрия, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 0,05 М раствор.

Выполнение определения. В бюретку наливают раствор тиосульфата натрия и закрывают бюретку трубкой с натронной известью. В колбу для титрования емкостью 200-250 мл вносят мерным цилиндром 10 мл серной кислоты, 10 мл раствора йодида калия (титруемый раствор должен оставаться бесцветным) и пипеткой 10,00 мл раствора дихромата калия. Оставляют стоять 3-5 мин в темном месте, прикрыв колбу часовым стеклом. Затем в колбу добавляют ~100 мл дистиллированной воды и быстро титруют раствором $Na_2S_2O_3$ до бледно-желтой окраски раствора. Добавляют 1-2 мл раствора крахмала и продолжают *медленно* титровать при энергичном перемешивании до исчезновения синей окраски раствора.

По результатам титрования рассчитывают точную концентрацию раствора тиосульфата натрия.

Работа 11

Определение меди(II)

Определение меди основано на реакциях:

$$2Cu^{2+} + 4I^- = 2\,CuI\downarrow + I_2$$
$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} = 2I^- + S_4O_6^{2-}.$$

Реагенты

Тиосульфат натрия, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 0,0500 М стандартный раствор.
Иодид калия, KI, 5%-ный раствор.
Серная кислота, H_2SO_4, 1 М раствор.
Крахмал, свежеприготовленный 1%-ный раствор.

Выполнение определения. В колбу для титрования емкостью 100 мл вносят пипеткой 10,00 мл анализируемого раствора меди, мерным цилиндром добавляют 2 мл раствора серной кислоты, 30 мл раствора йодида калия и титруют раствором тиосульфата натрия из бюретки, закрытой трубкой с натронной известью, до бледно-желтой суспензии. Затем добавляют 1-2 мл крахмала и продолжают *медленно* титровать при перемешивании, до тех пор, пока суспензия не станет белой.

Рассчитывают содержание меди в анализируемом растворе по формуле:

$$m_{Cu}, г = \frac{C_{Na_2S_2O_3} \cdot \overline{V}_{Na_2S_2O_3} \cdot Э_{Cu} \cdot V_к}{V_а \cdot 1000}.$$

Ферриметрия

В методе ферриметрии в качестве титранта используют стандартный раствор соли железа(III). Концентрацию титранта предварительно устанавливают комплексонометрически.

Приготовление первичного стандартного раствора 0,0500 М ЭДТА

Стандартный раствор 0,0500 М ЭДТА готовят из фиксанала или по точной навеске.

Приготовление вторичного стандартного раствора $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$

Для приготовления 0,05 М раствора $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 24,11 г соли растворяют в воде, подкисленной 10 мл концентрированной серной кислоты, в мерной колбе емкостью 1 л.

Работа 12

Стандартизация раствора железа(III) по ЭДТА

В сильнокислой среде при pH<0,9 комплексы железа(III) с ЭДТА образуются в соответствии с уравнением:

$$Fe^{3+} + H_5Y^+ = FeHY^+ + 4H^+.$$

При pH>1,3 преобладает комплекс с константой устойчивости $1{,}26 \cdot 10^{25}$ (ионная сила 0,1; 20^0C). В качестве металлоиндикаторов используют тайрон, салициловую или сульфосалициловую кислоты, гидроксамовые кислоты. Эти индикаторы в растворах бесцветны, но образуют с железом(III) интенсивно окрашенные комплексы: красного цвета с тайроном, фиолетового цвета с салициловой или сульфосалициловой кислотами, сине-фиолетового с гидроксамовыми кислотами.

Реагенты

ЭДТА, 0,0500 М стандартный раствор.

Металлоиндикатор: сульфосалициловая кислота, 25%-ный водный раствор.

Соляная кислота, HCl, 1 М.

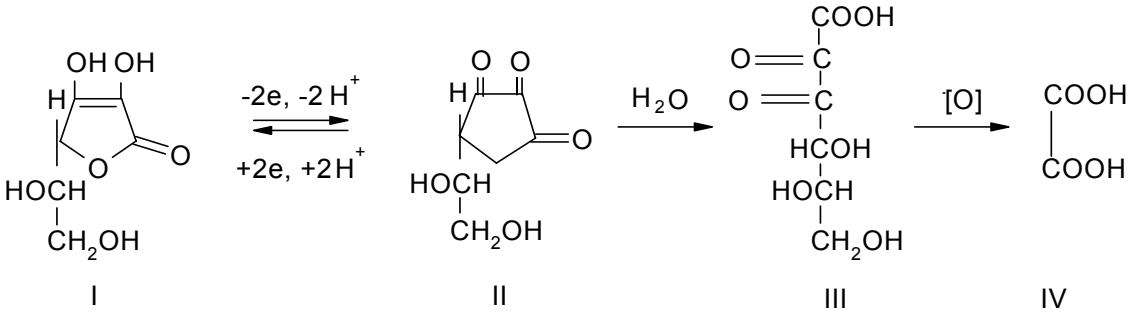
Выполнение определения. В коническую колбу для титрования емкостью 100 мл вносят пипеткой 10,00 мл раствора железа(III), вводят 1 мл HCl, разбавляют дистиллированной водой до 50 мл и нагревают почти до кипения. В горячий раствор добавляют 4-5 капель сульфосалициловой кислоты и титруют раствором ЭДТА до изменения окраски раствора из фиолетовой в чисто-желтую или лимонно-желтую. Вблизи конечной точки титрования титрант прибавляют *медленно* и следят, чтобы раствор во время титрования был горячим.

По результатам титрования рассчитывают точную концентрацию раствора железа(III).

Работа 13

Определение аскорбиновой кислоты

Аскорбиновая кислота устойчива в сухом виде в темноте. В водных растворах, особенно в щелочной среде, она быстро обратимо окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (*II*) (окислительно-восстановительный потенциал +0,058 В) и далее необратимо — до 2,3-дикетогулоновой (*III*), а затем до щавелевой кислоты (*IV*):



I II III IV

Формальный окислительно-восстановительный потенциал системы зависит от pH и составляет:

pH	$E^{0'}$, В
1,05	+ 0,326
7,00	+ 0,185
8,70	- 0,012.

Эквивалент аскорбиновой кислоты меняется в зависимости от силы окислителя. При действии умеренных окислителей (например железа(III), ртути(II), I_2) аскорбиновая кислота окисляется до дегидроаскорбиновой (*схема,* I $\rightarrow$ II) и ее эквивалент равен 1/2 $C_6H_8O_6$. Наиболее часто для определения аскорбиновой кислоты в качестве титранта применяют устойчивые при хранении растворы сульфата или хлорида железа(III) ($E^0_{Fe^{3+}/Fe^{2+}}$ = 0,77 В).

$$2Fe^{3+} + C_6H_8O_6 = 2Fe^{2+} + 2H^+ + C_6H_6O_6.$$

Для обнаружения конечной точки титрования используют индикаторы на железо(III): наиболее часто — тиоцианат калия (*специфический*) или сульфосалициловую кислоту (*металло-индикатор*).

Аскорбиновую кислоту можно применять в качестве титранта для определения окислителей (*метод аскорбинометрии*). К сожалению, аскорбиновая кислота не может быть первичным стандартом, поскольку подвержена действию ферментов и УФ лучей, каталитически ускоряющих ее разложение в водных растворах при длительном хранении. Так, 0,0500 М раствор аскорбиновой кислоты в бидистиллированной воде устойчив около 24 ч; затем его концентрация изменяется на 0,3% за сутки в течение 2 мес. Для приготовления стандартных растворов аскорбиновой кислоты рекомендуется использовать только ее особо чистые твердые препараты и хранить растворы на холоду в склянках из темного стекла. Для стабилизации растворов аскорбиновой кислоты целесообразно добавлять к ним ЭДТА и муравьиную кислоту. Например, раствор аскорбиновой кислоты, содержащий около 0,1 г ЭДТА и 4 г HCOOH в 1 л, довольно устойчив: концентрация уменьшается в течение суток не более, чем на 0,1%.

Реагенты

Аскорбиновая кислота, твёрдый фармацевтический препарат.

Железо(III)аммонийные квасцы, $NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0,0500 М стандартный раствор.

Сульфосалициловая кислота, 25%-ный водный раствор.

Выполнение определения. Точную навеску (~ 0,4 г) полученного от преподавателя коммерческого фармацевтического препарата аскорбиновой кислоты помещают в весовой стаканчик, взвешивают стаканчик с содержимым на аналитических весах, переносят препарат через чистую сухую воронку в мерную колбу емкостью 100,0 мл. Стаканчик с остатками порошка взвешивают и по разности масс рассчитывают навеску фармацевтического препарата. Навеску растворяют в воде, как описано выше (*см. приготовление Na_2CO_3, работа 1*). Полученный раствор аскорбиновой кислоты наливают в бюретку и закрывают её трубкой с натронной известью.

Выданный преподавателем стандартный раствор железа(III) в мерной колбе емкостью 50,0 мл доводят до метки водой, тщательно перемешивают. Точную концентрацию

полученного раствора рассчитывают, исходя из известного объёма стандартного раствора железо(III)аммонийных квасцов.

В коническую колбу для титрования емкостью 100 мл вносят пипеткой 10,00 мл стандартного раствора железа(III), добавляют мерным цилиндром 20 мл дистиллированной воды и нагревают почти до кипения. В горячий раствор вводят 4-5 капель раствора сульфосалициловой кислоты и титруют раствором аскорбиновой кислоты до исчезновения фиолетовой окраски. Вблизи конечной точки титрования раствор аскорбиновой кислоты прибавляют *медленно* и следят, чтобы раствор во время титрования был горячим.

Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты в анализируемом растворе по формуле:

$$m_{C_6H_8O_6},\ г = \frac{c_{Fe(III)} \cdot V_{Fe(III)} \cdot Э_{C_6H_8O_6} \cdot V_к}{\overline{V}_{C_6H_8O_6} \cdot 1000}.$$

Молярная масса эквивалента аскорбиновой кислоты $Э_{C_6H_8O_6}$ = M/2 = 176,13/2 = 88,06 г/моль.

Содержание аскорбиновой кислоты в фармацевтическом препарате рассчитывают по формуле:

$$w_{C_6H_8O_6},\% = \frac{m_{C_6H_8O_6}}{m_{навески}} \cdot 100.$$

? Вопросы для самоконтроля

1. В каких координатах строят кривую окислительно-восстановительного титрования? В каких случаях кривая титрования симметрична, а в каких ассиметрична относительно точки эквивалентности? Приведите примеры.
2. Приведите в общем виде уравнения для расчета потенциала системы при построении кривой окислительно-восстановительного титрования *а)* до точки эквивалентности; *б)* в точке эквивалентности; *в)* после точки эквивалентности.
3. Перечислите факторы, влияющие на величину скачка на кривой титрования. Приведите примеры приемов увеличения скачка титрования.
4. Перечислите первичные и вторичные стандартные растворы в методе окислительно-восстановительного титрования.

Почему при использовании дихромата калия в качестве первичного стандартного раствора концентрацию тиосульфата натрия устанавливают косвенным методом?

5. Перечислите способы фиксирования конечной точки титрования в методах окислительно-восстановительного титрования. Объясните принцип действия окислительно-восстановительных индикаторов. Укажите наиболее распространенные из них.
6. Напишите уравнение для расчета интервала перехода окраски окислительно-восстановительного индикатора.
7. Дайте общую характеристику (основное уравнение реакции, первичные и вторичные стандартные растворы, индикаторы, условия титрования и области применения) методов окислительно-восстановительного титрования: дихромато-метрии; перманганатометрии; йодометрии; аскорбинометрии; ферриметрии.
8. Какие восстановители применяют для предварительного восстановления железа(III)?
9. Назовите компоненты смеси Рейнгарда-Циммермана и объясните их роль в процессе титрования железа(II) методом перманганатометрии.
10. Приведите примеры использования методов окислительно-восстановительного титрования для анализа биологических и медицинских объектов, фармацевтических препаратов.

[1]; [2]. Кн. 1. Гл. 6.3. С. 174-188. Кн. 2. С. 83-97; [3]. Гл. 3.5. С. 252-266; [4]. С. 73-84; [5]. Кн. 1. Гл. 10-11. С. 207-250.

Глава 2. Оптическая атомная спектрометрия

Методы оптической атомной спектрометрии основаны на исследовании и использовании спектров электромагнитного излучения, поглощения или переизлучения атомов, ионов, реже свободных молекул вещества в УФ (λ = 200–400 нм), видимой (λ=400–750 нм) и ближней ИК областях спектра. Спектры, расположенные в указанном диапазоне длин волн, называют *оптическими;* методы анализа, основанные на использовании этих спектров, – оптическими методами. Теоретические основы указанных методов базируются на учении о строении атомов (квантовая механика) и основных законах оптики.

2.1. Общие положения

Спектры индивидуальных атомов можно наблюдать только в газовой фазе при относительно небольших давлениях.

Устройства, в которых вещество переводится в атомарное состояние в газовой фазе, называют *атомизаторами*. Ими мо-

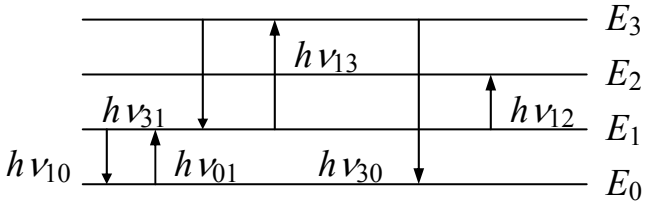


Рис. 2.1. Схема уровней энергий и возможных переходов.

гут быть пламена различного состава, графитовые трубчатые печи, дуговые разряды постоянного и переменного тока, высокочастотная индуктивно связанная аргоновая плазма, высоковольтная искра, лазеры и другие источники высокой температуры.

Основным требованием к атомизаторам является эффективный перевод пробы в газообразное атомарное состояние, в котором атомы находятся на низшем энергетическом уровне. В атомизаторе при высокой температуре происходит плавление, испарение вещества, диссоциация молекул на атомы. В результате соударений с высокотемпературными частицами происходит атомизация и возбуждение. В возбужденном состоянии атомы могут находиться ~ 10^{-9} – 10^{-7} с, затем самопроизвольно (спонтанно) возвращаются в основное или возбужденное состояние с меньшей энергией.

Любая атомная система может быть охарактеризована определенными уровнями энергии и переходами между ними (рис. 2.1). Излучению оптического диапазона соответствуют переходы между уровнями энергии валентных электронов. Схемы переходов между различными состояниями, сопровождающимися испусканием или поглощением квантов электромагнитного излучения, показаны на рис. 2.1. Горизонтальными линиями изображены уровни энергии различных состояний атомов. За нуль принимают уровень с наименьшей из всех известных состояний энергией, который

называют ***основным*** или ***нормальным*** состоянием (уровнем) – E_0, а все другие – ***возбужденными***. Переходы между уровнями энергии показаны вертикальными линиями, а стрелками – их направления. Стрелка, направленная вниз, соответствует испусканию, стрелка вверх – поглощению фотона. Энергия излучаемого фотона $h\nu$ равна разности энергий электронных энергетических уровней, между которыми произошел переход.
Совокупность фотонов, испускаемых или поглощаемых при переходе атома или молекулы из одного энергетического состояния в другое, называют **спектральной линией**. Если вся энергия этого излучения (или поглощения) сосредоточена в достаточно узком интервале длин волн, который можно охарактеризовать значением одной длины волны, то такое излучение и соответствующую спектральную линию называют **монохроматической***.*

Совокупность переходов, относящихся к определенному атому, иону, молекуле из состояний с большими энергиями (верхние уровни) в состояния с меньшими энергиями (нижние уровни) дает ***спектр испускания***; переходы с нижних на верхние энергетические уровни – ***спектр поглощения***, т. е. систему характеристических спектральных линий элемента.

Наиболее интенсивны линии, соответствующие переходам с основного уровня (поглощение) или на основной уровень (излучение, эмиссия). Эти линии называют ***резонансными***.

Атомы каждого элемента в определенных условиях образуют характерный линейчатый спектр поглощения или излучения. Не существуют два таких элемента, которые имели бы тождественные системы линий в атомном спектре.

В оптической атомной спектрометрии аналитический сигнал формируют: возбужденные атомы, ионы (реже молекулы) – в методах атомно-эмиссионной спектроскопии и невозбужденные свободные атомы – в методе атомно-абсорбционной спектроскопии.

В основе указанных методов лежат два основных положения:

1) атомы каждого элемента характеризуются определенным набором спектральных линий;

2) интенсивность испускания и степень поглощения каждой спектральной линии зависит от концентрации атомов указанного элемента в газовой фазе;

3) полученные значения интенсивностей эмиссионных или абсорбционных линий должны быть сопоставлены с таковыми, полученными для образцов сравнения известного элементного состава.

По положению характерных линий в спектре можно определить элементный состав образца (*качественный анализ*), а по относительным величинам интенсивностей линий в спектрах излучения или величинам поглощения линий в спектрах поглощения определить концентрации элементов в анализируемом образце (*количественный анализ*).

Методы анализа, основанные на испускании атомами излучения, называют *атомно-эмиссионными*, а на поглощении атомами излучения внешнего источника – *атомно-абсорбционными*.

В настоящем пособии более подробно рассмотрены два метода оптической атомной спектрометрии: атомно-эмиссионный метод, в котором для атомизации и возбуждения спектров определяемого элемента используют пламя (метод эмиссионной фотометрии пламени), а также метод пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии. Оба метода используют для анализа жидких проб.

2.2. Эмиссионная фотометрия пламени

Принцип метода эмиссионной фотометрии пламени заключается в следующем: с помощью сжатого воздуха анализируемый раствор вводят в атомизатор (пламя горелки) в виде аэрозоля (рис. 2.2).

В пламени вещество переходит в газообразное состояние, частично распадается на атомы, ионы, молекулы; происходит их возбуждение, а затем излучение энергии. Из направленного в спектральный прибор излучения светофильтром или другим монохроматором выделяют излучение (линию) определяемого элемента. Попадая на детектор, излучение преобразуется в фототок или напряжение, которое после усиления измеряют регистрирующим прибором.

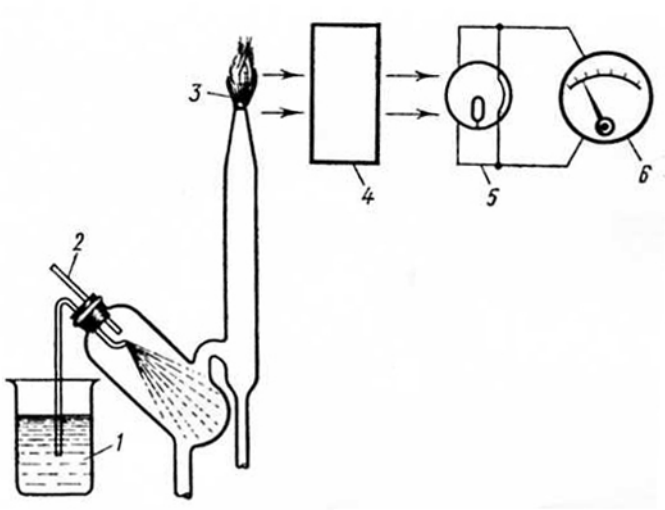


Рис. 2.2. Принципиальная схема пламенного фотометра: *1* – анализируемый раствор; *2* – распылитель; *3* – горелка; *4* – монохроматор; *5* – фотоэлемент (фотоумножитель); *6* – детектор (гальванометр).

Интенсивность излучения атомами пропорциональна их концентрации в пламени, которая в свою очередь пропорциональна концентрации ионов в растворе. Определение основано на *уравнении Ломакина-Шайбе*:

$$I = ac^b, \qquad (2.1)$$

где a – коэффициент, учитывающий условия испарения и возбуждения образца, c – концентрация элемента в пробе, b — коэффициент самопоглощения: в области малых концентраций самопоглощение мало и $b \approx 1$, с увеличением концентрации атомного пара самопоглощение возрастает и $0 \le b < 1$. Зависимость между интенсивностью излучения и концентрацией элемента в анализируемом растворе апроксимируется прямой линией в определенном для каждого элемента диапазоне концентраций при постоянстве коэффициента a и $b \approx 1$.

Этот диапазон зависит от элемента, состава пробы, параметров прибора, типа пламени и определяется экспериментально по растворам *образцов сравнения*. Одним из требований, предъявляемым к ним, – соответствие химического состава и физико-химических свойств составу и свойствам анализируемого раствора.

Неизвестные концентрации элемента определяют преимущественно методами градуировочного графика, ограничивающих растворов и добавок.

Метод градуировочного графика. Из стандартных растворов определяемых элементов разбавлением готовят серию образцов сравнения. Диапазон концентраций элементов в серии устанавливают, исходя из предполагаемых концентраций определяемых элементов в анализируемом образце. При одинаковых параметрах работы измерительного прибора фотометрируют образцы сравнения и анализируемый образец. По результатам измерения для каждого элемента строят градуировочный график (рис. 2.3, *а*). По оси абсцисс откладывают концентрации элемента в образцах сравнения – с, мкг/мл, по оси ординат – показания измерительного прибора и определяют концентрации элементов в анализируемом образце.

Метод ограничивающих растворов основан на сравнении интенсивностей излучения линий определяемого элемента при последовательном введении в пламя анализируемого раствора и двух образцов сравнения. Предварительно по серии образцов сравнения устанавливают диапазон линейной зависимости показаний измерительного прибора от концентрации. В установленном диапазоне линейности выбирают образец сравнения с концентрацией определяемого элемента c_1, меньшей, чем концентрация c_x в анализируемом растворе и образец сравнения с концентрацией элемента c_2, большей, чем c_x ($c_1<c_x<c_2$). Два выбранных образца сравнения и анализируемый раствор фотометрируют при одинаковых параметрах работы измерительного прибора.

Неизвестную концентрацию элемента вычисляют по формуле:

$$c_x = c_1 + \frac{(c_2 - c_1)(a_x - a_1)}{(a_2 - a_1)}, \qquad (2.2)$$

где c_x и a_x – концентрация определяемого элемента в анализируемом растворе и соответствующее ей показание измерительного прибора, c_1, c_2 – концентрации определяемого элемента в двух выбранных образцах сравнения и a_1, a_2 – показания измерительного прибора для них.

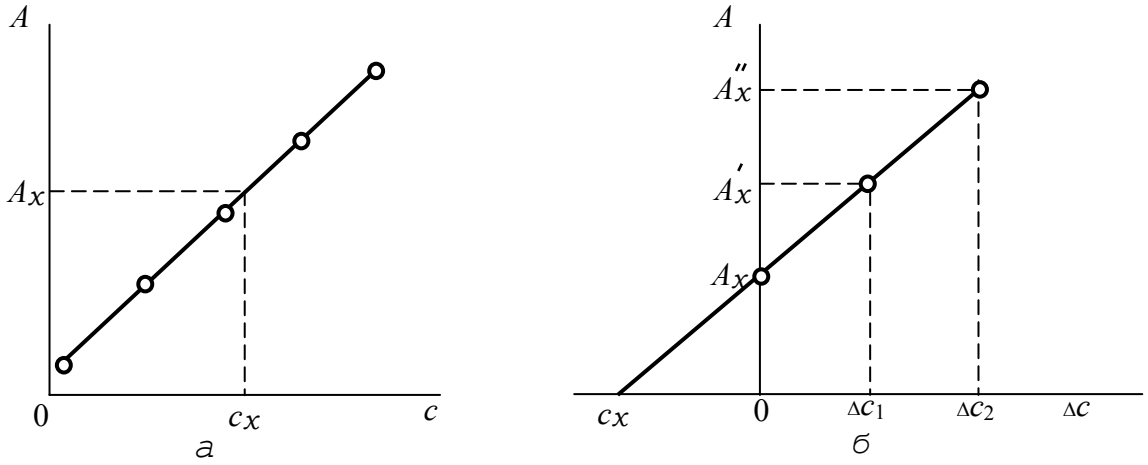


Рис. 2.3. Определение концентрации вещества в растворе: а) методом градуировочного графика; *б)* методом добавок. *А* — показание прибора.

Метод ограничивающих растворов широко используют при проведении экспрессного анализа большого числа проб. При работе в области линейной зависимости величины аналитического сигнала (показания прибора) от концентрации определяемого элемента данный метод позволяет получить не менее точные результаты, чем метод градуировочного графика.

Метод добавок применяют при анализе образцов неизвестного или сложного состава, когда возникают затруднения при приготовлении образцов сравнения. В этом методе анализируемый раствор делят на три равные аликвоты. Ко второй и третьей аликвотам добавляют различные известные количества стандартного раствора вещества. Количества добавляемого стандартного раствора подбирают с таким расчетом, чтобы концентрации вещества в трех аликвотах в результате добавок отвечали соотношению:

$$c_x : (c_x + \Delta c_1) : (c_x + \Delta c_2) \approx 1:2:3,$$

где c_x – концентрация вещества в анализируемом растворе (аликвота анализируемого раствора без добавки), Δc_1 и Δc_2 – изменение концентрации вещества во второй и третьей аликвотах в результате добавок.

Приготовленные растворы фотометрируют и по результатам измерений строят график зависимости аналитического сигнала от изменения концентрации вещества в результате добавок (рис. 2.3, *б*). Экстраполяцией графика на нулевое значение *А* находят концентрацию вещества в анализируемом растворе c_x. Метод добавок применим только

при соблюдении линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого элемента.

Работа 1

Определение концентрации натрия и калия при совместном присутствии методом ограничивающих растворов

Для определения используют наиболее интенсивные резонансные линии дуплета натрия 589,0 и 589,9 нм и калия 767 нм. В качестве меры селективности при определении одного элемента в присутствии другого используют «фактор специфичности», который показывает, при каком соотношении концентраций мешающего элемента c_2 и определяемого c_1 сигнал от мешающего будет равен сигналу от определяемого элемента: $F = c_2/c_1$.

Для пламенного фотометра с интерференционными светофильтрами фактор специфичности составляет при определении натрия в присутствии калия $2 \cdot 10^2$ — $8 \cdot 10^3$, при определении калия в присутствии натрия — $5 \cdot 10^2$.

Реагенты и аппаратура

Стандартный раствор хлорида натрия, содержащий 50 мкг/мл натрия.

Стандартный раствор хлорида калия, содержащий 50 мкг/мл калия.

Фотометр пламенный автоматический ФПА-2.

Выполнение определения. Лаборант практикума включает пламенный фотометр в сеть; по истечении 25-30 мин устанавливает оптимальные параметры работы его распылительной системы: давление воздуха 0,004 МПа (0,4 кгс/см^2) и расход газа в пределах 3-10 делений по шкале ротаметра; проверяет готовность пламенного фотометра к работе.

Студенты готовят в четырех мерных колбах емкостью 50,0 мл образцы сравнения, содержащие смеси хлоридов натрия и калия с концентрациями 5, 10, 15, 20 мкг/мл каждого элемента, посредством разбавления их стандартных растворов. В пятую мерную колбу преподаватель наливает анализируемый

раствор. Содержимое пяти мерных колб разбавляют до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают.

По образцу сравнения с максимальными концентрациями натрия и калия в автоматическом режиме выбирают коэффициенты усиления отдельно для натрия и калия.

При выбранных коэффициентах усиления фотометрируют линии натрия и калия в четырех образцах сравнения в режиме "прямого отсчета". В этом режиме на цифровое электронное табло непосредственно выводится величина аналитического сигнала – напряжение, V, мВ. По нескольким устойчивым показаниям V рассчитывают средние значения, строят градуировочные графики для определения натрия и калия, откладывая по оси абсцисс концентрации *с*, мкг/мл натрия и калия в образцах сравнения, по оси ординат – соответствующие средние значения величины V, мВ и устанавливают диапазон линейной зависимости показаний измерительного прибора от концентрации определяемых элементов. Далее фотометрируют линии натрия и калия в анализируемом растворе в тех же условиях, что и образцы сравнения.

Распылитель и горелку промывают дистиллированной водой.

Из серии образцов сравнения выбирают два раствора, между величинами напряжения, V, мВ (при фотометрировании натрия и калия) которых находятся величины напряжения, V, мВ натрия и калия анализируемого раствора.

Два выбранных образца сравнения и анализируемый раствор фотометрируют в одинаковых условиях, по устойчивым показаниям электронного табло рассчитывают средние величины V, мВ полученных отсчетов. Неизвестные концентрации натрия и калия рассчитывают по формуле 2.2.1.

В лабораторный журнал следует записать: а) название метода и работы; *б)* название прибора, состав газа, давление газа и воздуха, длины волн (нм) линий определяемых элементов, коэффициенты усиления сигнала для каждого элемента; *в)* величины концентраций и объемов стандартных растворов определяемых элементов, используемых при приготовлении образцов сравнения; *г)* концентрации определяемых элементов в образцах сравнения; *д)* результаты фотометрирования; *е)* результаты определения элементов, полученные графическим и расчетным методом.

? 🕮 *Вопросы для самоконтроля*

1. Что такое спектр испускания и поглощения? Какова природа спектров атомов и молекул?
2. Перечислите характеристики спектральных линий, какие из них используют в качественном и количественном эмиссионном спектральном анализе? Какие спектральные линии называют резонансными?
3. На чем основан метод эмиссионной фотометрии пламени? Перечислите основные узлы пламенно-ионизационной установки.
4. Дайте характеристику пламени как источника атомизации и возбуждения. Приведите общую схему процессов, происходящих в пламени. Какие процессы в пламени определяют концентрацию атомов в нем?
5. Приведите уравнение Ломакина-Шайбе и дайте характеристику входящих в него величин. Как зависит интенсивность спектральных линий от условий возбуждения?
6. Как влияют состав и физико-химические свойства раствора на результаты пламенно-фотометрического определения элементов? От каких факторов зависит диаметр капли аэрозоля?
7. Перечислите виды помех в эмиссионной фотометрии пламени и способы их устранения.
8. Опишите способы определения неизвестной концентрации в методе фотометрии пламени: метод градуировочного графика, метод добавок, метод ограничивающих растворов. Перечислите особенности каждого из них.
9. Каковы предел обнаружения, селективность, воспроизводимость определения элементов методом эмиссионной фотометрии пламени? Каковы достоинства и недостатки этого метода?
10. Какие элементы определяют методом эмиссионной фотометрии пламени и почему? Приведите примеры использования этого метода в анализе медицинских и биологических объектов.

[1]; [2]. Кн. 2. Гл. 11. С. 199-244. [3]. Гл. 7.3. С. 357-361, 381-388; [5]. Кн. 2. Гл. 2. С. 10-49; [6]. Гл. 2. С. 15-34, Гл. 6. С. 90-98.

2.3. Пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия

Атомно-абсорбционная спектрометрия основана на поглощении резонансного излучения оптического диапазона невозбуждёнными свободными атомами. Различают атомную абсорбцию с пламенной и электротермической атомизацией пробы.

Пламенный атомно-абсорбционный спектрометр состоит из источника первичного излучения (лампы с полым катодом, безэлектродной разрядной лампы и др.), который даёт поглощаемое излучение; модулятора (устройства, подающего излучение на пробу периодическими импульсами); источника свободных атомов с соответствующей системой ввода пробы (щелевой горелки); оптической диспергирующей системы (монохроматора), детектора (фотоумножителя), усилителя и электронных устройств для сбора, обработки и редактирования данных (рис. 2.4).

Величина атомного поглощения (A) связана с концентрацией атомов в основном состоянии ($c_{ат}$) и, следовательно, с концентрацией элемента по основному закону светопоглощения:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = k_{ат} l c_{ат}, \qquad (2.3)$$

где I_0 и I — интенсивность падающего и прошедшего излучения, соответственно; $k_{ат}$ — коэффициент поглощения света свободными атомами; l — длина оптического пути (толщина слоя атомного пара).

Следует отметить, что количественный атомно-абсорбционный анализ возможен при соблюдении двух условий, сформулированных Уолшем: *1)* источник первичного излучения испускает линию с длиной волны, равной длине волны, соответствующей максимальному поглощению атомных паров; *2)* полуширина линии поглощения атомных паров должна быть по крайней мере в 2 раза больше полуширины линии испускания источника.

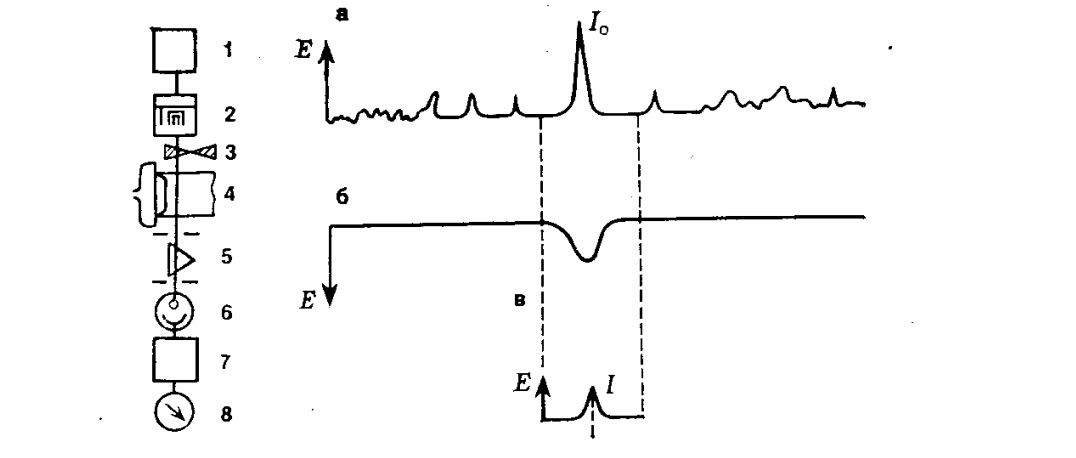


Рис. 2.4. Схема атомно-абсорционного спектрометра: *1* – питание источника излучения, *2* – источник первичного излучения, *3* – модулятор, *4* – атомизатор (пламя), *5* – монохроматор, *6* – детектор, *7* – усилитель, *8* – отсчетное устройство. Спектры: первичного излучения *(а)*; поглощения (*б*), эмиссионный после поглощения атомным паром *(в)*.

Для нахождения неизвестной концентрации элемента в пробе так же, как и в методе эмиссионной фотометрии пламени применяют методы градуировочного графика и добавок.

Работа 2

Определение меди в природной воде

Реагенты и аппаратура

Стандартный раствор сульфата меди, содержащий 25 мкг/мл меди.

Пламенный атомно-абсорбционный спектрометр «Квант-2А».

Лампа с полым катодом для определения меди.

Выполнение определения. Студенты готовят в пяти мерных колбах емкостью 50,0 мл образцы сравнения, содержащие 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мкг/мл меди, посредством разбавления стандартного раствора. В шестую мерную колбу ёмкостью 50,0 мл преподаватель наливает анализируемый раствор. Содержимое шести мерных колб разбавляют до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают.

Фотометрируют последовательно растворы образцов сравнения в порядке увеличения концентрации меди. Аналитический сигнал для каждого из растворов стандартной серии измеряют не менее трех раз. По полученным данным строят градуировочный график в координатах атомное поглощение (в программе обозначается как $D_{ат}$) — концентрация меди (мкг/мл). Используя метод наименьших квадратов, рассчитывают коэффициенты градуировочной зависимости.

Измеряют (не менее трех раз) аналитический сигнал анализируемого раствора и по полученному градуировочному графику определяют содержание меди в образце. Результаты определения меди в анализируемом растворе обрабатывают с применением методов математической статистики (см. *Приложение*).

Измеряют величину фонового сигнала, для чего проводят 10 последовательных измерений атомного поглощения ($D_{ат}$) дистиллированной воды. По полученным данным рассчитывают предел обнаружения (c_{min}) меди по предложенной методике.

В лабораторный журнал следует записать: а) название метода и работы; *б)* название прибора, состав газа, давление газа и воздуха, длину волны (нм) линии определяемого элемента *в)* величины концентрации и объемов стандартного раствора определяемого элемента, используемого для приготовления образцов сравнения; *г)* концентрации определяемого элемента в образцах сравнения; *д)* результаты измерений атомного поглощения фонового раствора и растворов определяемого элемента; *е)* результат определения меди в анализируемом растворе, полученный графическим и расчётным методом ($m_{cu} = \overline{m} \pm \Delta m$).

Порядок работы на спектрометре «Квант-2А»

I. Подготовка прибора к работе

Эти действия выполняет преподаватель:

- Включить питание (общий рубильник, затем «пилот» на каждом из приборов).
- Включить компрессор и удостовериться в его исправной работе: компрессор должен автоматически отключаться

после того, как стрелка левого манометра достигнет красного сектора.

- Открыть баллон с пропаном, повернув вентиль на баллоне и кран на редукторе.
- Включить компьютер.

1. Запустить программу «Квант»: нажать кнопку «Пуск» в левом нижнем углу экрана, в появившемся списке кликнуть по иконке «Квант 2А» и дождаться загрузки программы.
2. Включить прибор, нажав выключатель «Сеть» на панели прибора. Нажать кнопку «Сброс», расположенную над выключателем. После этого иконка «Прибор» в главном окне программы должна изменить цвет, сигнализируя о том, что она доступна для использования (рис. 2.5).

Рис. 2.5. Панель иконок в главном окне программы

3. Кликнуть по иконке «Методика», расположенной на панели иконок в верхней части окна программы. В появившемся окне (рис. 2.6) выделить определяемый элемент (Cu) и используемую методику (водные растворы). Нажать кнопку «Выбрать».
4. В появившемся окне нажать кнопку «дальше».
5. Проверить значения токов лампы с полым катодом (ЛПК) и дейтериевой лампы (дейтериевая коррекция фона), а также напряжения на фотоэлектроумножителе (ФЭУ). Параметры должны быть подобраны таким образом, чтобы сигналы от ЛПК (желтая полоска) и лампы коррекции (синяя полоска) находились в диапазоне 80 – 100 ед. Для корректировки значений параметров воспользоваться функцией «автоматическая балансировка» (рис. 2.7).

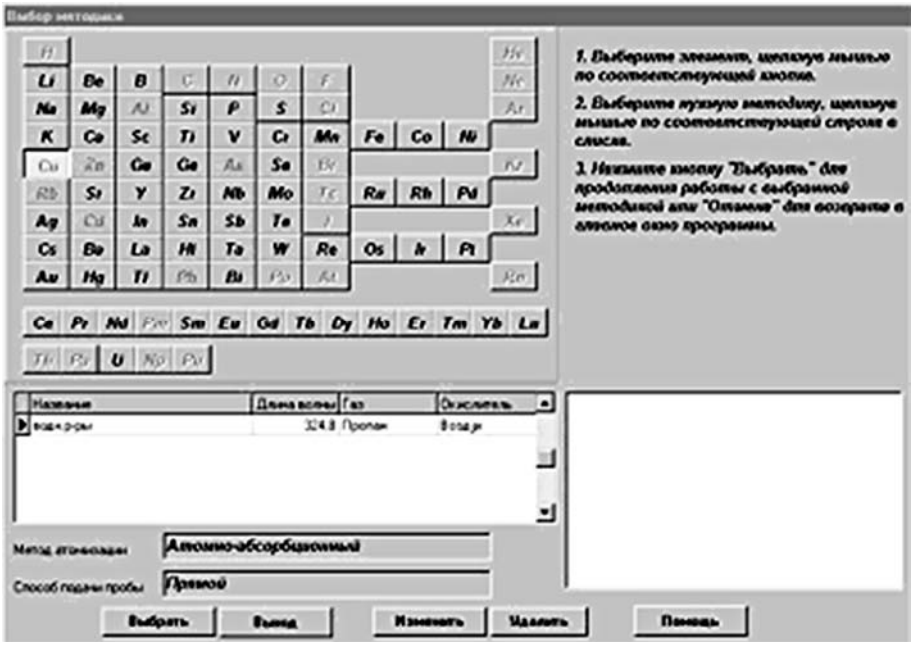


Рис. 2.6. Выбор определяемого элемента и используемой методики

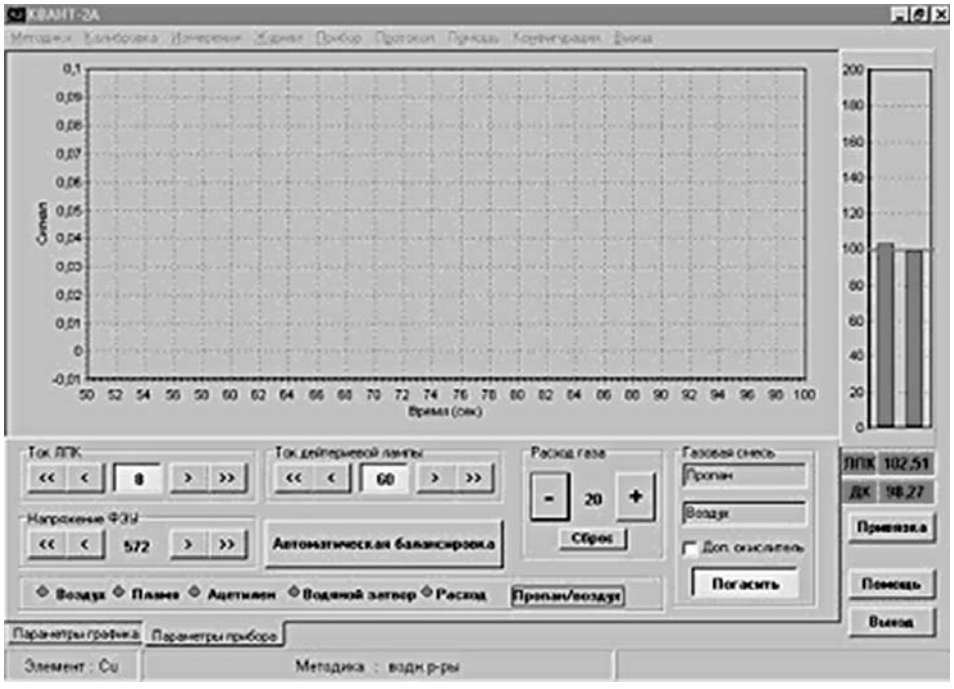


Рис. 2.7. Окно «Прибор»

6. Нажать кнопку «Поджечь». После того, как пламя загорелось, опустить конец капилляра в сосуд с дистиллированной водой. *Если пламя не удалось поджечь два раза подряд, необходимо нажать кнопку «Сброс» (не на приборе, а в окне программы!!!) и дождаться, пока индикатор расхода загорится зеленым цветом, после чего попытаться поджечь пламя еще раз.*
7. Убедиться в том, что все индикаторы (кроме индикатора подачи ацетилена) в нижней части окна отображаются зеленым цветом.
8. Отрегулировать расход газа с помощью кнопок «+» и «-» таким образом, чтобы пламя было стабильным. Рекомендуемый расход газа — 20-30 ед.
9. Нажать кнопку «привязка» и убедится в отсутствии значительных скачков базовой линии (нормальный разброс значений фонового сигнала находится в пределах 0±0,005 ед. атомного поглощения).
10. Нажать кнопку «Выход».

II. Градуировка

1. Нажать на иконку «Калибровка» на панели программы. Удалить все созданные ранее калибровки. Для этого выделить в окне «Доступные калибровки» удаляемую калибровку, кликнув на соответствующую строку таблицы и нажать на кнопку «Удалить». После полной очистки таблицы «Доступные калибровки» нажать кнопку «Создать» (рис. 2.8).
2. Во всплывающем окне «Измерение (абсорбция)» должны быть заданы следующие параметры: время задержки 3 с, время измерения 5 с, тип измерения – «Симметризация» (рис. 2.9).
3. Ввести значения концентраций определяемого элемента в образцах сравнения. Значения вводят в окошке под кнопкой «Добавить стандарт», после введения каждого значения нужно нажать кнопку «Добавить стандарт». Единицы измерения концентрации – мг/л, разделителем целой и дробной части является символ запятой.

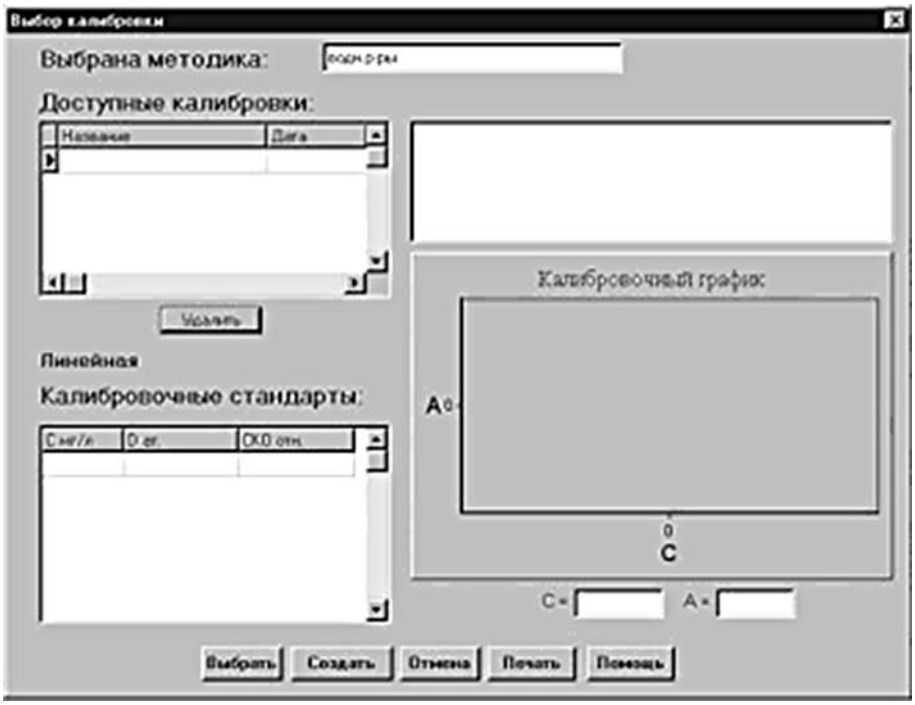


Рис. 2.8. Окно выбора калибровки

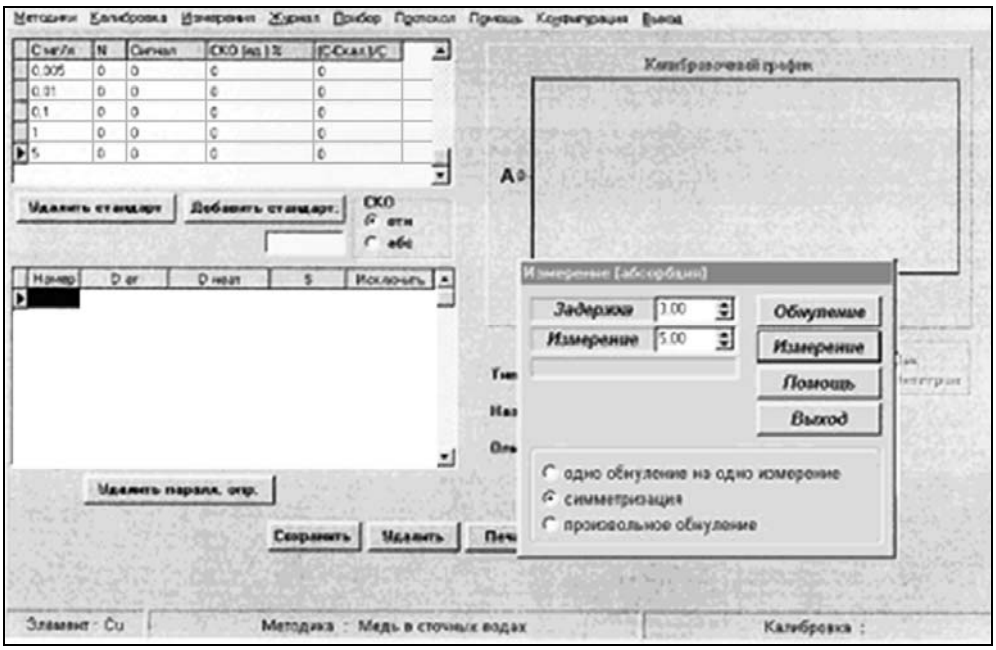


Рис. 2.9. Калибровка

4. Измерить атомное поглощение каждого образца сравнения, для этого:

а) выделить образец сравнения в таблице (выделенный образец должен быть отмечен черным треугольником);

б) нажать кнопку «Обнуление» во всплывающем окне (капилляр должен находиться в сосуде с дистиллированной водой), дождаться окончания измерения;

в) поместить капилляр в колбу со стандартным раствором, нажать кнопку «Измерение»;

г) повторить п. *а-в* еще два раза. Таким образом, для каждого образца должно быть выполнено по три измерения;

д) выполнить еще одно обнуление;

е) перейти к следующему образцу сравнения.

5. Нажать кнопку «Сохранить».

III. Определение концентрации металла в контрольном образце

1. Кликнуть по иконке «Измерение» на панели программы и открыть окно «Измерение» (рис. 2.10).

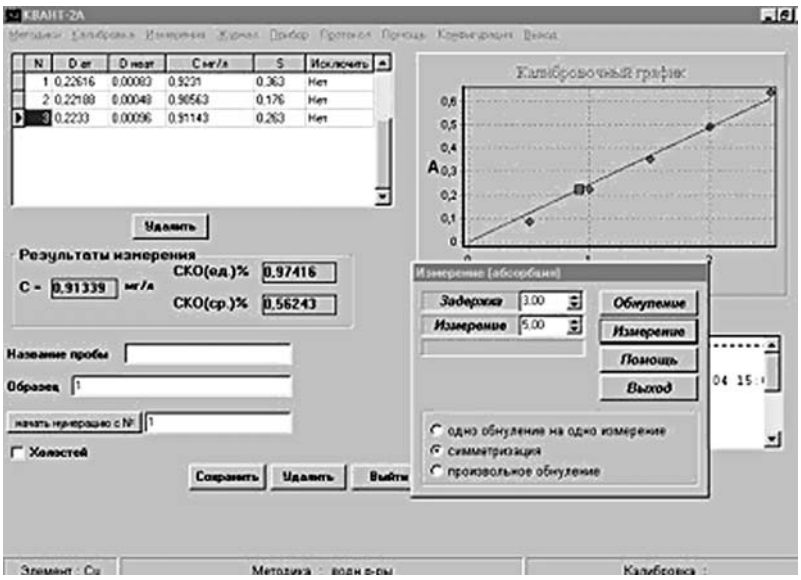


Рис. 2.10. Окно «Измерение»

2. Измерить атомное поглощение анализируемого раствора аналогично тому, как это делали при построении градуировки (см. п. *б-д* в разделе II.4).
3. По окончании измерений нажать кнопку «Выход» во всплывающем окне «Измерение (абсорбция)» и в основном окне «Измерение». В появившемся окне нажать кнопку «Нет» (отказаться от печати отчета).

IV. Измерение фона

Провести 10 - 20 измерений фонового сигнала. Процедура измерения аналогична измерению сигнала контрольного образца (п. III), однако капилляр постоянно должен находится в дистиллированной воде.

V. Завершение работы

1. Кликнуть на иконку «Прибор» на панели главного окна программы (рис. 2.7).
2. Нажать кнопку «Погасить».
3. Вынуть капилляр из сосуда с водой.

Эти действия выполняет преподаватель:

- Закрыть баллон с пропаном, повернув вентиль на баллоне и кран на редукторе.
- Выключить компрессор.
- Выключить прибор кнопкой «Сеть».
- Завершить работу с программой, нажав на «крестик» в правом верхнем углу окна программы, после чего нажать кнопку «Да» в появившемся окне.
- Выключить компьютер, нажав «Пуск. Выход» в нижнем левом углу, и только после соответствующего сообщения на экране нажать кнопку «Power» на корпусе компьютера.
- Выключить питание («пилот» на каждом из приборов, затем общий рубильник).

? 🕮 *Вопросы для самоконтроля*

1. На чём основан метод атомно-абсорбционной спектрометрии? Какая зависимость лежит в основе метода? Что является основной характеристикой интенсивности атомного поглощения при данной длине волны?

2. В чём заключается роль атомизатора: *а)* в атомно-эмиссионном и *б)* атомно-абсорбционном методах анализах?
3. При каком способе атомизации достигается наиболее высокая чувствительность определения элементов методом атомно-абсорционной спектрометрии? Каковы достоинства и недостатки пламенных атомизаторов? Сколько процентов атомов определяемого элемента формируют аналитический сигнал в пламенной абсорбционной спектрометрии?
4. Перечислите основные узлы пламенного атомно-абсорбционного спектрометра. Какие источники излучения дают возможность получить линейчатый спектр? Как устроены лампы с полым катодом, каков принцип их работы?
5. Какие горелки и пламёна используют в методе атомно-абсорционной спектрометрии? Как влияет увеличение температуры пламени на величину аналитического сигнала?
6. Как влияет ионизация атомов определяемого элемента на величину атомного поглощения? Как можно уменьшить степень ионизации определяемого элемента?
7. Какие спектральные помехи наблюдаются в методе атомно-абсорбционной спектрометрии? Как их устраняют?
8. Каковы метрологические характеристики метода атомно-абсорбционной спектрометрии, его достоинства и недостатки?
9. Можно ли использовать метод атомно-абсорбционной спектрометрии для *а)* многоэлементного анализа; *б)* анализа твёрдых проб?
10. Для решения каких медицинских задач можно использовать метод атомно-абсорбционной спектрометрии? Приведите примеры.

[1]; [2]. Кн. 2. Гл. 11. С. 199-225. С. 244-252; [5]. Кн. 2. Гл. 2. С. 10-12. Гл. 4. С. 92-97; [6]. Гл. 2. С. 15-34, Гл. 6. С. 103-106.

Глава 3. Молекулярная абсорбционная спектроскопия в УФ и видимой областях спектра (спектрофотометрия)

3.1. Общие положения

Спектрофотометрия (абсорбционная молекулярная спектроскопия) исследует сигналы в диапазоне длин волн 100–

750 нм, связанные с возбуждением электронной системы молекулы. Метод основан на избирательном поглощении электромагнитного излучения однородными нерассеивающими системами. Ослабление мощности монохроматического потока излучения при прохождении через слой раствора поглощающего вещества описывается ***основным законом светопоглощения***:

$$\lg(\Phi_0/\Phi) = A = -\lg T = klc \qquad (3.1)$$

где Φ_0 и Φ – мощности потоков монохроматического излучения, падающего на слой раствора и вышедшего из него, соответственно; A – оптическая плотность; T – пропускание; k – коэффициент поглощения вещества; l – толщина поглощающего слоя; c – концентрация поглощающего вещества в растворе.

Коэффициент k зависит от природы вещества, растворителя, длины волны (частоты) излучения и имеет размерность, обратную произведению размерностей l и c. Значение k при выбранной длине волны можно рассчитать по формуле (3.1), зная концентрацию вещества, толщину поглощающего слоя и значение оптической плотности или пропускания при выбранной длине волны. Абсолютная величина коэффициента поглощения характеризует чувствительность определения вещества (S) при l =1 см:

$$S=(dA/dc)_{l=1см} = k. \qquad (3.2)$$

Если концентрация вещества в растворе выражена в моль·л$^{-1}$, а толщина поглощающего слоя в см, то коэффициент поглощения обозначают символом ε и называют *молярным коэффициентом поглощения*. Его размерность – л·моль$^{-1}$·см$^{-1}$, а численное значение равно оптической плотности раствора с концентрацией 1 моль·л$^{-1}$ при толщине поглощающего слоя 1 см. Для полос, соответствующих разрешенным электронным

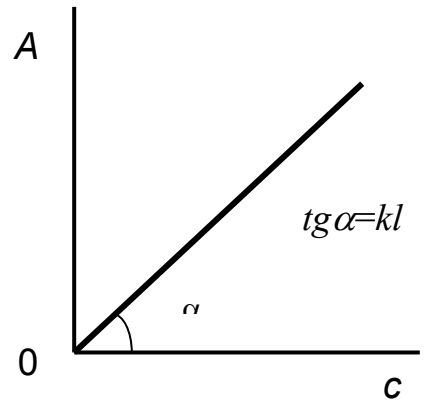


Рис. 3.1. Зависимость A от c при l=const в случае соблюдения основного закона светопоглощения.

переходам, ε принимает значение 10^3–10^5. Для серии растворов с переменной концентрацией поглощающего вещества и *l* = const зависимость *A = f(c)* линейна при условии выполнения основного закона светопоглощения (рис. 3.1). Критерием его выполнения является постоянство *k*.

При соблюдении основного закона светопоглощения в широком интервале длин волн спектры поглощения вещества в координатах *A*–λ (*A*–ν) имеют одинаковую форму независимо от толщины поглощающего слоя или концентрации вещества в растворе и характеризуются сохранением положения максимумов полос поглощения при одних и тех же длинах волн (частотах). Серии кривых *A=f* (λ) или *A=f* (ν), соответствующих

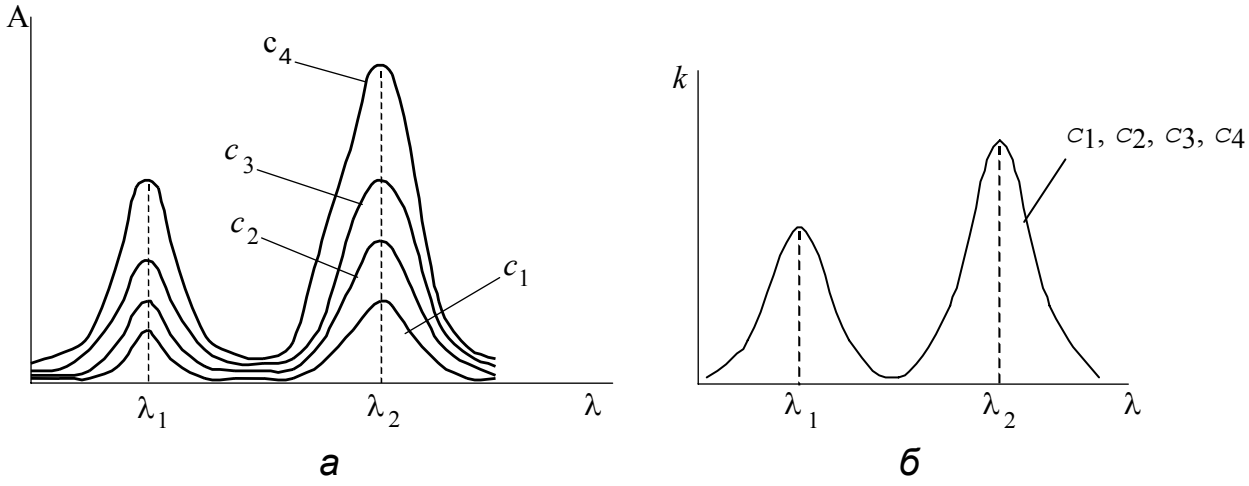


Рис. 3.2. Спектры поглощения растворов различной концентрации, подчиняющихся основному закону светопоглощения, в координатах *A*–λ (*а*) и *k*–λ (*б*); $c_1 < c_2 < c_3 < c_4$.

различным значениям *c* и *l*, будет отвечать одна кривая *k=f* (λ) или *k=f* (ν) (рис. 3.2).

Вещества, имеющие интенсивные полосы поглощения ($\varepsilon > 10^3$), определяют по их собственному поглощению (например, аминокислоты, аквакомплексы редко-земельных элементов). При определении веществ, имеющих слабоинтенсивные полосы поглощения, а также веществ, не обладающих собственным светопоглощением в УФ и видимой областях спектра, используют химические реакции, сопровождающиеся образованием или разрушением светопоглощающих соединений. Эти реакции называются

фотометрическими. При определении неорганических веществ чащевсего используют реакции комплексообразования с неорганическими и, особенно, с органическими реагентами. При определении органических веществ обычно прибегают к реакциям синтеза интенсивно окрашенных соединений (азосоединений, полиметиновых и хининиминовых красителей и т. д.).

Фотометрические реакции должны протекать быстро, избирательно, количественно: их проводят в условиях (pH раствора, концентрации реагентов, время реакции, температура), обеспечивающих полноту превращения определяемого вещества. Кроме того, светопоглощение образующихся или разрушающихся в результате фотометрической реакции веществ должно подчиняться основному закону светопоглощения в широком интервале концентраций определяемого вещества и быть постоянным во времени. При выборе фотометрической реакции основное внимание уделяют таким характеристикам, как чувствительность и селективность определения.

Схема любого способа фотометрического определения включает несколько этапов:

1. перевод анализируемого образца в раствор и отделение (в случае необходимости) мешающих компонентов;
2. проведение фотометрической реакции (если определяемое вещество обладает интенсивным селективным поглощением, то необходимость в проведении фотометрической реакции отпадает);
3. измерение светопоглощения раствора, полученного в результате проведения фотометрической реакции (или раствора анализируемого образца, если фотометрическая реакция не проводилась); при этом фотометрируемые растворы должны быть истинными во всем диапазоне определяемых концентраций;
4. расчет содержания определяемого вещества в анализируемом образце и его метрологическая оценка.

Каждый из перечисленных этапов одинаково важен, так как от правильности выполнения всех операций на том или ином этапе и учета всех факторов, влияющих на точность фотометрического определения, зависит конечный результат.

Для измерения светопоглощения используют спектральные приборы двух классов: фотоэлектроколориметры (с грубой

монохроматизацией светового потока, монохроматоры — светофильтры, выделяющие из сплошного спектра диапазон в 10 - 40 нм) и спектрофометры (с более тонкой монохроматизацией светового потока, монохроматоры — дифракционные решётки, выделяющие из сплошного спектра 0,5 - 1 нм). Спектрофотометрический метод по сравнению с фотометрическим имеет преимущества в чувствительности и точности определения, если фотометрируемое соединение обладает узкими полосами поглощения. При фотометрировании соединений, имеющих широкополосные спектры, спектрофотометрический метод не имеет преимуществ перед фотометрическим методом.

Поглощение исследуемого (стандартного, анализируемого) раствора обычно измеряют относительно *раствора сравнения*, поглощение которого условно принимают равным нулю. В процессе измерения оба раствора помещают в специальные сосуды с плоскопараллельными стенками – *кюветы*. Они изготовлены из прозрачного материала – кварца (пригодного для измерений в УФ и видимой областях спектра) или стекла (используемого при измерениях в видимой области спектра). Кюветы имеют одинаковую форму и обладают одинаковым пропусканием во всей спектральной области.

Если раствор сравнения представляет собой чистый растворитель или так называемый *контрольный раствор* (т. е. раствор, подвергнутый той же самой обработке и содержащий все компоненты анализируемого раствора за исключением определяемого вещества), то такой метод измерения называют *абсолютным*.

Концентрацию вещества в анализируемом растворе определяют методами градуировочного графика или ограничивающих растворов, описанными в предыдущей главе. Отметим, что условия приготовления (порядок прибавления реагентов, их количества, pH раствора и т. д.) и измерения светопоглощения (светофильтр или длина волны, толщина кюветы) стандартных и анализируемых растворов должны быть строго идентичны.

3.2. Анализ однокомпонентных систем фотометрическим методом

3.2.1. Общие указания к выполнению практических работ

При выполнении практических работ необходимо руководствоваться перечисленными ниже рекомендациями.

- Внимательно изучите разделы пособия, касающиеся выполняемой работы.
- Строго следуйте методике приготовления растворов, так как рекомендуемые условия получения фотометрируемого соединения (кислотность растворов, концентрации реагентов, порядок их прибавления и т. п.) оптимизированы. При приготовлении растворов *объемы* стандартного раствора определяемого вещества и анализируемых растворов *следует отмеривать* с максимальной точностью (*бюреткой, пипеткой*). Конечные объемы растворов должны быть одинаковыми, поэтому их следует готовить в мерных колбах. Стандартные и анализируемые растворы желательно готовить в одно время.
- Кюветы, предназначенные для измерения поглощения растворов, должны быть тщательно очищены. Их ополаскивают концентрированной HCl *(под тягой!),* промывают дистиллированной водой и насухо вытирают *снаружи* кусочками фильтровальной бумаги. Перед заполнением кювету ополаскивают небольшой порцией анализируемого раствора во избежание его разбавления. Заполняют кювету до такого уровня, чтобы световой поток полностью проходил через слой раствора (т.е. до метки, отмеченной на кювете).
- Кюветы следует устанавливать в кюветное отделение спектрального прибора всегда в строго определенное положение во избежание погрешностей, связанных с отражением и рассеянием светового потока. Для установки кювет в кюветное отделение используют специальный кюветодержатель. Кюветодержатель крепится на подвижной каретке. Перемещая каретку, в световой поток постепенно вводят кюветы с раствором сравнения и измеряемыми (стандартным и анализируемыми) растворами. *Следует избегать* вытекания раствора из кюветы на ее внешние стенки, так как, во-первых, это сказывается на прозрачности кюветы, а во-вторых, вызывает коррозию кюветодержателя и кюветного отделения.

▪ Включить прибор за 15 мин до начала измерений. Отсчет по измерительной шкале прибора необходимо сделать несколько раз, повторив процедуру настройки шкалы до получения воспроизводимых результатов. Иногда полезно повторно наполнить кювету и провести измерение вновь. Отсчет по измерительной шкале необходимо производить с точностью, указанной в паспорте прибора (0,001 единицы *A* в случае спектрофотометров; 0,01 единицы *A* в случае фотометров).

▪ По окончании работы необходимо выключить прибор, вымыть кюветы и использованную мерную посуду, привести в порядок рабочее место.

В лабораторном журнале следует записать: *а)* название выполняемой работы; *б)* формулу фотометрируемого соединения; *в)* краткую методику приготовления фотометрируемых растворов; *г)* условия проведения измерений; *д)* результаты измерений в виде таблиц и графиков; *е)* результаты обработки экспериментальных данных методами математической статистики.

3.3.2. Оптимизация условий фотометрических определений

При выполнении фотометрических определений определяемое вещество в большинстве случаев с помощью подходящей фотометрической реакции переводят в форму, обладающую значительным поглощением в УФ или видимой областях спектра. Условия проведения этой реакции должны обеспечивать полноту образования светопоглощающего соединения и отсутствие (или минимизацию) отклонений от основного закона светопоглощения. Для получения воспроизводимых и надежных результатов следует оптимизировать условия измерения оптической плотности образующегося раствора.

Оптимизация условий фотометрических измерений предполагает:

— выбор длины волны (спектрального диапазона);

— выбор толщины кюветы;

— нахождение области линейности определяемых концентраций.

Порядок работы. 1. Готовят пять растворов сравнения согласно одной из приведенных ниже методик.

2. Измеряют на фотометре оптические плотности третьего раствора со всеми светофильтрами, кроме первого, в кювете с *l*=1 см. Результаты измерений записывают по следующей форме:

Таблица 3.1. Выбор светофильтра (c_3 =...мкг/мл, l=1 см)

№ светофильтра	2	3	4	и т. д.
$\lambda_{эфф.}$, нм	364	400	440	
A				

Выбирают светофильтр, для которого оптическая плотность имеет наибольшее значение. Сравнивают значения λ_{max} пропускания выбранного светофильтра (приводится в описании фотометра) и λ_{max} полосы поглощения фотометрируемого соединения.

Подбирают кювету с таким расчетом, чтобы значение оптической плотности третьего раствора сравнения при выбранном светофильтре укладывалось в интервал 0,20–0,45.

3. Измеряют оптические плотности растворов сравнения и анализируемого раствора в выбранной кювете с выбранным светофильтром. Результаты измерений записывают в форме табл. 3.2.

Таблица 3.2. Данные для построения градуировочного графика (№ светофильтра, l=...см) и расчета ε

№ р-ра	1	2	3	…	Анализируемый
c, мкг/мл					
c, моль/л					
A					
ε, $М^{-1}\,см^{-1}$					

По данным табл. 3.2 строят градуировочный график в координатах *A* – *c* (мкг/мл) и находят концентрацию, а затем массу элемента в анализируемом растворе m_x.

4. На основании полученных экспериментальных данных рассчитывают чувствительность фотометрического способа определения элемента (тангенс угла наклона градуировочного

графика) и молярный коэффициент поглощения фотометрируемого соединения (с привлечением методов математической статистики, см. *Приложение*). Значение молярного коэффициента поглощения фотометрируемого соединения следует записывать в нормальном виде, выделяя целую степень десяти, например: $\varepsilon = (N \pm \Delta N) \cdot 10^n$.

Работа 1

Определение марганца(II) с формальдоксимом

Формальдоксим, $H_2C{=}NOH$, в щелочной среде взаимодействует с Mn^{2+}, образуя красно-коричневый комплекс с интенсивной полосой поглощения λ_{max} = 455 нм и ε_{max}= $1{,}12 \cdot 10^4$. Предполагают, что реакция протекает в две стадии. На первой стадии образуется бесцветный комплекс Mn^{2+}. Кислородом воздуха он быстро окисляется до красно-коричневого комплекса Mn(IV). Последнему приписывают формулу $[Mn(CH_2NO)_6]^{2-}$.

Согласно другой точке зрения, в процессе взаимодействия марганца с формальдоксимом ион металла окисляется до Mn(III), а состав образующегося комплекса соответствует формуле $Mn(CH_2NO)_3$.

Определению марганца формальдоксимом не мешают SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, F^-, CN^-, тартрат, оксалат и ЭДТА. Мешающее влияние Ni, Co, Cu, Fe(II), также образующих интенсивно окрашенные комплексы с формальдоксимом, маскируют цианидами.

Формальдоксиматный способ используют для определения марганца в олове, сплавах никеля, силикатных и карбонатных минералах, щелочах, пищевых продуктах и биологических материалах.

Реагенты и аппаратура

Стандартный раствор марганца(II), 0,05 мг/мл.
Раствор формальдоксима.
Гидроксид натрия, 1 М раствор.
Фотоэлектроколориметр концентрационный, КФК-2.

Выполнение определения. Для приготовления растворов сравнения в каждую из пяти мерных колб емкостью 50,0 мл

вводят стандартный раствор марганца с содержанием (мг): 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 и 0,125 соответственно, 10 мл воды, 0,5 мл раствора формальдоксима, 3 мл раствора щелочи. Растворы перемешивают и через 5 мин добавляют еще 4–5 капель раствора формальдоксима, 0,5 мл раствора щелочи и наблюдают, не увеличивается ли интенсивность окраски. Если интенсивность окраски не изменяется, то растворы в колбах разбавляют до метки водой и после перемешивания фотометрируют его относительно воды.

Для определения марганца в анализируемом растворе аликвоту этого раствора помещают в мерную колбу емкостью 50,0 мл. С раствором проводят те же операции и в той же последовательности, что и при приготовлении растворов сравнения, а затем фотометрируют относительно воды. Содержание марганца находят, пользуясь градуировочным графиком, построенным по результатам фотометрирования растворов сравнения.

Работа 2

Определение железа(III) с сульфосалициловой кислотой

При взаимодействии Fe(III) с сульфосалициловой кислотой образуются комплексы, состав и окраска которых зависят от кислотности раствора (табл. 3.3). В практике спектрофотометрического анализа применяют лишь комплексы, образующиеся в кислой и щелочной среде (pH 1,8 - 2,5 и 9 - 11,5).

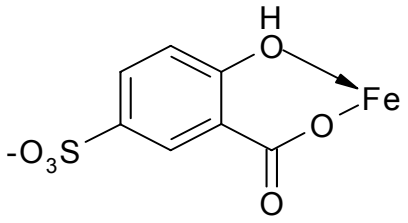
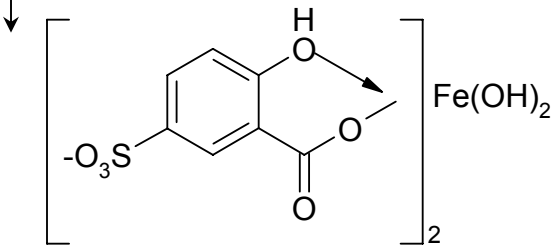
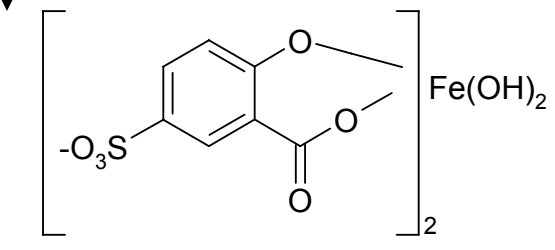
Определению не мешают фосфаты, бораты, ацетаты. В присутствии Mg(II), Al(III), Mn(II) определение Fe(III) проводят в кислой среде.

Реагенты и аппаратура

Стандартный раствор соли железа(III), 0,1 мг/мл.
Сульфосалициловая кислота, 10 %-ный раствор.
Серная кислота, 1 М раствор.
Аммиак, 10 %-ный раствор.
Фотоэлектроколориметр концентрационный, КФК-2.

Выполнение определения. 1. *Кислая среда.* В пять мерных колб емкостью 25,0 мл вводят стандартный раствор соли железа с содержанием его (мг): 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 и 0,30; 10 мл воды, 0,5 мл раствора H_2SO_4 и 2,5 мл раствора сульфосалициловой кислоты. Содержимое колб разбавляют водой до метки и перемешивают. Растворы фотометрируют относительно воды и строят градуировочный график.

Таблица 3.3. Состав и окраска комплексов Fe(III) с сульфосалициловой кислотой в зависимости от кислотности раствора

pH	Продукт	Характе-ристики
1,8 - 2,5	 *Красно-фиолетовый катионный комплекс (1:1)*	λ_{max} = 510 нм $\varepsilon_{max} = 1{,}8 \cdot 10^3$
4 - 8	 *Красно-бурый анионный бис-комплекс*	λ_{max} = 416 нм $\varepsilon_{max} = 5{,}8 \cdot 10^3$
9 - 11,5	$-2H^+$  *Желтый бис-комплекс*	
> 12	$Fe(OH)_3 \downarrow$ *Красно-бурый осадок*	-

Для определения железа аликвоту анализируемого раствора помещают в мерную колбу емкостью 25,0 мл. С раствором проводят те же операции и в той же последовательности, что и при приготовлении растворов, используемых для градуировки, а затем измеряют его поглощение относительно воды. Содержание железа определяют по градуировочному графику, построенному по результатам фотометрирования растворов сравнения.

2. *Щелочная среда.* В пять мерных колб емкостью 25,0 мл вводят стандартный раствор железа с содержанием (мг): 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 и 0,30 соответственно, 10 мл воды, 2,5 мл раствора сульфосалициловой кислоты, 2,5 мл раствора аммиака. Содержимое колб разбавляют водой до метки и перемешивают. Растворы фотометрируют относительно воды и строят градуировочный график.

Для определения железа аликвоту анализируемого раствора помещают в мерную колбу емкостью 25,0 мл. С раствором проводят те же операции и в той же последовательности, что и при приготовлении растворов, используемых для градуировки, а затем фотометрируют относительно воды. Содержание железа определяют по градуировочному графику, построенному по результатам фотометрирования растворов сравнения.

Работа 3

Определение хрома(VI) с дифенилкарбазидом

Дифенилкарбазид в кислой среде взаимодействует с хромом (VI) с образованием растворимого соединения красно-фиолетового цвета. В спектре поглощения продукта реакции наблюдается интенсивная полоса поглощения с λ_{max}= 546 нм и ε_{max}= $4{,}2 \cdot 10^4$.

Установлено, что на интенсивность окраски образующегося соединения существенно влияют чистота реагента и кислотность раствора. Оптимальной является кислотность 0,05–0,1 М по серной кислоте. Не следует использовать для подкисления соляную кислоту.

Реакция Cr(VI) с дифенилкарбазидом очень чувствительна

и достаточно селективна. Подобно Cr(VI) с дифенилкарбазидом реагирует Mo(VI), но реакция менее чувствительна. Окрашенные соединения с реагентом способны давать Fe(III) и V(V).

Реагенты и аппаратура

Стандартный раствор дихромата калия с содержанием хрома 0,01 мг/мл.
Дифенилкарбазид, 0,25%-ный водно-ацетоновый раствор.
Серная кислота, 3 М раствор.
Фотоэлектроколориметр концентрационный, КФК-2.

Выполнение определения. Для приготовления растворов сравнения в каждую из пяти мерных колб емкостью 50,0 мл вводят стандартный раствор дихромата калия с содержанием хрома (мг): 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 соответственно, 20 мл воды, 2 мл раствора серной кислоты, 1 мл раствора дифенилкарбазида. Содержимое колб разбавляют водой до метки. Растворы фотометрируют относительно воды.

Для определения хрома аликвоту анализируемого раствора помещают в мерную колбу емкостью 50,0 мл. С раствором проводят те же операции и в той же последовательности, что и при приготовлении растворов сравнения, а затем фотометрируют относительно воды. Содержание хрома находят, пользуясь градуировочным графиком, построенным по результатам фотометрирования растворов сравнения.

? 🕮 *Вопросы для самоконтроля*

1. Какие области электромагнитных излучений используют в спектрофотометрическом методе анализа и почему? В чем заключается различие между спектрофотометрическими и колориметрическими методами анализа?

2. Сформулируйте закон Бугера-Ламберта, закон Бера. Приведите формулу объединенного закона светопоглощения в логарифмическом виде и поясните смысл входящих в нее величин. Какова их размерность?

3. В каких пределах могут меняться величины оптической плотности и пропускания? Как зависит погрешность измерения оптической плотности от ее абсолютного значения? Какие значения оптической плотности измеряют с минимальной погрешностью?
4. Что является основным критерием соблюдения закона светопоглощения? Действие каких факторов может привести к нарушению линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора?
5. Каков физический смысл молярного коэффициента поглощения? Как на него влияют: *а)* длина волны падающего света; *б)* концентрация раствора; *в)* природа вещества? Какое значение для фотометрической реакции имеет абсолютное значение величины молярного коэффициента поглощения?
6. Как можно рассчитать минимальную, оптимальную и максимальную концентрации определяемого вещества в анализируемом растворе при известном значении молярного коэффициента поглощения?
7. Что называется спектром поглощения и в каких координатах его можно представить? Чем характеризуется высота максимума в спектре поглощения? Какие факторы необходимо учитывать при выборе рабочей длины волны, если спектр поглощения анализируемого вещества имеет несколько максимумов?
8. Как выбрать оптимальную толщину поглощающего слоя и интервал концентраций стандартной серии растворов для построения градуировочного графика?
9. Что такое фотометрическая реакция? Всегда ли ее проводят? Какие требования к ней предъявляют?
10. Перечислите этапы спектрофотометрического анализа и основные узлы приборов, используемых в спектрофотометрии. Какие способы монохроматизации светового потока используют в различных спектральных приборах?

[1]; [2]. Кн. 2. Гл. 11. С. 273-291; [3]. Гл. 7.4. С. 395-404; [5]. Кн. 2. Гл. 3. С. 50-90; [6]. Гл. 3. С. 35-71.

Глава 4. Молекулярная люминесценция

4.1. Общие положения

Все вещества при сильном нагревании начинают излучать электромагнитную энергию. Излучение нагретых веществ называют тепловым равновесным излучением. Однако некоторые вещества излучают электромагнитную энергию без нагревания – при комнатной температуре. Такое излучение называют ***люминесценцией***. В отличие от теплового, люминесценция является неравновесным излучением.

Для того, чтобы вызвать люминесценцию вещества, к нему необходимо подвести извне определенное количество энергии. В зависимости от способа возбуждения частиц различают фотолюминесценцию, хемилюминесценцию, биолюминес-ценцию, ионолюминесценцию, рентгенолюминесценцию и др.

В аналитической практике наиболее часто используют ***фотолюминесценцию***. При этом частицы вещества, поглощая поступающее извне электромагнитное излучение УФ и видимого диапазона длин волн, переходят в возбужденное энергетическое состояние. Возбужденные частицы довольно быстро теряют избыточную энергию и переходят в основное состояние. Такой переход может совершаться с излучением фотонов люминесценции или безызлучательно — путем передачи энергии окружающим частицам в виде тепла. Таким образом, люминесцирующая частица является самостоятельным источником излучения, преобразующим поглощенную энергию возбуждения в собственное излучение. Эта особенность люминесценции отличает ее от других видов излучения – рассеяния и отражения излучения, тормозного излучения заряженных частиц и т. д.

Важнейшими характеристиками фотолюминесценции молекул веществ являются их спектры поглощения, возбуждения и люминесценции. *Спектры поглощения* молекул обусловлены электронными переходами из основного состояния в возбужденное, их представляют в виде зависимости величины поглощения от частоты (длины волны). Величина поглощения может быть выражена пропусканием (T, %), оптической плотностью (A) или коэффициентом молярного поглощения (ε). При представлении спектра поглощения в виде

кривых T, % $= f(\nu)$, $A = f(\nu)$ или T, % $= f(\lambda)$, $A = f(\lambda)$ указывают толщину поглощающего слоя (l, *см*) и концентрацию вещества (*с, моль/л*).

Спектры люминесценции обусловлены электронными переходами из возбужденного состояния в основное. Их представляют в виде зависимости интенсивности люминесценции (I) от частоты (длины волны) испускаемого излучения.

Спектры возбуждения характеризуют активное поглощение, вызывающее люминесценцию молекул веществ. Эти спектры представляют в виде зависимости интенсивности люминесценции от частоты (длины волны) возбуждающего излучения. Спектры возбуждения идентичны спектрам поглощения и могут отличаться от них вследствие инструментальных искажений.

Люминесценция вещества возникает за счет поглощения им энергии возбуждения. Однако в энергию люминесценции превращается не вся поглощенная энергия возбуждения. Эффективность преобразования энергии возбуждения в энергию люминесценции характеризуют выходом люминесценции. *Энергетический выход люминесценции* определяется отношением излучаемой частицами вещества энергии E_e к поглощенной ими энергии возбуждения E_a:

$$\varphi_E = E_e / E_a \qquad (4.1)$$

Для фотолюминесценции вводится также понятие квантового выхода, представляющего собой отношение числа квантов люминесценции N_e к числу поглощенных квантов возбуждающего излучения N_a:

$$\varphi_K = N_e / N_a \qquad (4.2)$$

Так как энергия кванта равна $h\nu$, то между квантовым и энергетическим выходами существует соотношение:

$$\varphi_K = \varphi_E (\nu_a / \nu_e) \quad \text{или} \quad \varphi_K = \varphi_E (\lambda_e / \lambda_a) \qquad (4.3)$$

где ν_e, λ_e – частота и длина волны испускаемого кванта; а ν_a, λ_a – частота и длина волны поглощенного кванта.

Выход люминесценции является характеристическим параметром вещества при фиксированных условиях и значениях внешних параметров. Уменьшение выхода люминесценции носит название ***тушения люминесценции.*** Используемые в анализе люминофоры имеют квантовый выход более 0,01.

Важной характеристикой люминесценции является ***длительность свечения*.** Она представляет собой средний промежуток времени, в течение которого молекулы люминофора остаются в возбужденном состоянии. Указанную характеристику также называют средним временем жизни возбужденного состояния. Обычно время пребывания молекул люминофора в возбужденном состоянии невелико и составляет 10^{-10} – 10^{-7} с. Однако иногда они могут пребывать в возбужденном состоянии значительно больший промежуток времени – от 10^{-4} до 10^{2} с.

4.2. Основные законы молекулярной люминесценции

Правило Каши касается формы спектров люминесценции (флуоресценции, фосфоресценции) при возбуждении их излучением разных длин волн. Поскольку испускание квантов люминесценции всегда происходит с низшего электронно-возбужденного уровня молекулы, спектр люминесценции будет всегда одним и тем же независимо от того, на какой энергетический уровень попал электрон в результате поглощения фотона. Это означает, что *спектр люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего излучения*.

Закон Стокса-Ломмеля обусловливает взаимное расположение спектров люминесценции и поглощения и формулируется следующим образом: спектр люминесценции в целом и его максимум сдвинут по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в длинноволновую область. Это означает, что средняя энергия квантов люминесценции меньше средней энергии поглощенных квантов. Причина этого явления заключается в превращении части энергии поглощенных квантов в тепловую энергию:

$$h\nu_a = h\nu_l + Q \qquad (4.4)$$

где $h\nu_a$ –энергия поглощенного фотона возбуждающего света, $h\nu_l$ – энергия фотона люминесценции, Q – энергия теплового движения молекулы.

Правило Левшина, называемое также правилом зеркальной симметрии, утверждает, что нормированные спектры поглощения и флуоресценции, представленные в виде графиков $\varepsilon = f(\nu)$ и $I/\nu = f(\nu)$, зеркально симметричны относительно прямой, перпендикулярной оси частот и проходящей через точку пересечения спектров ν_0, причем для

ν_0 можно записать:

$$\nu_a + \nu_f = 2\nu_0 \qquad (4.5)$$

где ν_a и ν_f – симметричные частоты поглощения и флуоресценции. Частота ν_0 в выражении (4.5) может быть интерпретирована как частота чисто электронного перехода, т. е. перехода между нулевыми колебательными уровнями основного S_0 и первого возбужденного S_1 синглетных состояний. Соотношение (4.5) является математическим выражением правила Левшина и легко преобразуется к виду:

$$\Delta\nu = \nu_a - \nu_f = 2(\nu_a - \nu_0) \qquad (4.6)$$

Если на оси абсцисс откладывать значения ν_a, а на оси ординат – значения $\Delta\nu$, то при зеркальной симметрии спектров поглощения и флуоресценции должна получиться прямая с тангенсом угла наклона, равным 2.

Зеркальная симметрия спектров поглощения и флуоресценции характерна для сложных молекул и не наблюдается в случае простых молекул. Ее можно объяснить тем, что геометрия молекул мало меняется при электронном возбуждении, а расстояния между колебательными уровнями и вероятности переходов на них у молекул в основном и электронно-возбужденном состояниях близки.

Более строгое квантово-механическое обоснование правила Левшина дал Блохинцев. Он показал, что спектры поглощения и флуоресценции необходимо нормировать и строить в координатах ε / ν от ν и I / ν^4 от ν, соответственно.

Закон Вавилова устанавливает зависимость квантового выхода люминесценции от длины волны возбуждающего излучения. Согласно этому закону фотолюминесценция может сохранять постоянный квантовый выход, если возбуждающая волна преобразуется, в среднем, в более длинную, чем она сама. Напротив, выход фотолюминесценции резко уменьшается при обратном превращении длинных волн в короткие.

Закон Вавилова уточняет закон Стокса-Ломмеля и предусматривает возможность возникновения люминесценции при возбуждении ее излучением с большей длиной волны, чем излучение люминесценции (антистоксовая область возбуждения). Такая возможность реализуется вследствие того, что молекулы до поглощения квантов света могут обладать значительным запасом колебательной энергии,

которая, суммируясь с энергией поглощенных квантов, может приводить к излучению квантов с большей энергией, чем энергия поглощенных квантов:

$$h\nu_l = h\nu_a + E_V \qquad (4.7)$$

где $h\nu_l$ – энергия фотона люминесценции; $h\nu_a$ – энергия поглощенного фотона; E_V – энергия колебательного движения молекулы.

Закон затухания является одним из основных законов молекулярной люминесценции. Согласно этому закону интенсивность люминесценции после прекращения возбуждения спадает со временем по экспоненциальному закону:

$$I_t = I_0 \exp(-t/\tau), \qquad (4.8)$$

где I_t – интенсивность люминесценции в момент времени t; I_0 – интенсивность люминесценции в момент прекращения возбуждения люминесценции, τ – длительность люминесценции (среднее время жизни возбужденного состояния).

При $t = \tau$

$$I_\tau = I_0 / e = I_0 / 2{,}72 \sim 0{,}37\ I_0 \qquad (4.9)$$

Таким образом, при экспоненциальном затухании люминесценции весь ход процесса свечения определяется величиной τ.

4.3. Интенсивность люминесценции и концентрация люминофора

Если интенсивность люминесценции характеризовать числом квантов, испускаемых люминофором в единице объема в единицу времени, то, в соответствии с основным законом светопоглощения и определением квантового выхода люминесценции, зависимость интенсивности люминесценции от концентрации люминофора в растворе выражается формулой:

$$I = \varphi_к\, \Phi_0\, (1 - T) = \varphi_к\, \Phi_0\, (1 - 10^{-klc}), \qquad (4.10)$$

где Φ_0 – мощность возбуждающего излучения (число возбуждающих квантов, падающих на единицу объема раствора люминофора в единицу времени), T – пропускание люминофора при длине волны возбуждающего излучения, k – коэффициент поглощения люминофора при длине волны возбуждающего излучения. Если доля поглощенного

люминофором возбуждающего излучения мала ($klc < 0{,}05$), уравнение (4.10) упрощается:

$$I = 2{,}303\ \varphi_к\ \Phi_0\ klc. \qquad (4.11)$$

Таким образом, интенсивность люминесценции пропорциональна квантовому выходу люминесценции, интенсивности возбуждающего излучения, коэффициенту поглощения и концентрации люминофора. Уравнение (4.11) является математическим основанием количественного люминесцентного анализа. Зависимость интенсивности люминесценции от концентрации люминофора часто сохраняет линейный характер в пределах трех-четырех порядков величины концентрации. Отклонения от линейности вызваны рядом причин: невыполнением соотношения $klc<0{,}05$; явлением концентрационного тушения, ограничивающим верхний диапазон линейности концентраций на уровне 10^{-4} М; эффектами внутреннего фильтра — экранирующим эффектом и эффектом реабсорбции.

Эффект экранирования связан с поглощением части возбуждающего излучения посторонними веществами, вследствие чего уменьшается количество фотонов, поглощенных самим люминофором. Это вызывает снижение интенсивности люминесценции последнего. С учетом эффекта экранирования выражение для интенсивности люминесценции при монохроматическом возбуждении имеет вид:

$$I = \varphi_к\ \Phi_0\ (1 - T'\,T)\ A\ /\ (A'+A) \qquad (4.12)$$

где соответственно A, T – оптическая плотность и пропускание люминофора; A', T' – оптическая плотность и пропускание посторонних веществ. Отношение $A/(A'+A)$ показывает долю излучения, поглощенного люминофором.

Под *реабсорбцией* понимают поглощение квантов люминесценции в толще раствора. Испускаемые люминофором фотоны могут поглощаться как самим люминофором, так и молекулами других веществ, присутствующих в растворе. Реабсорбция минимальна при использовании слабопоглощающих растворов и при возбуждении люминесценции при длине волны, соответствующей максимуму поглощения люминофора.

Работа 1

Проверка правила зеркальной симметрии спектров поглощения и флуоресценции рибофлавина

Рибофлавин (витамин B_2, $C_{17}H_{20}N_4O_6$, М.м. 376,37 г/моль) является биологически активным веществом, играющим важную роль в поддержании здоровья человека. Витамин B_2 необходим для образования красных кровяных телец, антител, регуляции роста, нормального функционирования щитовидной железы и репродуктивных органов.

Биологическая роль рибофлавина определяется вхождением его производных — коферментов — флавинмононуклеотида (ФМН), флавинадениндинуклеотида (ФАД) и флавинадениндииуоклеотида в состав большого числа важнейших окислительно-восстановительных ферментов.

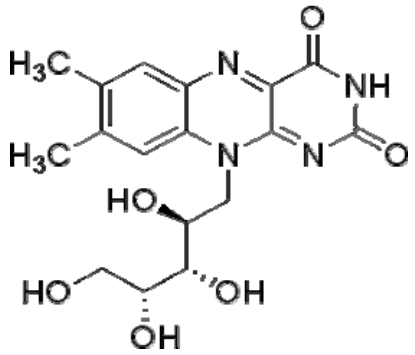


Рис. 4.1. Структурная формула рибофлавина.

Препараты рибофлавина и ФМН применяют для профилактики и лечения недостаточности витамина B_2, при кожных заболеваниях, вяло заживающих ранах, заболеваниях глаз, нарушении функции желудочно-кишечного тракта, диабете, анемиях, циррозе печени.

В данной работе для определения рибофлавина использована его способность флуоресцировать при облучении его раствора электромагнитным излучением с длинами волн 440 – 450 нм.

Реагенты, аппаратура

Стандартный раствор рибофлавина 4 мкг/мл (10 мкМ).

Приготовление: точную навеску 0.0100 г стандартного образца рибофлавина растворяют в 90-100 мл 1%-ного

раствора уксусной кислоты в мерной колбе ёмкостью 250,0 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят объем раствора до метки раствором 1%-ной уксусной кислоты и перемешивают. 1 мл раствора стандартного образца содержит 0,00004 г рибофлавина. Раствор устойчив в течение 1 месяца при хранении в темном месте. Раствор с концентрацией 4 мкг/мл готовят разбавлением исходного стандартного раствора водой.

Спектрофлуориметр.

Кварцевые кюветы, *l* = 1 см.

Выполнение определения. Измеряют интенсивность флуоресценции стандартного раствора рибофлавина в диапазоне длин волн 450 – 650 нм и определяют положение $\lambda_{макс}$ флуоресценции.

Используя результаты измерений, выполненных в п. 1. и данные спектра поглощения рибофлавина, представленные в табл. 4.1, на одном графике строят нормализованные спектры поглощения (в координатах ε/ν — ν) и флуоресценции (в координатах I/ν^4 — ν) рибофлавина.

Таблица 4.1. Спектр поглощения рибофлавина (*c* = 12,5 мкг/мл=33 мкМ, *l* = 1 см)

λ, нм	400	410	420	430	435	440	445	450
A	0,296	0,302	0,327	0,352	0,363	0,371	0,375	0,367
λ, нм	455	460	465	470	480	490	500	510
A	0,351	0,333	0,313	0,288	0,214	0,125	0,060	0,031

По точке пересечения обоих спектров определяют значение ν_0.

Проверяют выполнение правила зеркальной симметрии, построив график зависимости $\Delta\nu = \nu_a - \nu_f$ от ν_a. Если при этом получится прямая с тангенсом угла наклона ~ 2, то правило зеркальной симметрии соблюдается.

Работа 2

Флуориметрическое определение рибофлавина в инъекционных растворах

Цель данной работы состоит в определении концентрации рибофлавина в его инъекционном растворе методом флуориметрии. Для выполнения определения необходимо выбрать длины волн возбуждающего и регистрируемого излучений и соответствующие светофильтры, построить градуировочный график и с его помощью определить содержание рибофлавина в анализируемом растворе.

Реагенты, аппаратура, посуда

Стандартный раствор рибофлавина 12,5 мкг/мл.
Раствор рибофлавина мононуклеотида в инъекциях (ампулы).
Анализатор жидкости «Флюорат-02-03М».
Набор светофильтров.
Кварцевые кюветы, *l* = 1 см.
Мерные колбы ёмкостью 25,0 и 200,0 мл.
Пипетки, 1,00; 2,00 и 5,00 мл.

Выполнение определения. 1). Выбор светофильтров. На основании спектров поглощения (табл. 4.1) и флуоресценции (*работа 1*) выбирают оптимальные длины волн возбуждения флуоресценции и регистрации флуоресценции. Используя данные табл. 4.2, выбирают оптимальные светофильтры для канала возбуждения и регистрации флуоресценции и устанавливают их в анализатор.

Таблица 4.2. Характеристики светофильтров для каналов возбуждения и регистрации флуоресценции

Марка светофильтра	Максимум пропускания, нм	Полоса пропускания, нм
1	266	240-280
3	316	300-340
7	380	360-390
В2-1	440	380-500
В2-2	540	500-620

2) Построение градуировочного графика. В пяти мерных колбах ёмкостью 25,0 мл готовят серию растворов рибофлавина с содержанием (мкг/мл): 0,25; 0,50; 0,75, 1,0. Следует уделить особое внимание чистоте используемой посуды и кювет. Мерные колбы тщательно промывают раствором соды, а кюветы — концентрированной соляной кислотой (*под тягой*), после чего многократно ополаскивают их водопроводной и два раза дистиллированной водой.

Измеряют интенсивность флуоресценции контрольного опыта (дистиллированная вода) и растворов стандартной серии в порядке увеличения концентрации люминофора (длина оптического пути – 1 см). По полученным данным строят градуировочный график в координатах интенсивность флуоресценции (I) — концентрация рибофлавина, мкг/мл.

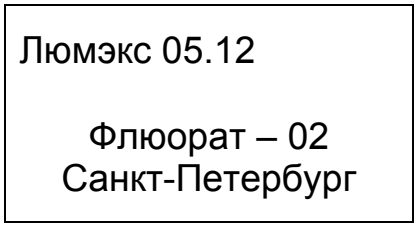
3) Определение содержания рибофлавина в инъекции. Ампулу с инъекцией рибофлавина аккуратно вскрывают и содержащийся в ней раствор количественно (смывая раствор со стенок ампулы не менее 7 раз дистиллированной водой) переносят в колбу ёмкостью 200,0 мл, разбавляют до метки и перемешивают. Далее 0,50 мл полученного раствора переносят в колбу ёмкостью 25,0 мл, разбавляют до метки и перемешивают.

Содержание рибофлавина в анализируемом растворе находят по градуировочному графику, измерив интенсивность его флуоресценции. Рассчитывают общее содержание рибофлавина в инъекции и сравнивают его с паспортными данными.

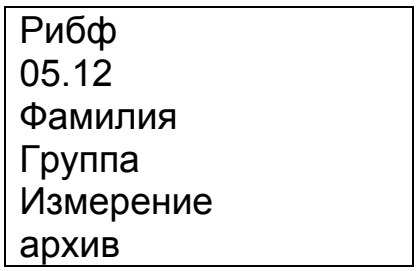
4) Оценка предела обнаружения рибофлавина. Проводят 10 измерений флуоресценции раствора контрольного опыта. Предел обнаружения (c_{min}) методики определения рибофлавина рассчитывают по 3S-критерию: $c_{\min} = \frac{3s_0}{S}$, где s_0 — стандартное отклонение для контрольного опыта (n=10), S – среднее значение крутизны градуировочного графика. Величину предела обнаружения выражают в мкг/мл и моль/л.

Работа на анализаторе «Флюорат-02-3М»

1. Включите анализатор тумблером «Сеть». На дисплее появляется заставка.

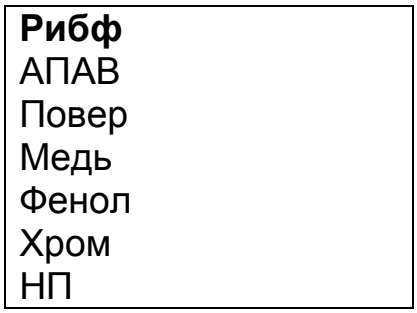


2. Сбросьте ее нажатием любой клавиши. Анализатор перейдет в «**Основное меню**» для того вещества, которое определяли последним перед выключением прибора.



3. Установите светофильтры в каналы возбуждения и регистрации согласно методике выполнения измерений.

4. Для вхождения в список определяемых веществ переведите курсор на левую верхнюю позицию «Основного меню» и, нажав клавишу «Ent», войдите в меню «**Список веществ**». Установите на свободную позицию и наберите нужное название вещества (**рибф**). Если название определяемого вещества уже внесено в меню, этот пункт пропустите.



5. Перейдите в меню «**Выбор метода**». Для этого установите курсор на названии вещества и нажмите клавишу «Ent». Далее перейдите в меню «**Методы измерения**» нажатием клавиши «Ent». Выберите метод «Люминесценция». После выбора метода нажатием клавиши «Esc» вернитесь в меню «Выбор метода».

Рибф возб. рег. **Люминесценция** Градуировка	⇒ Ent	Люминесценция Фосфоресценция Хемилюминесценция Фотометрия

6. Для осуществления перехода в меню «**Градуировочная таблица**» установите курсор на пункт «градуировка» и нажмите клавишу «Ent». Выйти из меню можно нажатием клавиш «Esc».

Рибф возб. рег. Люминесценция **Градуировка**	⇒ Ent	C_0 = ,0000 J_0 = ,0000 C_1 = ,0000 J_1 = ,0000 C_2 = ,0000 J_2 = ,0000 C_3 = ,0000 J_3 = ,0000

В этом меню осуществляется градуировка анализатора для каждого конкретного вещества. Введите значения концентраций c_1 – c_5. Далее поместите в кюветное отделение контрольный раствор (дистиллированную воду), плотно закройте крышку кюветного отделения, переведите курсор на J_0 и для измерения интенсивности контрольного раствора с фоновой концентрацией люминофора c_0 нажмите клавишу «Ent». Аналогичным образом измеряют интенсивность флуоресценции растворов стандартной серии, передвигая курсор на соответствующие значения J_x. Результаты измерения флуоресценции в контрольном растворе и растворах стандартной серии записывают в тетрадь. По полученным данным строят градуировочный график в координатах интенсивность флуоресценции (I) — c, концентрация рибофлавина, мкг/мл.

7. Стрелками переведите курсор на c_1 и вручную обнулите эту концентрацию: на табло должно высветиться значение 0,0000. Далее переведите курсор на J_1, установите в кюветное отделение кювету с анализируемым раствором неизвестной концентрации рибофлавина, закройте крышку анализатора, нажмите клавишу «Ent». Запишите показание прибора (J_1) в тетрадь. По построенному градуировочному графику найдите концентрацию рибофлавина в анализируемом растворе.

8. Поместите в кюветное отделение кювету с дистиллированной водой. Повторите операции, описанные в п.

7, для контрольного раствора не менее 10 раз. Используйте полученные результаты для расчета предела обнаружения.

? 📖 *Вопросы для самоконтроля*

1. Что такое люминесценция? Почему при комнатной температуре не все вещества люминесцируют? Поясните, исходя из структуры молекулы рибофлавина, почему она флуоресцирует. Является ли люминесценция равновесным процессом?
2. Как классифицируют методы молекулярной люминесценции? Какой вид люминесценции преимущественно используют в аналитической химии?
3. Что представляет собой спектр возбуждения и что он характеризует?
4. Что такое флуоресценция? Каковы её спектральный состав и длительность свечения?
5. Какие спектры поглощения и флуоресценции называют нормированными? Зависит ли вид спектра флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения?
6. Сформулируйте правило Каши, закон Вавилова и правило Стокса-Ломмеля. Какая из характеристик люминесценции (спектр люминесценции, квантовый и энергетический выходы люминесценции, величина стоксовского смещения) зависит от длины волны возбуждающего света?
7. В каком случае спектры поглощения и флуоресценции зеркально симметричны?
8. Как меняется интенсивность флуоресценции с *а)* понижением температуры; *б)* повышением концентрации люминофора?
9. Что служит источником излучения при возбуждении люминесценции? Почему целесообразнее измерять флуоресценцию под прямым углом к источнику возбуждения? В каких случаях выгоднее использовать другие способы? Почему нельзя долго освещать флуоресцирующие растворы по их анализе?
10. Каковы метрологические характеристики флуориметрического метода анализа? Для решения

каких медицинских задач его используют? Приведите примеры.

[1]; [2]. Кн. 2. Гл. 11. С. 305-328; [5]. Кн. 2. Гл. 5. С. 98-110; [6]. Гл. 5. С. 80-86.