



**Х И М И И Р**

М. ОТТО

**Современные  
методы  
аналитической  
химии  
(в 2-х томах)**

**II том**

Перевод с немецкого  
под редакцией А.В. Гармаша

ТЕХНОСФЕРА  
Москва  
2004

М. Отто

Современные методы аналитической химии (в 2-х томах)

Том II.

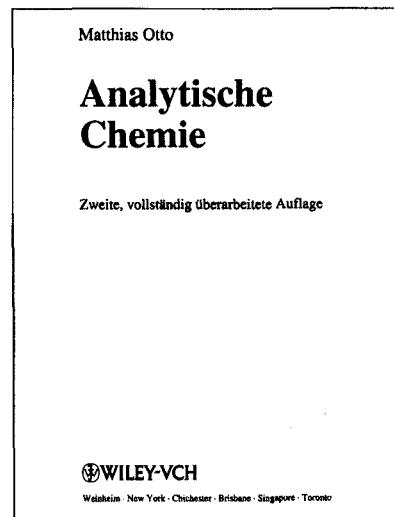
Москва:

Техносфера, 2004. — 288с. ISBN 5-94836-017-2 (т. 2)

ISBN 5-94836-014-8 (рус.)

Во втором томе известного руководства по аналитической химии подробно рассмотрены различные варианты хроматографических методов, современные методы математической обработки результатов химического анализа и наиболее актуальные проблемы аналитической химии — автоматизация анализа, анализ материалов, биологических объектов и объектов окружающей среды.

Книга будет полезна всем, кто по роду своей деятельности связан с проблемами химического анализа, контроля качества продукции, аналитического приборостроения, контроля и охраны окружающей среды.



© 2000 WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469  
Weinheim (Federal Republic of Germany)

© 2004, ЗАО «РИЦ «Техносфера»

перевод на русский язык,  
оригинал-макет, оформление.

**ISBN 5-94836-017-2 (т. 2)**

**ISBN 5-94836-014-8 (рус.)**

**ISBN 3-527-29840-1 (нем.)**

# Содержание

## Глава 5.

<b>Хроматографические и родственные методы .....</b>	<b>8</b>
5.1. Основы процесса хроматографического разделения.....	8
5.2. Газовая хроматография.....	24
5.3. Жидкостная хроматография.....	46
5.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).....	47
5.3.2. Ионная хроматография: классические и высокоэффективные методы .....	70
5.3.3. Гель-хроматография: разделение путем исключения молекул .....	75
5.3.4. Тонкослойная хроматография: плоскостной вариант жидкостной хроматографии .....	81
5.4. Сверхкритическая флюидная хроматография и электрофорез .....	87
5.5. Сочетание хроматографии и спектроскопии.....	102
5.6. Литература .....	110

## Глава 6.

<b>Хемометрика .....</b>	<b>112</b>
6.1. Компьютерно-ориентированные методы обеспечения качества результатов анализа.....	112
6.2. Обработка сигналов: цифровая фильтрация, преобразование данных .....	125
6.3. Многомерные методы: обработка массивов данных.....	133
6.4. Литература .....	147

## Глава 7.

<b>Автоматизация анализа и производственный анализ</b>	<b>149</b>
7.1. Механизация и автоматизация лабораторий .....	149
7.2. Химические сенсоры .....	165
7.3. Автоматизированный контроль производственных процессов.....	191
7.4. Литература .....	203



**Глава 8.**

<b>Специальные вопросы аналитической химии.....</b>	204
8.1. Анализ объектов окружающей среды .....	204
8.2. Анализ материалов .....	213
8.3. Ферментативные и иммунохимические методы.....	226
8.4. Обеспечение качества результатов анализа и «Хорошая лабораторная практика» .....	239
8.5. Литература .....	246

**Глава 9.**

<b>Последние достижения в развитии методов аналитической химии.....</b>	247
9.1. Плоскостная хроматография .....	247
9.2. Сверхкритическая флюидная хроматография .....	249
9.3. Жидкостная хроматография.....	250
9.4. Газовая хроматография.....	252
9.5. Атомная спектроскопия.....	253
9.6. Оптоволоконные химические сенсоры и биосенсоры .....	254
9.7. Твердофазная спектроскопия ЯМР .....	256
9.8. Рентгеновская спектроскопия .....	257
9.9. Термические методы анализа .....	258
9.10. Хемометрика .....	259
<b>Приложение.....</b>	261
<b>Предметный указатель .....</b>	276

# ГЛАВА 5

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И РОДСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ

### 5.1. Основы процесса хроматографического разделения

В разделе 2.6, посвященном теоретическим основам равновесий распределения и ионного обмена, мы уже обсуждали возможности использования различных методов для разделения веществ. Вполне очевидно, что эффективного разделения близких по свойствам веществ можно достичь только с помощью многократно повторяемых процессов разделения. Один из таких приемов — многоступенчатый процесс Крейга — удобен лишь для препаративных разделений.

В химическом анализе эффективного многоступенчатого разделения можно достичь с помощью метода хроматографии. По имеющимся оценкам, в настоящее время порядка 60% всех выполняемых в мире анализов проводятся с применением хроматографии.

Метод колоночной хроматографии был предложен в 1906 г. русским ботаником Михаилом Цветом. Используя колонку, заполненную тонкодисперсным порошком карбоната кальция, и петролейный эфир, он сумел разделить окрашенные компоненты (хлорофилл и ксантофилл спирillum спирillum) экстракта листьев растений. При этом он наблюдал на колонке окрашенные зоны компонентов и поэтому назвал метод *хроматографией* (дословно «цветопись» — от греческих слов «хрома» — цвет и «графо» — «пишу»).

#### Общий обзор

В основе хроматографии лежит процесс распределения разделяемых компонентов между двумя несмешивающимися фазами. Процесс вводят в *подвижную фазу*, которой может быть жидкость, газ или сверхкритический флюид. Подвижная фаза движется относительно *неподвижной фазы*, находящейся на колонке или в плоском тонком слое. Различия в силе взаимодействия компонентов пробы с

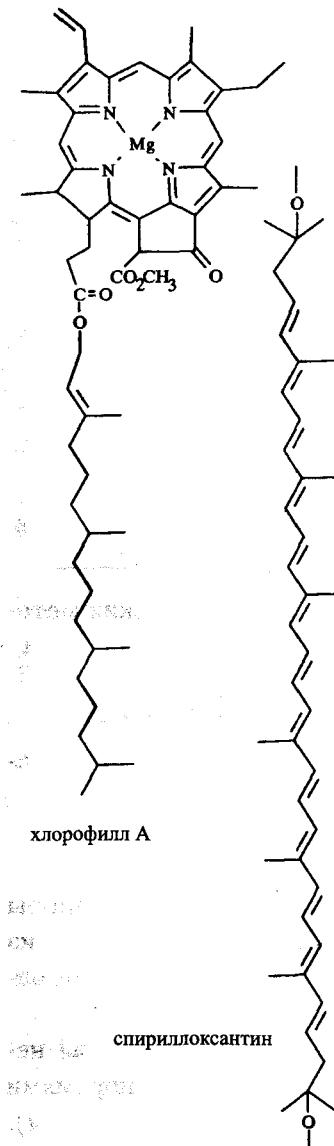
неподвижной фазой приводят к тому, что при достаточно большом времени движения компоненты разделяются.

В зависимости от способа регистрации различают внутренние и внешние хроматограммы. При *внутреннем* способе регистрации компоненты анализируемой смеси за одно и то же время проходят различные расстояния. По окончании процесса разделения все они находятся внутри разделяющего устройства и там детектируются. Этот способ регистрации характерен для *плоскостной* хроматографии — бумажной, тонкослойной (раздел 5.3.4). Здесь неподвижная фаза имеет форму тонкого слоя, вдоль которого подвижная фаза перемещается под действием капиллярных или гравитационных сил.

*Внешние* хроматограммы регистрируют в *колоночной* хроматографии — газовой, жидкостной, флюидной. Здесь все компоненты проходят одно и то же расстояние и регистрируются на выходе из колонки. Ввиду различного сродства компонентов пробы к неподвижной фазе их времена выхода оказываются различными.

В табл. 5.1 приведена классификация методов колоночной хроматографии в соответствии с природой подвижной и неподвижной фаз. Хроматографические методы можно классифицировать и с точки зрения механизма разделения веществ. Два самых важных из них — *распределительный* и *адсорбционный*. Адсорбционная хроматография основана на непосредственном взаимодействии

молекул вещества с поверхностью неподвижной фазы (газотвердофазная, жидкостно-твердофазная хроматография, табл. 5.1). В распределительной хроматографии неподвижной фазой служит жид-



кость, иммобилизованная на твердом носителе (газо-жидкостная, жидкостно-жидкостная хроматография).

Жидкостную хроматографию можно осуществлять как в колоночном, так и в плоскостном вариантах. Оба они основаны на одинаковых физико-химических принципах. Газовая хроматография осуществляется только в колоночном варианте.

**Таблица 5.1.** Классификация методов колоночной хроматографии с точки зрения природы подвижной и неподвижной фаз.

Неподвижная фаза		Подвижная фаза	
<i>Твердая</i>	газовая	флюидная	жидкая
	ГТХ (газо-твердофазная хроматография)	СФХ (сверхкритическая флюидная хроматография)	ЖТХ (жидкостно-твердофазная хроматография)
<i>Жидкая</i>	ГЖХ (газо-жидкостная хроматография)		ЖЖХ (жидкостно-жидкостная хроматография)

Мы рассмотрим теоретические основы хроматографических методов главным образом применительно к *колоночной хроматографии*.

### Получение хроматограмм

В химическом анализе преобладающим способом получения хроматограмм является *элюативный*<sup>1</sup>.

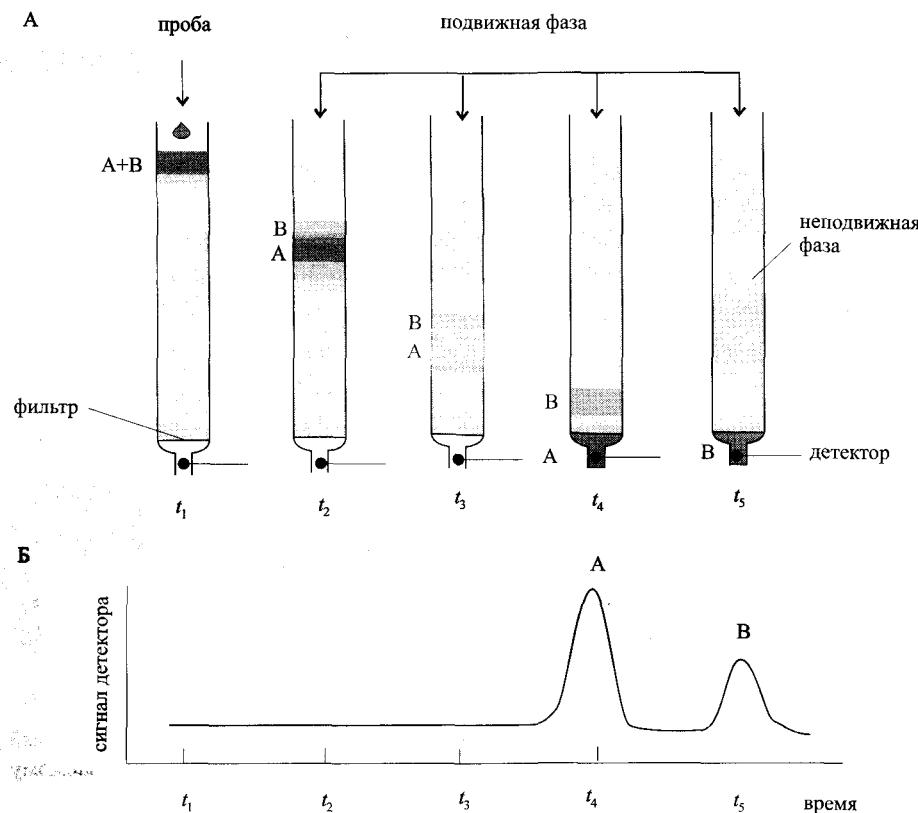
В элюативной хроматографии пробу, растворенную в подвижной фазе, помещают на вершину колонки. Затем через колонку пропускают подвижную фазу до тех пор, пока все компоненты пробы не выйдут из колонки и не будут зарегистрированы на выходе из нее. На рис. 5.1 схематически показан процесс элюативной хроматографии на примере разделения смеси двух веществ А и В.

В ходе хроматографического процесса компоненты пробы непрерывно распределяются между все новыми и новыми порциями неподвижной и подвижной фазы (называемой также *элюентом*).

<sup>1</sup> Помимо элюативного, существуют также *фронтальный* и *вытеснительный* способы. При фронтальном способе раствор пробы непрерывно подают в колонку вплоть до «проскока», т.е. насыщения колонки. Этот способ используют главным образом как способ очистки, например устранения жесткости воды или обезвоживания растворителей.



Средняя скорость движения вещества вдоль колонки определяется силой его взаимодействия с неподвижной фазой. Чем сильнее вещество взаимодействует с неподвижной фазой, тем медленнее оно движется, тем большее время оно находится в колонке. В идеальном случае по истечении некоторого времени вещества полностью разделяются и могут быть раздельно зарегистрированы на выходе из колонки.



**Рис. 5.1.** Разделение двух веществ А и В при помощи элюативной хроматографии. А — формирование внутренней хроматограммы на неподвижной фазе. Б — внешняя хроматограмма, регистрируемая детектором.

Зависимость сигнала детектора от времени называется *хроматограммой*. Если следить за изменениями зон веществ внутри колонки, то в ходе процесса можно наблюдать два эффекта (рис. 5.1). Расстояния между зонами компонентов непрерывно увеличиваются. В то же время сами эти зоны непрерывно уширяются, что снижает эффект разделения. Таким образом, улучшить разделение компо-

нентов можно за счет двух факторов:

- увеличения *различия в скоростях движения зон*;
- уменьшения *ширины зон (хроматографических пиков)*.

Численные величины, характеризующие то и другое явления, будут рассмотрены в следующих разделах.

### Хроматографические параметры

Начнем с величин, характеризующих *скорости движения* веществ в ходе хроматографического процесса. Фундаментальной величиной, характеризующей относительное сродство вещества к подвижной (индекс *M*) и неподвижной (индекс *S*) фазам, является коэффициент распределения (уравнение (2-143)). Он равен отношению равновесных концентраций вещества в неподвижной  $c_S$  и подвижной  $c_M$  фазах:

$$K = \frac{c_S}{c_M}. \quad (5.1)$$

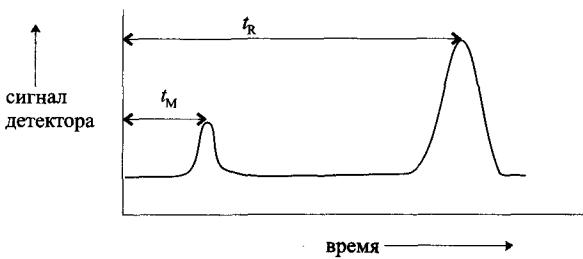


Рис. 5.2. Элюативная хроматограмма двухкомпонентной системы. Первый пик с временем удерживания  $t_M$  соответствует неудерживаемому компоненту.

Это число нельзя «считать» непосредственно из хроматограммы. Непосредственной хроматографической величиной, показывающей относительное сродство вещества к неподвижной и подвижной фазам, является *время удерживания* ( $t_R$ ), т.е. время выхода вещества из колонки. Именно оно отложено по оси абсцисс рис. 5.2. Вернемся к этому рисунку. Первый пик, характеризующийся временем удерживания  $t_M$ , принадлежит веществу, которое вообще не удерживается неподвижной фазой. В этом случае его время удерживания представляет собой чистое время нахождения в подвижной фазе (отсюда индекс *M*) в ходе хроматографического процесса. Фактически

это время, которое затрачивает молекула подвижной фазы на прохождение всего пути вдоль колонки. Оно часто называется «мертвым» временем. Если быть точнее, то мертвое время — это время от момента ввода неудерживаемого компонента до момента его детектирования.

Через времена удерживания можно выразить среднюю скорость движения разделяемого компонента  $\bar{v}$  и скорость движения молекул подвижной фазы  $u$ :

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}, \quad (5.2)$$

$$u = \frac{L}{t_M}, \quad (5.3)$$

где  $L$  — длина колонки.

Времена удерживания непосредственно связаны с коэффициентами распределения. Неудерживаемый компонент все время находится только в подвижной фазе. Вещества, взаимодействующие с неподвижной фазой, проводят в подвижной фазе только часть времени. Эта часть равна отношению массы вещества в подвижной фазе к общей массе вещества в колонке. Таким образом,

$$\bar{v} = u \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_S V_S} = u \frac{1}{1 + \frac{c_S V_S}{c_M V_M}}, \quad (5.4)$$

(массы вещества представлены как произведения концентраций на объемы соответствующих фаз).

*Разность между общим временем удерживания и мертвым временем называется исправленным временем удерживания:*

$$t'_R = t_R - t_M.$$

Подставляя в соотношение (5.4) выражение коэффициента распределения  $K$ , получаем следующую зависимость средней скорости движения вещества от его коэффициента распределения:

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + K \frac{V_S}{V_M}}. \quad (5.5)$$

Отношение объемов фаз  $\beta = V_M/V_S$  называется *фазовым отношением*. С его помощью можно выразить важнейшую характеристику удерживания вещества при заданных условиях эксперимента —

коэффициент емкости  $k'$ :

$$k' = K \frac{V_S}{V_M} \quad \text{или} \quad k' = \frac{K}{\beta}. \quad (5.6)$$

Подставив выражение (5.6) в (5.5), получим соотношение

$$\bar{v} = u \frac{1}{1 + k'}. \quad (5.7)$$

В свою очередь, подставив это выражение в соотношения (5.2) и (5.3) и сократив на  $L$ , получим:

$$\frac{1}{t_R} = \frac{1}{t_M} \frac{1}{1 + k'}. \quad (5.8)$$

Таким образом, коэффициент емкости непосредственно связан с исправленным временем удерживания:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}. \quad (5.9)$$

Величину коэффициента емкости можно легко рассчитать из хроматографических данных по времени удерживания компонента и мертвому времени (рис. 5.2). Оптимальный для практических целей диапазон коэффициентов емкости находится между 1 и 5. При слишком малых значениях  $k'$  компоненты слишком быстро вымываются из колонки и потому плохо разделяются. Слишком большие величины коэффициентов емкости означают большую длительность хроматографического разделения.

Общей характеристикой степени разделения двух веществ (раздел 2.6) служит коэффициент разделения, представляющий собой отношение их коэффициентов распределения (уравнение (2.155)). В хроматографии коэффициент разделения называется *коэффициентом селективности* и обозначается  $\alpha$ . Для двух веществ А и В

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}. \quad (5.10)$$

Легко видеть (уравнение (5.6)), что коэффициент селективности равен отношению двух коэффициентов емкости:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}. \quad (5.11)$$

Коэффициенты емкости и селективности используют для расчета величин, которые характеризуют степень разрешения двух хроматографических пиков. Они будут рассмотрены далее.

Из экспериментальных хроматографических данных можно рассчитать коэффициент селективности как отношение исправленных времен удерживания:

$$\alpha = \frac{(t'_R)_B}{(t'_R)_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}.$$

## Теория хроматографии: описание эффективности колонки

Теперь рассмотрим второй из отмеченных эффектов — *широкие пико* в ходе хроматографического процесса. Ширина хроматографического пика непосредственно характеризует *эффективность колонки*, т.е. ее разделяющую способность. Связь между шириной пика и эффективностью колонки описывает классическая теория хроматографии.

### Классическая теория хроматографии

*Классическая теория хроматографии* трактует хроматографический процесс как серию последовательных однократных актов разделения (см. раздел 2.6). Создатели этой теории Мартин и Синдж (Нобелевская премия 1952 г.) ввели понятие *высоты, эквивалентной теоретической тарелке* (ВЭТТ) и *числа теоретических тарелок*. Под теоретической тарелкой понимается условный участок колонки, в пределах которого устанавливается равновесие частиц хроматографируемого вещества между подвижной и неподвижной фазами. Движение вещества вдоль колонки можно представить как последовательный его перенос с одной теоретической тарелки на другую.

Число теоретических тарелок  $N$  равно отношению длины колонки к высоте, эквивалентной теоретической тарелке  $H$ :

$$N = \frac{L}{H}. \quad (5.12)$$

Высота, эквивалентная теоретической тарелке  $H$ , непосредственно связана с дисперсией пика в колонке  $\sigma^2$ , выраженной в единицах длины ( $\sigma_L^2$ ) или времени ( $\sigma_t^2$ ):

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L}, \quad \text{или} \quad (5.13)$$

$$H = \frac{\sigma_t^2 L}{t_R^2}. \quad (5.14)$$

При обоих способах вычисления  $H$  имеет размерность длины. Чем меньше ВЭТТ, тем выше эффективность колонки, тем лучшее разрешение пиков может быть достигнуто.

Число теоретических тарелок можно легко рассчитать непосредственно из хроматограммы. Для этого сначала пик (имеющий обычную форму, близкую к гауссовой кривой) аппроксимируют треугольником, продолжают его боковые стороны до пересечения с базовой линией и измеряют ширину пика у основания  $w$  (рис. 5.3).

Можно показать, что для пика гауссовой формы справедливо приближенное равенство  $w = 4\sigma_t$ . Подставив его в выражение (5.14), получим:

$$H = \frac{w^2 L}{16 t_R^2}. \quad (5.15)$$

Отсюда число теоретических тарелок равно

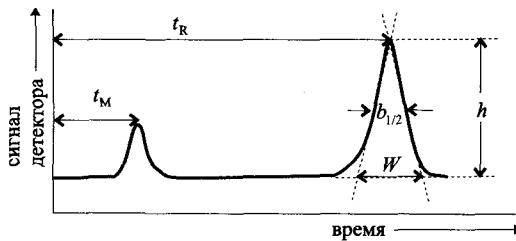


Рис. 5.3. Оценка стандартного отклонения пика  $\sigma_t$  по его ширине у основания  $w$  ( $w = 4\sigma_t$ ) или по ширине  $b_{1/2}$  на половине высоты  $h$ .

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2. \quad (5.16)$$

Таким образом, эту величину можно рассчитать непосредственно из хроматограммы, измерив время удерживания  $t_R$  и ширину пика у основания  $w$ . Более точные результаты часто дает другой способ расчета — с использованием ширины пика на половине его высоты  $b_{1/2}$ :

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{b_{1/2}} \right)^2. \quad (5.17)$$

Высота, эквивалентная теоретической тарелке, и число теоретических тарелок — общепринятые характеристики эффективности хроматографического разделения. В то же время понятно, что классическая теория тарелок есть лишь приближенная модель явлений, реально происходящих в колонке. На самом деле хроматографический процесс является не периодическим, а непрерывным, а состояние равновесия между фазами, как правило, не достигается. Для сравнения эффективности различных колонок следует рассчитывать ВЭТТ в как можно более близких экспериментальных условиях — по крайней мере, с использованием пиков одного и того же вещества.

## Кинетическая теория хроматографии

Уширение хроматографических пиков обусловлено *кинетическими явлениями*, в частности, ограниченной скоростью процессов массо-переноса в колонке. Величина уширения зависит от скорости движения подвижной фазы.

Рассмотрим экспериментальные зависимости ВЭТТ от *линейной* скорости подвижной фазы  $\bar{u}$  (см/с). Типичные зависимости для жидкостной и газовой хроматографии приведены на рис. 5.4. В табл. 5.2 приведены важнейшие величины, влияющие на эффективность колонки.

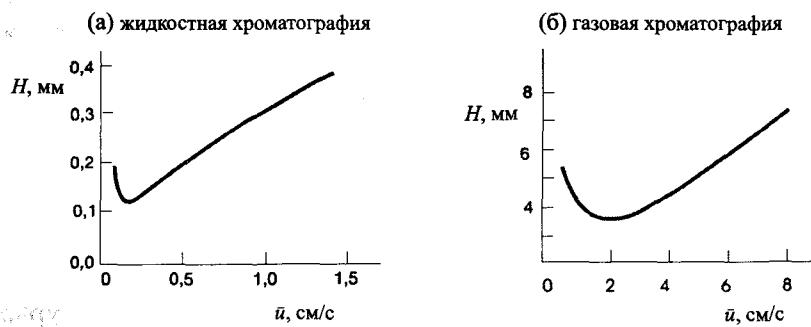


Рис. 5.4. Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке  $H$  от линейной скорости подвижной фазы  $\bar{u}$  для жидкостной (а) и газовой (б) хроматографии.

Как видно из рис. 5.4, в обоих случаях рассматриваемая зависимость имеет вид кривой с минимумом. При этом для жидкостной хроматографии минимум лежит при значительно меньших скоростях подвижной фазы, чем для газовой. Столь малые скорости в реальных хроматографических разделениях обычно не используются. Величины ВЭТТ в жидкостной хроматографии также значительно меньше, чем в газовой. Однако в жидкостной хроматографии обычно применяют значительно более короткие колонки (не более 25–50 см из-за ограничений, вызванных необходимостью работы при высоких давлениях), чем в газовой (до 50 м), поэтому числа теоретических тарелок в обоих методах оказываются сопоставимыми.

Для математического описания зависимости  $H$  от  $\bar{u}$  было предложено много различных моделей. Самая ранняя из них, первоначально разработанная для описания технологических процессов и впоследствии примененная к хроматографии, описывается *уравнением*

нием Ван-Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C\bar{u}. \quad (5.18)$$

Таблица 5.2. Основные величины, влияющие на эффективность колонки.

Величина	Обозначение	Размерность
Линейная скорость потока	$\bar{u}$	$\text{см}\cdot\text{с}^{-1}$
Коэффициент диффузии в подвижной фазе	$D_M$	$\text{см}^2\cdot\text{с}^{-1}$
Коэффициент диффузии в неподвижной фазе	$D_S$	$\text{см}^2\cdot\text{с}^{-1}$
Размер частиц наполнителя колонки	$d_p$	см
Толщина слоя неподвижной жидкой фазы	$d_f$	см
Характерное время десорбции компонента	$t_d$	с
Внутренний диаметр колонки	$d_c$	см

В уравнение Ван-Деемтера входят три константы —  $A$ , характеризующая вихревую диффузию,  $B$ , характеризующая молекулярную (продольную) диффузию, и  $C$ , характеризующая сопротивление массопереносу. Под *вихревой диффузией* понимается неравномерность движения отдельных потоков жидкости в колонке вследствие неравномерности ее заполнения.

Более точная модель зависимости  $H$  от  $\bar{u}$  описывается уравнением

$$H = C_M \sqrt{\bar{u}} + \frac{B}{\bar{u}} + C_S \bar{u}. \quad (5.19)$$

Константы  $B$ ,  $C_M$  и  $C_S$  характеризуют, соответственно, молекулярную диффузию и сопротивление массопереносу в подвижной и неподвижной фазах. Вклад отдельных слагаемых в общую величину  $H$  более подробно рассмотрен в табл. 5.3 и проиллюстрирован на рис. 5.5.

Уравнение (5.19), как и уравнение Ван-Деемтера (5.18), описывает кривую с минимумом, соответствующим некоторой оптимальной скорости потока подвижной фазы. Слагаемое с коэффициентом  $B$  характеризует вклад молекулярной диффузии, т.е. диффузии отдельных частиц компонента от максимума его пика в направлении движения подвижной фазы и в противоположном направлении. Это единственное слагаемое, величина которого не зависит от размеров частиц неподвижной фазы. Она пропорциональна коэффициенту диффузии молекул вещества в подвижной фазе и возрастает с уменьшением его молярной массы. В жидкостной хроматографии для реально используемых там скоростей подвижной фазы это слагаемое обычно пренебрежимо мало.

Таблица 5.3. Вклад отдельных кинетических факторов в величину размывания пика. Обозначения см. в табл. 5.2 и в примечании к данной таблице.

Фактор	Член в выражении (5.19)
Молекулярная диффузия	$\frac{B}{\bar{u}} = \frac{2k_D D_m}{\bar{u}}$
Массоперенос в жидкой неподвижной фазе	$C_S \bar{u} = \frac{q k' d_f^2 \bar{u}}{(1 + k')^2 D_S}$
Массоперенос в твердой неподвижной фазе	$C_S \bar{u} = \frac{2t_d k' \bar{u}}{(1 + k')^2}$
Массоперенос в подвижной фазе	$C_M \sqrt{\bar{u}} = \frac{f(d_p^2, d_c^2) \sqrt{\bar{u}}}{D_M}$

$k_D, q$  — константы,  $f$  — некоторая функция.



Рис. 5.5. Вклад членов, характеризующих диффузию  $B/\bar{u}$  и массоперенос  $C_M \sqrt{\bar{u}}, C_S \bar{u}$ , в величину ВЭТТ  $H$ .

Член, описывающий процессы *массопереноса в подвижной фазе*  $C_M \sqrt{\bar{u}}$ , характеризует конвективную составляющую размывания пика. Он соответствует члену, описывающему вихревую диффузию в уравнении Ван-Деемтера. Его величина обратно пропорциональна коэффициенту диффузии в подвижной фазе и связана с размером частиц неподвижной фазы и диаметром колонки, как следует из соответствующей формулы табл. 5.3.

Для слагаемого  $C_S \bar{u}$ , характеризующего процессы массопереноса к неподвижной фазе и от нее, следует рассмотреть два случая: один для твердой, другой для иммобилизованной жидкой фазы.

Для жидкой неподвижной фазы преобладающим механизмом разделения является распределительный. В этом случае размывание пиков увеличивается с увеличением толщины слоя иммобилизованной жидкости и уменьшением коэффициентов диффузии в неподвижной

С увеличением линейной скорости подвижной фазы влияние молекулярной диффузии уменьшается, а эффектов массопереноса — увеличивается. Последнее обстоятельство объясняется тем, что для переноса вещества между фазами и установления межфазного равновесия необходимо определенное время. Чем выше скорость подвижной фазы, тем большее расстояние она пройдет за это время.

фазе. Если же неподвижная фаза твердая, то скорость массопереноса определяется скоростью процессов адсорбции и десорбции.

В идеале при хроматографическом разделении всегда стремятся достичь высокой эффективности при малой продолжительности анализа. Это оказывается возможным, если зависимость  $H$  от линейной скорости потока выражается достаточно пологой кривой. В этом случае даже значительное увеличение скорости потока (и, тем самым, сокращение продолжительности анализа) не приводит к существенному увеличению ВЭТТ и потере эффективности. Для уменьшения величин ВЭТТ существуют следующие возможности:

- уменьшение размера частиц и толщины слоя иммобилизованной жидкой неподвижной фазы;
- увеличение однородности размеров частиц неподвижной фазы и упаковки колонки;
- уменьшение внутреннего диаметра колонок;
- использование неподвижных фаз с высокими коэффициентами диффузии и подвижных фаз с низкими коэффициентами диффузии. В газовой хроматографии коэффициенты диффузии в подвижной (газовой) фазе существенно уменьшаются с уменьшением температуры.

Поскольку коэффициенты диффузии для различных молекул различаются, степень уширения пика зависит от молярной массы вещества. Для малых молекул размывание пиков, как правило, меньше.

### Фактор разрешения $R_S$ — мера степени разделения хроматографических пиков

Ранее мы рассмотрели величину коэффициента селективности (уравнение (5.11)) как меру селективности хроматографического разделения двух веществ. Однако коэффициент селективности характеризует только взаимное расположение двух хроматографических пиков (точнее, их максимумов). В то же время степень разделения зависит также от величины размывания пиков, т. е. эффективности колонки.

Обобщающим параметром, характеризующим степень разделения веществ с учетом как селективности, так и эффективности хроматографического процесса, служит *фактор разрешения* (сокращенно называемый просто «разрешением»)  $R_S$ . Для пиков двух

веществ А и В он вычисляется как (см. рис. 5.6)

$$R_S = \frac{\Delta t}{(w_A + w_B)/2} = \frac{t_R^B - t_R^A}{w}. \quad (5.20)$$

(последнее равенство — при условии, что  $w_A \approx w_B = w$ ).

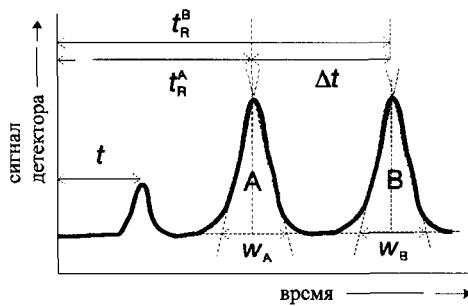


Рис. 5.6. Хроматограмма смеси веществ А и В. Разрешение пиков  $R_S$  может быть рассчитано из данных, приведенных на рисунке, по уравнению (5.20).

Формулу (5.20) можно представить и в другом виде, с использованием величин коэффициентов емкости, коэффициента селективности и числа теоретических тарелок. Для этого сначала подставим в выражение (5.20) ширину пика у основания, выраженную через число теоретических тарелок из (5.16):

$$R_S = \frac{t_R^B - t_R^A}{t_R^B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}. \quad (5.21)$$

Подставим в полученное выражение величины факторов емкости из (5.9):

$$R_S = \frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B} \cdot \frac{\sqrt{N}}{4}. \quad (5.22)$$

Наконец, с использованием коэффициента селективности (уравнение (5.11)) получаем следующую формулу расчета хроматографического разрешения:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \frac{k'_B}{1 + k'_B}. \quad (5.23)$$

Это соотношение часто используют в упрощенном виде в случаях, когда  $k'_A \approx k'_B = k'$ . Тогда  $\alpha \approx 1$  и

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \frac{k'}{1 + k'}. \quad (5.24)$$

Из полученных соотношений можно рассчитать число теоретических тарелок, необходимых для обеспечения требуемого разрешения:

$$N = 16R_S^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2. \quad (5.25)$$

На основе известной взаимосвязи между величинами  $R_S$ ,  $\alpha$ ,  $k'$  и  $N$  (или  $H$ ) можно оптимизировать процесс хроматографического разделения. Многие из упомянутых величин можно варьировать в известной мере независимо друг от друга. Для изменения значений  $\alpha$  и  $k'$  можно изменять температуру (в газовой хроматографии) или природу подвижной фазы (в жидкостной). И в том, и в другом методе для этой же цели можно изменить неподвижную фазу. Увеличить число теоретических тарелок можно путем увеличения длины колонки или уменьшения ВЭТТ  $H$ . Последняя величина, в свою очередь, зависит от скорости потока подвижной фазы, размера частиц неподвижной фазы, вязкости фаз и толщины пленки неподвижной фазы, если она жидккая (см. табл. 5.3).

Для пиков одинаковой высоты и симметричной формы достаточным обычно считается разрешение  $R_S = 1$  (называемое также  $4\sigma$ -разрешением). Легко видеть, что для полного разделения пиков в случае, если они несимметричны или сильно различаются по высоте, требуется большее разрешение.

### Качественный хроматографический анализ

Методы хроматографии можно использовать как для качественного, так и для количественного анализа, а также для препаративного разделения. Особенности препаративной хроматографии будут рассмотрены лишь бегло.

Информацию о *природе вещества* несет положение его зоны в случае внутреннего способа регистрации хроматограмм и время удерживания в случае внешней регистрации. Воспроизводимость всех хроматографических характеристик удерживания вещества обычно значительно ниже, чем, например, величин длин волн в спектроскопических методах. Поэтому для надежной идентификации следует применять относительные характеристики удерживания, рассчитываемые с использованием внутреннего стандарта. Еще более достоверные результаты можно получить при сочетании хроматографического разделения со спектроскопическим детектированием. Например, в газовой хроматографии широко используются массспектрометрические, а в жидкостной — УФ-детекторы на основе диодной линейки.

При выполнении качественного хроматографического анализа следует иметь в виду, что максимальное число хроматографических пиков, разрешенных до базовой линии, которые можно зарегистрировать при определенных условиях хроматографического процесса,

ограничено (рис. 5.7). В элюативной хроматографии максимальное число разрешенных пиков  $n$  можно оценить по следующей формуле:

$$n = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \ln \frac{t_R^n}{t_R^1}, \quad (5.26)$$

где  $t_R^1$  и  $t_R^n$  — времена удерживания первого и последнего компонента, вымываемого из колонки.

Если число компонентов, содержащихся в пробе, превышает максимальное число разрешенных пиков, то наложение двух или более пиков неизбежно. В табл. 5.4 приведены типичные максимальные числа разрешенных пиков для методов газовой, жидкостной и гель-фильтрационной хроматографии (см. также рис. 5.7).

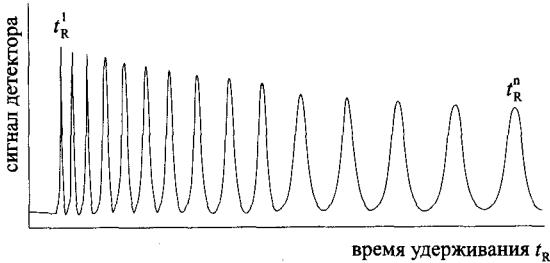


Рис. 5.7. Иллюстрация понятия «максимальное число разрешенных пиков».

Таблица 5.4. Типичные значения максимального числа разрешенных пиков для различных чисел теоретических тарелок в методах газовой, жидкостной и гель-хроматографии (согласно Гиддингсу).

Число теоретических тарелок $N$	Максимальное число пиков $n$		
	гель	газовая	жидкостная
100	3	11	7
400	5	21	13
1000	7	33	20
2500	11	51	31
10000	21	101	61

### Количественный хроматографический анализ

В колоночной хроматографии информацию о *количество* вещества содержит высота или площадь пика. В плоскостной хроматографии (при внутреннем способе регистрации) для определения содержания вещества можно, например, измерить интенсивность окраски зоны ( пятна) компонента. Все хроматографические методы требуют градуировки с использованием образцов сравнения (стандартов). Применяют как внешние, так и внутренние стандарты.

При использовании *высот* пиков следует убедиться, что форма всех пиков определяемого компонента — как для анализируемой пробы, так и для образцов сравнения — одна и та же. В противном случае высота пика не будет прямо пропорциональна концентрации. Все условия эксперимента (температуру колонки, скорость подвижной фазы, объем вводимой пробы и др.) следует строго контролировать. Следует также избегать работы с большими количествами веществ (перегрузка колонки).

При использовании *площадей* пиков возможное изменение их формы (вследствие размывания или других причин) играет меньшую роль, и результаты, как правило, получаются более точными. Сейчас для измерения площадей пиков широко используют компьютерные методы численного интегрирования. Площадь пика можно оценить и вручную как произведение его высоты  $h$  на ширину на половине высоты  $b_{1/2}$  (рис. 5.3). В случае очень узких пиков точность вычисления площадей может значительно ухудшиться.

## 5.2. Газовая хроматография

В методе газовой хроматографии определяемые вещества (при необходимости) испаряют и пропускают через колонку при помощи газа, являющегося подвижной фазой. Как правило, газ выступает только в роли переносчика веществ и никак с ними не взаимодействует. Поэтому в методе газовой хроматографии подвижную фазу называют обычно *газом-носителем*. Неподвижной фазой может служить твердое вещество, адсорбирующее разделяемые вещества. Этот вариант газовой хроматографии называется газо-твердофазной. Он используется главным образом для анализа атмосферного воздуха и будет вкратце рассмотрен в конце раздела. Преобладающим же вариантом газовой хроматографии является газожидкостная (сокращенно называемая просто «газовой»). Она широко используется для определения органических веществ. Основным механизмом разделения в газожидкостной хроматографии является *распределительный*.

### Характеристики удерживания и коэффициенты распределения

В газовой хроматографии любые численные величины, характеризующие удерживание веществ, существенно зависят от условий эксперимента — в первую очередь температуры и давления. Обычно вместо времен удерживания используют *удерживаемые объемы*. Удерживаемый объем равен произведению времени удерживания на

объемную (мл/мин) скорость потока газа-носителя  $F$ . Для удерживаемого объема компонента смеси  $V_R$  и мертвого удерживаемого объема  $V_M$  можно записать:

$$V_R = F \cdot t_R, \quad (5.27)$$

$$V_M = F \cdot t_M. \quad (5.28)$$

Экспериментально величину  $V_M$  можно определить по времени удерживания неудерживаемого газа — воздуха или метана. Основной характеристикой удерживания вещества в газовой хроматографии служит *исправленный удерживаемый объем*  $V'_R$ :

$$V'_R = V_R - V_M. \quad (5.29)$$

Величина исправленного удерживаемого объема вещества связана с его коэффициентом распределения через объем неподвижной фазы:

$$V'_R = K V_S. \quad (5.30)$$

Для того, чтобы обеспечить прохождение газа-носителя через колонку, на входе колонки необходимо создать избыточное давление. Таким образом, в колонке существует перепад давлений. Ввиду сжимаемости газа его объемная скорость вдоль колонки неодинакова: на входе она меньше, чем на выходе. Чтобы сделать значения удерживаемых объемов не зависящими от перепада давления, их следует умножить на коэффициент  $j$ , называемый коэффициентом Мартина:

$$V_N = j \cdot V'_R. \quad (5.31)$$

Коэффициент Мартина вычисляется как

$$j = \frac{3 \left[ \left( \frac{p_i}{p_0} \right)^2 - 1 \right]}{2 \left[ \left( \frac{p_i}{p_0} \right)^3 - 1 \right]},$$

где  $p_i$ ,  $p_0$  — давления газа-носителя на входе и выходе колонки. Величина  $V_N$  называется *чистым удерживаемым объемом*.

Из значения чистого удерживаемого объема можно рассчитать *удельный удерживаемый объем*  $V_g$ :

$$V_g = \frac{V_N}{W_S} \frac{273}{T}, \quad (5.32)$$

где  $W_S$  — масса неподвижной фазы (г), а  $T$  — температура колонки (К). Среди всех характеристик удерживания вещества удельный удерживаемый объем в наименьшей степени зависит от экспериментальных условий. Однако его определение достаточно трудоемко. На практике в качестве характеристик удерживания обычно используют исправленные удерживаемые объемы — абсолютные или, что предпочтительнее, относительные.

### Процессы разделения в газовой фазе

Нам уже известны основные величины, характеризующие эффективность разделения в колонках — число теоретических тарелок  $N$  и высота, эквивалентная теоретической тарелке  $H$ . Особенность газовой хроматографии состоит в том, что на их значения сильно влияет продольная диффузия (слагаемое с коэффициентом  $B$  в уравнении (5.19)). Причиной тому являются высокие величины коэффициентов диффузии в газовой фазе — в  $10^4$  раз большие, чем в жидкой. Зависимость  $H$  от линейной скорости газа-носителя  $\bar{u}$  выражена не очень резко, а минимальные значения  $H$  находятся при довольно больших скоростях потока подвижной фазы.

Чтобы установить, пригодна ли данная колонка для решения данной практической задачи, разумеется, недостаточно только знания характеристик ее эффективности. Необходима еще информация о свойствах разделяемых веществ — в первую очередь их летучести и сродстве к неподвижной фазе.

В соответствии с законом Рауля давление пара вещества над раствором пропорционально давлению его насыщенного пара  $p^0$  и коэффициенту активности в растворе  $\gamma$ . Исходя из этого, Херингтон охарактеризовал разделяющую способность неподвижной жидкой фазы по отношению к двум компонентам 1 и 2 как

$$\lg \frac{V_{g2}}{V_{g1}} = \lg \frac{p_1^0}{p_2^0} + \lg \frac{\gamma_1^0}{\gamma_2^0}. \quad (5.33)$$

Для исправленных времен удерживания можно (приближенно) записать аналогичное выражение

$$\lg \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \lg \frac{p_1^0}{p_2^0} + \lg \frac{\gamma_1}{\gamma_2} \quad \text{или} \quad \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{p_1^0}{p_2^0} \cdot \frac{\gamma_1^0}{\gamma_2^0}. \quad (5.34)$$

Таким образом, возможность разделения компонентов определяется, с одной стороны, их относительными *летучестями* (выраженными в виде отношения давлений их насыщенных паров, завися-

щим от температуры), а с другой — их относительным сродством к неподвижной фазе (отношение коэффициентов активности). Относительное сродство неподвижной фазы к различным компонентам характеризует ее селективность. В настоящее время существует уже свыше 1000 различных неподвижных фаз для газовой хроматографии.

На различиях в давлении насыщенных паров основано разделение близких по химическим свойствам веществ, например членов одного гомологического ряда. Если же температуры кипения веществ близки, то их разделение возможно только на основе различного сродства к ним неподвижной фазы. В этом случае возможно разделить даже компоненты азеотропных смесей, не разделимые простой перегонкой.

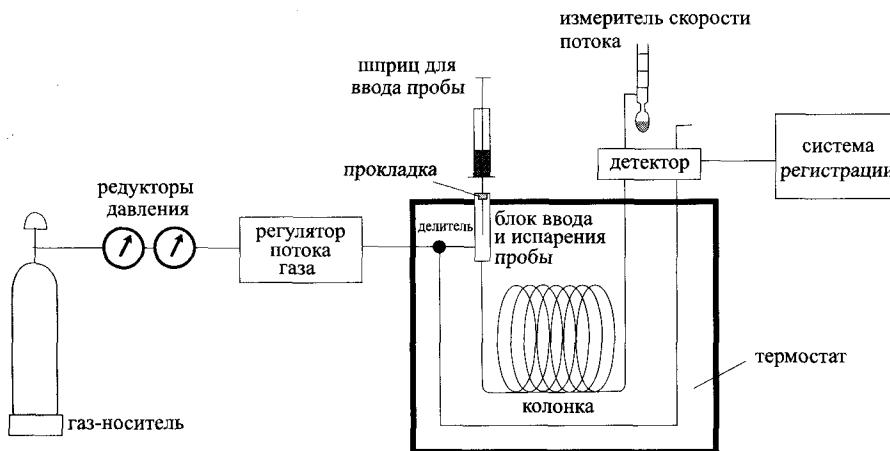


Рис. 5.8. Схема устройства газового хроматографа.

## Устройство газового хроматографа

Основные узлы газового хроматографа схематически изображены на рис. 5.8. Различные модели газовых хроматографов могут отличаться друг от друга с точки зрения природы используемого газа-носителя, особенностей системы ввода пробы, применяемых колонок и детекторов.

### Газы-носители

В качестве газов-носителей применяют химически инертные газы — гелий, аргон, азот, диоксид углерода или водород. Выбор газа-носи-

теля во многом зависит от способа детектирования. Газ-носитель должен быть тщательно обезвожен, для чего его обычно предварительно пропускают через молекулярные сита. Поток газа обеспечивается за счет избыточного давления в газовом баллоне, какие-либо специальные насосы не требуются. Для получения воспроизводимых результатов скорость потока газа следует поддерживать постоянной.

При работе с одной колонкой в *изотермическом* режиме достаточно поддерживать постоянным давление газа на входе при помощи двухступенчатого редуктора. При работе в режиме *программирования температуры* или при переключении колонок необходимо использовать дополнительные средства регулирования газового потока, поскольку при этом сопротивление потоку в процессе работы изменяется. Для измерения скорости потока можно использовать ротаметр на входе в хроматограф или мыльный измеритель скорости на выходе.

Обычно для набивных колонок скорость газа-носителя составляет от 25 до 150, а для капиллярных — 1–25 мл/мин.

### Блок ввода и испарения пробы

При анализе газообразных образцов пробу (объемом до 20 мкл) непосредственно вводят в поток газа-носителя. Жидкие и твердые пробы следует сначала испарить. Для этого служит специальный блок хроматографа, называемый испарителем. Через испаритель, снабженный нагревателем, протекает поток газа-носителя (см. рис. 5.8). От окружающего пространства он изолирован с помощью *прокладки* (обычно из силиконовой резины).

Пробу вводят через прокладку с помощью шприца. Эту операцию следует проделывать как можно быстрее. Медленный ввод пробы приводит к значительному размыванию пиков и трудностям в интерпретации хроматограммы. Для набивных колонок объем вводимой пробы составляет от 0,5 до 20 мкл. Для капиллярных колонок объемы пробы существенно меньше (до 0,001 мкл). Для отбора столь малых объемов используют специальное устройство — делитель газовых потоков. Высококачественная автоматизированная система ввода пробы обеспечивает воспроизводимость величин вводимых объемов до 0,5%.

Температуру испарителя, как правило, задают на 5°C выше, чем температура кипения наименее летучего компонента пробы.

## Колонки и термостаты

Корпус колонки для газовой хроматографии изготавливают из нержавеющей стали, стекла или высокочистого плавленого кварца; последний материал используется все шире. Для предохранения кварцевых колонок от механических повреждений их покрывают снаружи слоем полиимидного материала. Для поддержания постоянной температуры колонок их помещают в термостат. Основными типами колонок являются набивные (насадочные) и капиллярные. *Набивные* колонки заполнены зернистым твердым материалом, поверхность которого покрыта тонким слоем жидкости — неподвижной фазы. Колонку заполняют через воронку. Внутренний диаметр набивных колонок составляет 3–8 мм, длина — до 1–3 м. *Капиллярные* колонки внутри полые. Жидкую неподвижную фазу в этом случае наносят на внутренние стенки. Для этого через колонку медленно пропускают с постоянной скоростью достаточно концентрированный раствор неподвижной фазы либо заполняют ее разбавленным раствором неподвижной фазы, а затем испаряют растворитель в вакууме. Длина капиллярных колонок может составлять до 100 м, а внутренний диаметр — 0,15–1 мм.

Набивные колонки небольшой длины могут иметь прямолинейную или U-образную форму. Более длинные набивные и капиллярные колонки свернуты в спираль с диаметром колец от 10 до 30 см.

Для удаления из колонок остатков растворителя (а также — в газотвердофазной хроматографии — для перевода твердой неподвижной фазы в активное состояние) через заполненную колонку необходимо некоторое время пропускать газ-носитель при повышенной температуре.

## Детекторы

В качестве универсальных детекторов в газовой хроматографии используют детекторы теплопроводности (катарометры) и пламенно-ионизационные детекторы (ПИД). Для детектирования определенных веществ все чаще используют масс-спектрометрические детекторы. Системы детектирования в газовой хроматографии непрерывно совершенствуются с тем, чтобы обеспечить селективное детектирование или снизить пределы обнаружения веществ.

### Детектор теплопроводности (катарометр)

Детектирование по теплопроводности основано на том, что в присутствии определяемых веществ теплопроводность газа-носителя из-

меняется (как правило, уменьшается). Для гелия и водорода — наиболее подходящих для этого способа детектирования газов-носителей — теплопроводность в 6–10 раз выше, чем для большинства органических веществ. Для других газов-носителей эти различия

существенно меньше. Теплопроводность измеряют при помощи термометра сопротивления — нагреваемой электрическим током металлической спиралью, сопротивление которой зависит от температуры окружающей среды (рис. 5.9). Используют две одинаковые измерительные ячейки, включенные в компенсационную электрическую схему измерения сопротивления. Одна из ячеек постоянно омывается потоком чистого газа-носителя, другая — потоком газа на выходе из хроматографа. Сигнал детектора теплопроводности пропорционален концентрации вещества в потоке газа-носителя. Детекторы-катарометры неспецифичны (универсальны), они могут использоваться для детектирования как органических, так и неорганических веществ.

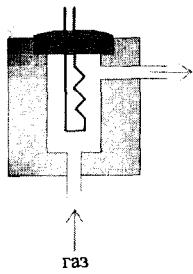


Рис. 5.9. Устройство ячейки детектора теплопроводности.

Таблица 5.5. Основные типы детекторов в газовой хроматографии.

Тип детектора	Детектируемые вещества	Предел обнаружения	Диапазон линейности
Катарометр	универсальный	$10^{-8}$ г/мл	$10^4$
ПИД	органические вещества	$10^{-13}$ г/с	$10^7$
ДЭЗ	соединения с электроотрицательными атомами	$5 \cdot 10^{-14}$ г/с	$5 \cdot 10^4$
Термоионный	P-содержащие N-содержащие	$10^{-15}$ г/с $10^{-14}$ г/с	$10^5$
ПФД	P-содержащие S-содержащие	$3 \cdot 10^{-13}$ г/с $2 \cdot 10^{-11}$ г/с	$10^5$

ПИД — пламенно-ионизационный детектор, ДЭЗ — детектор электронного захвата, ПФД — пламенно-фотометрический детектор.

Как видно из табл. 5.5, чувствительность катарометров ниже, а диапазон линейности — уже, чем у большинства детекторов других типов. Ввиду недостаточной чувствительности детекторы теплопроводности обычно не используют в сочетании с капиллярными

колонками. Достоинством детекторов теплопроводности является то, что в результате детектирования компоненты пробы не разрушаются.

### Пламенно-ионизационный детектор (ПИД)

В настоящее время это самый распространенный тип детекторов. В основе работы таких детекторов лежит увеличение электропроводности водородного пламени, помещенного в электрическое поле, в присутствии органических веществ. Органические вещества, поступающие с потоком газа-носителя из колонки, попадают в водородное пламя и там сгорают. При этом образуются ионы и свободные электроны, например:

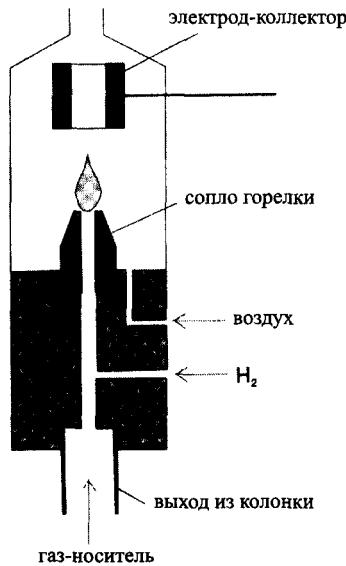


Рис. 5.10. Схема устройства пламенно-ионизационного детектора. Пределами обнаружения и широким диапазоном линейности сигнала (табл. 5.5). В результате детектирования компоненты пробы полностью разрушаются.

Увеличение концентрации ионов приводит к увеличению ионного тока, регистрируемого при помощи электрода-коллектора (рис. 5.10)

Пламенно-ионизационный детектор позволяет детектировать любые вещества, содержащие C—C- или C—H-связи. К веществам, содержащим функциональные группы — карбонильные, спиртовые, аминные, а также атомы галогенов — он менее чувствителен. Негорючие газы — H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, оксиды азота определять с его помощью нельзя.

Сигнал ПИД пропорционален *массе* вещества в единицу времени. Поэтому изменения скорости потока подвижной фазы мало влияют на показания таких детекторов. Пламенно-ионизационные детекторы отличаются очень низкими

### Детектор электронного захвата (ДЭЗ)

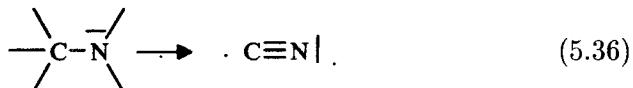
Принцип действия детектора электронного захвата похож на принцип действия газоразрядного счетчика (разделы 3.2.3, 3.6). Газ, вы-

ходящий из колонки, в специальной ячейке с двумя электродами непрерывно облучают потоком  $\beta$ -частиц, испускаемым изотопом  $^{63}\text{Ni}$  или тритием. При этом газ-носитель ионизируется. Вследствие этого в отсутствие определяемых веществ через ячейку протекает ток постоянной силы. Некоторые же органические вещества способны захватывать электроны с образованием стабильных анионов, вследствие чего электронный ток уменьшается. К таким веществам относятся те, которые имеют в своем составе электроотрицательные заместители: галогенпроизводные, хиноны, нитросоединения. Для них ДЭЗ является высокочувствительным селективным детектором. Он очень удобен, в частности, для определения хлорсодержащих пестицидов.

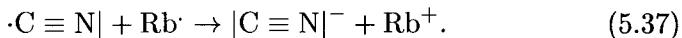
По отношению к большинству других органических соединений — аминам, спиртам, углеводородам — детектор электронного захвата нечувствителен. Характеристики детекторов этого типа приведены в табл. 5.5.

### Специальные типы детекторов

**Термоионный детектор.** Термоионные детекторы высокоселективны к азот- и фосфорсодержащим соединениям (табл. 5.5): по отношению к обоим этим элементам их чувствительность приблизительно в 10 000 раз выше, чем к углероду. По своему устройству термоионные детекторы очень похожи на пламенно-ионизационные. Отличие состоит в том, что горючая смесь в этом случае сильно обеднена водородом и не способна к самостоятельному горению. Ячейка термоионного детектора содержит два электрода. Положительно заряженный электрод является электродом-коллектором. Отрицательно заряженный электрод представляет собой раскаленную платиновую проволоку, на которую помещена капля рубидийсодержащего стекла. Вокруг раскаленного стекла образуется слой плазмы, попадая в который N- и P-содержащие молекулы образуют радикалы:



Затем радикалы реагируют с окружающими их свободными атомами рубидия с образованием ионов:



Образующиеся катионы рубидия притягиваются отрицательно заряженным электродом и вновь оказываются в стекле, а цианид-

анионы (или образующиеся из них в ходе последующих процессов свободные электроны) движутся к электроду-коллектору, создавая электрический ток. Аналогичные явления происходят и с фосфорсодержащими веществами. При этом образуются главным образом радикалы, изображенные на рис. 5.11.



Рис. 5.11. Фосфорсодержащие радикалы, играющие важную роль в процессе термоионного детектирования.

### Спектроскопические детекторы

**Пламенно-фотометрический детектор.** Это самый простой из спектроскопических детекторов в хроматографии. Он используется для селективного детектирования фосфора и серы. Газ, выходящий из колонки, подается в водородно-воздушное пламя. В результате неполного сгорания фосфор- и серосодержащих веществ образуются радикалы, которые возбуждаются и испускают излучение. Для его регистрации используют ФЭУ. Фосфор детектируют при 526 нм, а серу — при 394 нм.

**Атомно-эмиссионный детектор.** Принцип действия этого детектора тот же, что и пламенно-фотометрического. Однако в этом случае в качестве источника атомизации используют не пламя, а гелиевую микроволновую плазму, обладающую значительно более высокой температурой. С его помощью можно селективно определять такие элементы, как N, P, S, C, Si, Hg, Br, Cl, H (в том числе отдельно — D), F, O (см. раздел 3.2.2). Испускаемое излучение регистрируют при помощи фотометра с диодной линейкой в области 170–780 нм.

Точность атомно-эмиссионных детекторов невелика, относительная погрешность составляет от 2 до 20%. Однако их важным достоинством является возможность элементного анализа веществ непосредственно в ходе хроматографического процесса. Особенно высока чувствительность атомно-эмиссионных детекторов к таким элементам, как C, P и S. Диапазон линейности существенно уже, чем, например, для пламенно-ионизационных детекторов.

Возможность определения отдельных элементов особенно важна в случае анализа сложных смесей. Использование таких детекторов, например, позволяет селективно определять спирты в бензине при помощи линии испускания кислорода.

**Масс-спектрометрический детектор.** Непосредственное сочетание хроматографической колонки и масс-спектрометрического детектора возможно при использовании капиллярных колонок ввиду малых скоростей потоков газа-носителя (1–25 мл/мин), применяемых в этом случае. При использовании набивных колонок поток газа-носителя следует предварительно разбавить при помощи специального устройства — *сепаратора*.

Особенности сочетания газохроматографического разделения с масс-спектрометрическим (а также ИК-) детектированием будут отдельно рассмотрены в разделе 5.5.

### Неподвижные фазы для газожидкостной хроматографии

Условиями эффективного разделения является достаточно большое число теоретических тарелок колонки, высокая селективность неподвижной фазы и достаточная ее емкость.

Первоначально в газовой хроматографии использовали исключительно *набивные колонки*, в которых неподвижная фаза находится в виде тонкой пленки на поверхности частиц носителя. Длина набивных колонок обычно не превышает 5 м. Максимально возможная длина набивной колонки — 20 м, после чего перепад давлений газа-носителя становится слишком большим. Число теоретических тарелок для набивных колонок существенно меньше 10 000.

Важным этапом увеличения эффективности в жидкостной хроматографии явилось создание *капиллярных колонок* (1958 г., Голей). В капиллярных колонках неподвижная жидккая фаза находится на внутренней поверхности стенок, поэтому ток газа ничем не затруднен. Капиллярные колонки могут иметь длину свыше 100 м, а число теоретических тарелок — 100 000 и более. Кроме того, для капиллярных колонок отношение объемов подвижной и неподвижной фазы существенно выше, чем для набивных.

### Носители неподвижной фазы

Желательно, чтобы носитель неподвижной фазы состоял из маленьких, однородных, химически инертных, термически и механически устойчивых сферических частиц с удельной поверхностью 0,5–4 м<sup>2</sup>/г. Размер зерен носителя обычно составляет 149–250 мкм (60–100 меш, согласно американской номенклатуре).

Чаще всего в качестве материала для носителя используют *кизельгур* — ископаемый минерал, на 90% состоящий из аморфно-

го кремнезема. Он представляет собой окаменевшие останки древних водорослей. Оболочки их клеток имели развитую систему пор, через которые водоросли получали питательные вещества посредством молекулярной диффузии. Кизельгур, сохранивший эту пористую структуру, является поистине идеальным хроматографическим материалом. В зависимости от удельной поверхности кизельгура доля наносимой на него неподвижной фазы составляет от 5 до 30% по массе.

В качестве носителей неподвижной фазы используют также синтетический кремнезем — силикагель (см. раздел 5.3.1), пористые стеклообразные материалы и органические полимеры (табл. 5.8).

### Капиллярные колонки

Закрепление неподвижной жидкой фазы на внутренней поверхности капиллярных колонок можно осуществить двумя способами — в виде тонкой пленки непосредственно на стенках или в порах твердого материала, нанесенного на стенки колонки и выполняющего функцию носителя. Колонки первого типа называются тонкопленочными, второго — тонкослойными (рис. 5.12). В качестве носителя для тонкослойных колонок чаще всего используют также кизельгур. По сравнению с тонкопленочными тонкослойные колонки обладают большей емкостью, поскольку содержат больше жидкой фазы. Однако их эффективность ниже. По эффективности тонкослойные колонки занимают промежуточное положение между тонкопленочными и набивными.



Рис. 5.12. Типы колонок для газо-жидкостной хроматографии.

Корпуса капиллярных колонок изготавливают почти исключительно из *плавленого кварца* высокой чистоты, по возможности не содержащего примесей оксидов металлов. Некоторые характеристики колонок различных типов приведены в табл. 5.6.

### Дезактивация поверхности колонок

Необработанный носитель или капиллярная колонка всегда содержит на своей поверхности некоторое количество остаточных сила-

нольных групп (рис. 5.13), способных прочно адсорбировать молекулы полярных (например, спиртов) или ароматических соединений. Это приводит к сильному уширению хроматографических пиков и появлению на них длинных «хвостов» вследствие замедленной десорбции.

Таблица 5.6. Характеристики основных типов колонок, используемых в газовой хроматографии.

Характеристика	Набивные	Тонкопленочные	Тонкослойные
Длина, м	1–5	10–100	10–100
Внутренний диаметр, мм	2–4	0,1–0,75	~0,5
Эффективность, т.т./м	500–1000	1000–4000	600–1200
Масса пробы, нг	$10-10^6$	10–1000	10–1000
Перепад давлений	значительный	малый	малый

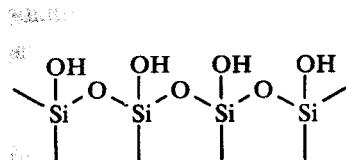
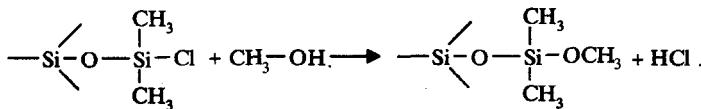
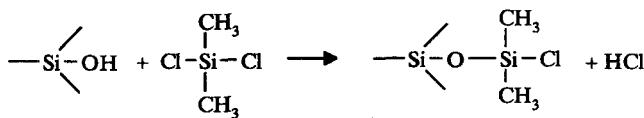


Рис. 5.13. Строение полностью гидролизованной поверхности силикагеля

Для предотвращения этих нежелательных явлений остаточные силанольные группы дезактивируют, прививая к ним ди- или триметилсилильные радикалы. В результате поверхность становится гидрофобной. Пример такой дезактивации — обработка силикагеля дихлорсиланом, а затем метанолом:



Активные центры, остающиеся на поверхности после дезактивации, могут быть обусловлены только наличием примесей оксидов металлов. Кварцевые капиллярные колонки изготавливают из высокочистого кварца, поэтому на их поверхностях активных центров, как правило, не остается.

## Неподвижные жидкые фазы

Жидкости, используемые в газовой хроматографии в качестве неподвижных фаз, должны быть *термически и химически устойчивыми*. Они также должны быть *труднолетучими* во избежание потерь при хроматографировании. Желательно, чтобы температура кипения жидкой фазы была приблизительно на 100°С выше, чем рабочая температура колонки. Жидкая фаза должна быть достаточно *селективной*, т.е. характеризоваться значительным различием в коэффициентах распределения для разных веществ. При этом коэффициенты распределения не должны быть слишком большими или слишком маленькими, поскольку в противном случае времена удерживания будут или столь велики, что анализ станет чрезмерно продолжительным, или столь малы, что разделение веществ окажется невозможным.

При выборе жидкой фазы следует руководствоваться общеизвестным химическим правилом: *подобное растворяется в подобном*.

В соответствии с этим для разделения полярных веществ следует использовать *полярные* жидкые фазы. Они могут содержать функциональные группы  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C=O}$ ,  $-\text{OH}$  или сложноэфирные и характеризуются выраженной селективностью по отношению к полярным веществам: спиртам, органическим кислотам, аминам. *Неполярные* фазы представляют собой углеводороды или силиконовые масла. Они подходят для разделения углеводородов, особенно насыщенных, и их галогенпроизводных. Для разделения веществ средней полярности — простых эфиров, кетонов, альдегидов — можно использовать соответствующим образом модифицированные фазы. В табл. 5.7 приведены основные классы веществ, используемых в качестве неподвижных фаз, указаны их полярности и рабочий диапазон температур. Формулы некоторых представителей этих классов приведены на рис. 5.14.

Особый класс составляют *химически привитые* фазы. Их получают путем закрепления молекул неподвижной фазы на поверхности (частиц носителя или капиллярной колонки) посредством ковалентных связей, образующихся в результате химической реакции. Они характеризуются более высокой термической устойчивостью и не улетучиваются из колонки даже при экстремальных режимах работы.

Универсальным исходным веществом для создания жидких фаз является силикон. Вводя в состав его молекул те или иные заместители, можно получать разнообразные жидкие фазы различной

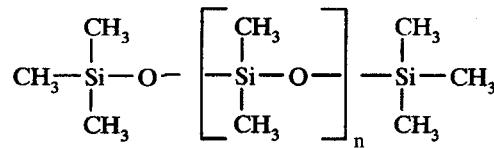
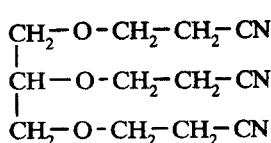
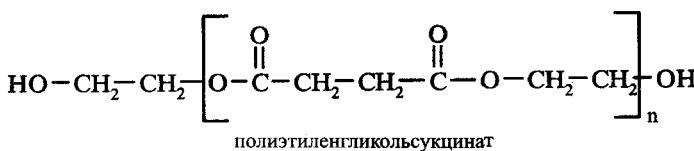
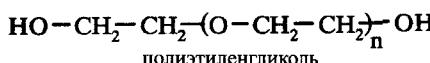
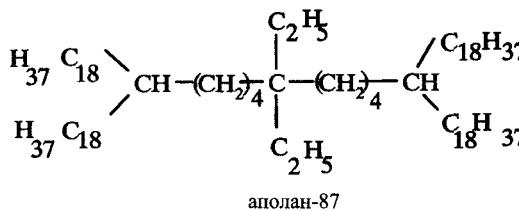
полярности, пригодные для разделения практически любых смесей веществ (см. табл. 5.7).

**Таблица 5.7.** Неподвижные жидкые фазы для газовой хроматографии (формулы некоторых представителей — на рис. 5.14).

Класс веществ	Представитель	Рабочий диапазон температур	Полярность
Углеводороды	сквалан	20–150	неполярный
	аполан-87	50–300	неполярный
Полигликоли	полиэтиленгликоль (карбовакс)	50–225	полярный
Сложные эфиры	полиэтиленгликоль-сукцинат	100–200	сильно полярный
	дизодециладипинат	20–125	средней полярности
Азотсодержащие соединения	1,2,3-три(2-цианоэтокси)пропан	110–200	полярный
Силиконы	метилсиликон (OV-1, SE-30)	200–300	неполярный
	фенилсиликон (OV-22)		средней полярности
	нитрилсиликоновое масло (OE-4178)		сильно полярный

В то же время выбор неподвижной фазы для решения конкретной практической задачи осложняется наличием многообразных видов взаимодействий между молекулами неподвижной фазы и разделяемых веществ. Перечислим основные из таких типов взаимодействий:

- неспецифические *дисперсионные* взаимодействия, характерные для неполярных молекул (алканы, бензол);
- *ориентационные* взаимодействия между молекулами, обладающими постоянными дипольными моментами (в частности, с образованием водородных связей);
- *индуцированные* взаимодействия между постоянным и наведенным диполями;
- химические взаимодействия с образованием комплексов с *переносом заряда*, например, между ароматическим кольцом и ионом металла.



### 1,2,3-трис(2-цианоэтокси)пропан

## ПОЛИДИМИТИЛСИЛИКОН

Рис. 5.14. Формулы некоторых веществ, используемых в качестве неподвижных жидкых фаз (см. табл. 5.7)

Для количественного описания этих типов взаимодействий Роршнайдер и, позднее, Мак-Рейнольдс предложили использовать хроматографические данные, полученные для стандартного набора веществ (бензол, этанол, бутанон, нитрометан, пиридин). Ими же был предложен алгоритм целенаправленного выбора неподвижной фазы на основе этих данных. В его основе лежит система особых индексов удерживания и набор численных значений — аддитивных инкрементов для различных функциональных групп и других структурных фрагментов.

## Применение газожидкостной хроматографии

Газовую хроматографию можно применять исключительно для разделения. Это бывает необходимо для оценки чистоты веществ, а также препаративного выделения отдельных компонентов из смесей. Однако химика-аналитика интересует в первую очередь при-

менение хроматографии в качестве метода качественного и количественного анализа.

### Качественный газохроматографический анализ

Качественную информацию о природе вещества несут в себе хроматографические характеристики удерживания, например исправленный удерживаемый объем или исправленное время удерживания (см. раздел 5.1). Как и в других методах, для надежной идентификации целесообразно сравнить характеристики неизвестного вещества и вещества предполагаемого состава (если таковое имеется в распоряжении), полученные в одинаковых условиях.

Последнее замечание весьма существенно, поскольку параметры хроматографического удерживания очень сильно зависят от условий эксперимента. К таким условиям, в частности, относятся:

- температура колонки;
- скорость потока газа-носителя;
- природа газа-носителя;
- величина перепада давлений в колонке;
- природа и количество неподвижной фазы;
- размеры колонки (длина и внутренний диаметр).

Принципиально возможно исключить влияние некоторых из этих факторов, если использовать значения удельных удерживаемых объемов (уравнение (5.32)). Однако определение этих значений часто требует достаточно длительного и трудоемкого эксперимента. Поэтому вместо абсолютных обычно используют *относительные характеристики удерживания*. Кроме того, для идентификации очень удобно применять спектроскопические методы детектирования, которые сами по себе часто являются источником дополнительной информации о природе и составе вещества. Как правило, для этого используют масс-спектрометрию.

#### Индексы удерживания Ковача

Среди различных шкал относительных характеристик удерживания наиболее распространена система индексов удерживания, предложенная Ковачем в 1958 г. В основе этой системы лежит тот факт, что в гомологическом ряду нормальных алканов зависимость между

логарифмом исправленного времени удерживания и числом углеродных атомов можно с высокой точностью описать *линейной функцией*. Используя эту зависимость, можно приписать любому веществу некоторую величину, называемую *индексом удерживания I*, согласно следующему правилу.

*Индексом удерживания данного вещества называется число, в 100 раз превышающее число атомов углерода (возможно, нецелочисленное) гипотетического n-алкана, обладающего тем же временем удерживания.*

Согласно этому определению, для любого нормального алкана при любой температуре и на любой колонке индекс удерживания в 100 раз превышает число его атомов углерода. Так, индекс удерживания n-гексана в любых условиях по определению равен 600, n-октана — 800 и т.д.

Для расчета индекса удерживания исследуемое вещество подвергают хроматографическому анализу в смеси, содержащей по крайней мере два нормальных алканы. При этом необходимо, чтобы время удерживания вещества находилось между временами удерживания алканов.

Пусть n-алканы содержат, соответственно, z и z+y атомов углерода. Обозначим их исправленные времена удерживания как  $t_{Rz}$  и  $t_{R(z+y)}$ . Исправленное время удерживания исследуемого вещества обозначим как  $t_x$ . Тогда индекс удерживания I вещества x, в соответствии с данным определением, равен

$$I = 100y \left( \frac{\lg t_{Rx} - \lg t_{Rz}}{\lg t_{R(z+y)} - \lg t_{Rz}} \right) + 100z. \quad (5.38)$$

Рис. 5.15 иллюстрирует расчет индекса удерживания для бензола. Исходным источником данных служит приведенная на рисунке хроматограмма смеси бензола с n-пентаном и n-гептаном. Используя величины исправленных времен удерживания (мин)  $t_{R5} = 2,0$ ,  $t_{R(5+2)} = 2,8$  и  $t_{Rx} = 2,56$ , находим индекс удерживания бензола:

$$I = 100 \cdot 2 \left( \frac{\lg 2,56 - \lg 2,0}{\lg 2,8 - \lg 2,0} \right) + 100 \cdot 5 = 640.$$

На рис. 5.16 определение индекса удерживания бензола проиллюстрировано графически.

Индексы удерживания множества веществ при различных условиях эксперимента определены и собраны в *базы данных*. Они мало зависят от температуры колонки.

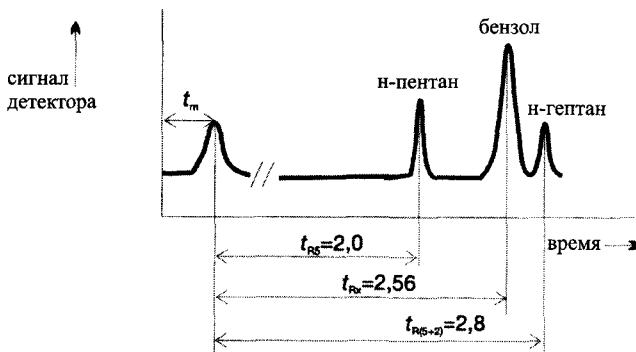


Рис. 5.15. Газохроматографическое определение индекса удерживания Ковача.

### Количественный газохроматографический анализ

В хроматографии мерой концентрации вещества служит высота или площадь хроматографического пика (раздел 5.1). Для получения правильных результатов необходимы:

- полнота и воспроизводимость процесса испарения пробы;
- полнота отделения определяемого вещества и правильность идентификации его пика.

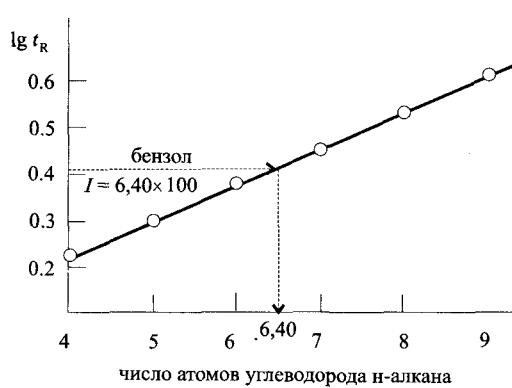


Рис. 5.16. Определение индекса Ковача для бензола при помощи н-алканов. Неподвижная фаза - сквалан, температура колонки  $60^\circ\text{C}$ .

В области линейности отклика детектора как высота, так и площадь пика прямо пропорциональны массе (при использовании детекторов-катарометров — концентрации) определяемого вещества.

## Режимы хроматографического анализа: изотермический и программируемой температуры

Фундаментальной характеристикой вещества, определяющей все его хроматографические параметры удерживания, является коэффициент распределения (уравнение (5.30)). Как и любая константа химического равновесия, он зависит от температуры. Удерживаемый объем, кроме того, зависит от давления насыщенного пара вещества (уравнение (5.34)), также изменяющегося с изменением температуры в соответствии с законом Клаузиуса-Клапейрона:

$$\lg p = -\frac{\Delta_{\text{V}}H}{2,303RT} + \text{const}, \quad (5.39)$$

где  $\Delta_{\text{V}}H$  — парциальная мольная энталпия испарения. Можно показать, что для зависимости скорости движения вещества по колонке от температуры наблюдается такая же логарифмическая зависимость. При повышении температуры скорости движения веществ увеличиваются, а времена удерживания — уменьшаются.

При изотермическом режиме температура колонки поддерживается постоянной в ходе всего процесса разделения. Этот режим является оптимальным для разделения смесей веществ, температуры кипения которых находятся в достаточно узком интервале. Если же они различаются значительно (более чем на 100°C), разделение осложняется. Если поднять температуру колонки слишком высоко, то наиболее летучие компоненты выйдут слишком быстро и плохо разделяются. При более низких температурах, во-первых, значительно увеличится общее время анализа, а, во-вторых, наименее летучие компоненты будут находиться в колонке столь долго, что их пики окажутся очень размытыми.

Эти трудности можно преодолеть, используя режим **программирования температуры**. Он заключается в ступенчатом или непрерывном (как правило, линейном) увеличении температуры колонки по мере протекания хроматографического процесса. Начальная температура выбирается таким образом, чтобы обеспечить оптимальное разделение наиболее легких компонентов. При этом вещества с более высокими температурами кипения будут находиться в начальной части колонки. При повышении температуры они начнут перемещаться по колонке.

На рис. 5.17 приведено сравнение двух хроматограмм одной и той же смеси спиртов, полученных в изотермическом режиме и режиме программирования температуры.

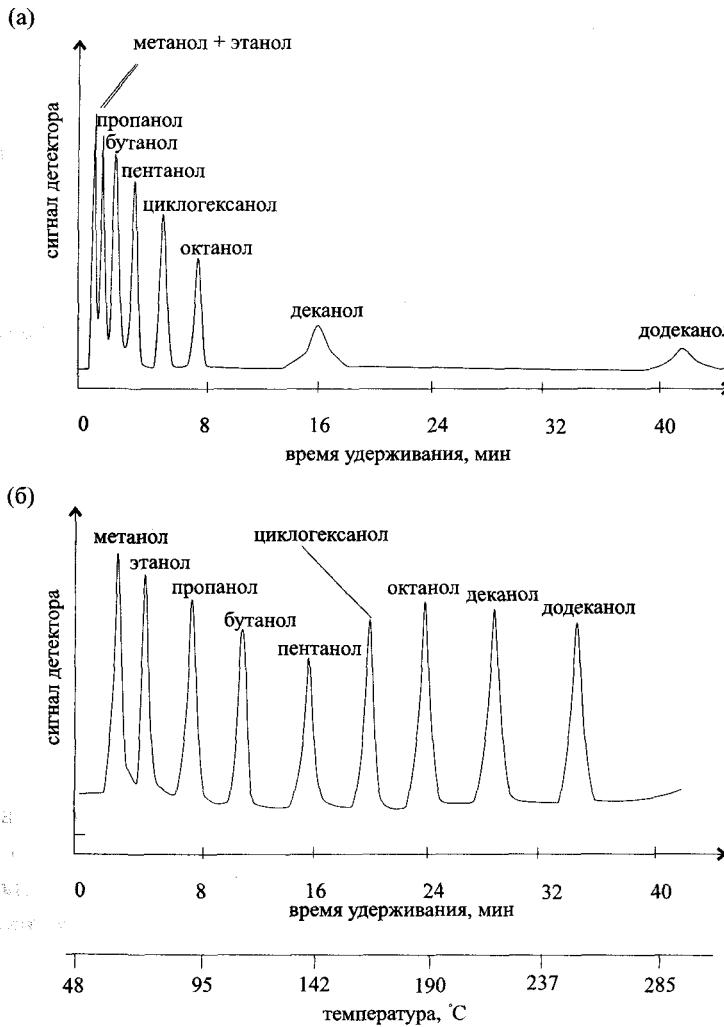


Рис. 5.17. (а) — Газохроматографическое разделение смеси спиртов в изотермическом ( $175^{\circ}\text{C}$ ) режиме, (б) — в режиме программирования температуры.

По сравнению с изотермическим режимом программирования температуры имеет преимущества не только для качественного, но и для количественного анализа. Поскольку при программировании температуры пики различных веществ имеют близкую форму, то и все метрологические характеристики (в первую очередь — пределы обнаружения и погрешности результатов анализа) для различных веществ оказываются близки.

## Понятие о газоадсорбционной хроматографии

Исторически метод адсорбционной хроматографии оказался первым хроматографическим методом. В методе газоадсорбционной (газотвердофазной) хроматографии неподвижной фазой является

твердое тело — адсорбент. Разделение происходит за счет процессов адсорбции—десорбции. В этом методе также можно использовать как набивные, так и капиллярные колонки. В качестве капиллярных колонок можно использовать полые трубы, на внутренней поверхности которой иммобилизованы молекулы адсорбента. Можно использовать и тонкослойные капиллярные колонки, аналогичные применяемым в газожидкостной хроматографии (рис. 5.18).

Рис. 5.18. Типы колонок для газоадсорбционной хроматографии.

адсорбента. Можно использовать и тонкослойные капиллярные колонки, аналогичные применяемым в газожидкостной хроматографии (рис. 5.18).

Газоадсорбционная хроматография перед газожидкостной имеет следующие преимущества:

- более широкий рабочий интервал температур;
- большая устойчивость положения базовой линии (что особенно важно при использовании режима программирования температуры или в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием);
- большая скорость установления равновесия и, как следствие этого, меньшее время анализа.

Однако этот метод имеет и существенные недостатки:

- несимметричная форма пиков вследствие ограниченности линейного участка изотермы адсорбции;
- как правило — большие времена удерживания вследствие высоких значений энталпии адсорбции;
- неоднородность поверхности адсорбента, наличие каталитически активных центров;
- ограниченный выбор и трудность стандартизации неподвижных фаз.



В качестве неподвижных фаз используют различные неорганические адсорбенты — алюмосиликаты (применяются также в молекулярных ситах), сажу, графит, а также пористые органические полимеры, например, сополимер стирола и дивинилбензола (рис. 2.27). Удельная поверхность твердой фазы в газоадсорбционной хроматографии значительно выше, чем в газожидкостной (см. табл. 5.8).

Таблица 5.8. Твердые адсорбенты и наполнители хроматографических колонок.

Класс веществ	Торговое название	Максимальная рабочая температура, °C	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Применение
Кизельгур	CHROMO-SORB A	400	0,5–4	носитель для газожидкостной хроматографии
Силикагель	PORASIL	400	1,5–500	универсальное
Активированный уголь		400	1300	адсорбент, неорганические газы
Сополимер полистирола	CHROMO-SORB B PORAPAK P,Q,T	275 250	50–800 100–600	адсорбент, низкомолекулярные, полярные вещества
Тефлон	CHROMO-SORB T	250	7–8	адсорбент, высокополярные вещества

Особенно большое значение адсорбционная хроматография имеет для разделения и определения низкокипящих газов — водорода, азота, кислорода, метана, оксида и диоксида углерода, инертных газов, а также низкокипящих углеводородов.

### 5.3. Жидкостная хроматография

Жидкостной хроматографией называется хроматографический метод с использованием *жидкой подвижной фазы*. В классическом варианте жидкостной хроматографии, берущем начало с основополагающей работы Цвета (1906 г.), использовали стеклянные колонки с внутренним диаметром от 1 до 5 см и длиной 50–500 см. Частицы наполнителя имели размер 150–200 мкм. При этом скорость потока подвижной фазы составляла не более 1 мл/мин, и разделение часто оказывалось слишком длительным.

Попытки увеличить скорость потока путем использования вакуумных и иных насосов обычно приводили лишь к ухудшению разделения. Этот результат вполне объясним, поскольку из хроматографической теории известно, что увеличение линейной скорости потока подвижной фазы при прочих равных условиях уменьшает число теоретических тарелок. Довольно скоро стало понятно, что увеличения эффективности можно достичь только за счет уменьшения размеров зерен наполнителя. Однако при этом резко возрастает сопротивление потоку жидкости, преодолеть которое можно лишь путем увеличения давления. Работа с тонкодисперсными наполнителями требовала столь высоких давлений, что обычные стеклянные колонки его не выдерживали.

Только в конце 1960-х годов, появились технические возможности создания аппаратуры, позволяющей работать с колонками, заполненными наполнителем с размерами зерен порядка 3–10 мкм. С этого времени *классическая* жидкостная хроматография низкого давления стала применяться, главным образом, для препаративных целей. Аналитическая жидкостная хроматография высокого давления в новом аппаратурном оформлении получила название *высокоэффективной жидкостной хроматографии* (ВЭЖХ). Именно этому варианту жидкостной хроматографии мы и уделим основное внимание.

### 5.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

#### Основные механизмы разделения в жидкостной хроматографии

В жидкостной хроматографии существуют четыре основных механизма разделения веществ:

- *адсорбционный*
- *распределительный*
- *ионообменный*
- *эксклюзионный*

Как мы знаем, первым был реализован адсорбционный механизм в форме *жидкостно-твердофазной хроматографии*. В настоящее время этот вид хроматографии используется для разделения неполярных веществ, пространственных изомеров, а также группового разделения, например, алифатических углеводородов и алифатических спиртов. Распределительный механизм лежит в основе *жидкость-жидкостной хроматографии*. К ней относятся методы *нормально-фазовой* и *обращенно-фазовой хроматографии*. Послед-

ний в настоящее время является одним из самых распространенных аналитических методов вообще. Ионообменная хроматография представляет собой реализацию явления ионного обмена (раздел 2.6) в хроматографическом варианте. Высокоэффективная ионообменная хроматография называется *ионной хроматографией*. Эксклюзационная хроматография основана на молекулярно-ситовом эффекте, т.е. разделении молекул на пористом материале в соответствии с их размерами. Методы эксклюзационной хроматографии обычно называют *гель-хроматографией*.

Как это часто бывает в хроматографии вообще, в большинстве конкретных случаев не представляется возможным выделить какой-то один определенный механизм разделения. Обычно все четыре упомянутых механизма в той или иной степени сопутствуют друг другу.

### Размер частиц носителя

Из кинетической теории хроматографии известно, что высота, эквивалентная теоретической тарелке, зависит от коэффициента сопротивления массопереноса  $C_M$ , который, в свою очередь, прямо пропорционален квадрату размера частиц носителя — наполнителя колонки (табл. 5.3). Уменьшение размеров зерен существенно уменьшает ВЭТТ и увеличивает эффективности колонки.

На рис. 5.19 схематически изображено изменение зависимости ВЭТТ от линейной скорости потока подвижной фазы с изменением размера зерен. Как было отмечено ранее, в жидкостной хроматографии на этих зависимостях реально не наблюдается минимума, поскольку он расположен в области очень низких, не применяемых на практике, скоростей потоков.

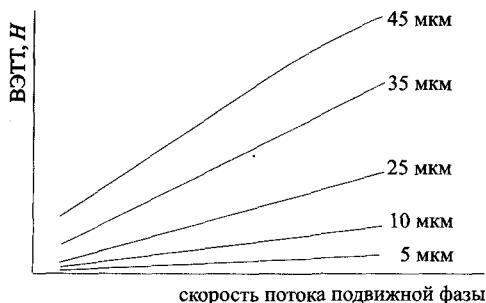


Рис. 5.19. Схематическая иллюстрация влияния размеров зерен носителя в жидкостной хроматографии на высоту, эквивалентную теоретической тарелке  $H$ .

## Аппаратура

Оборудование для классической жидкостной хроматографии состоит из следующих компонентов.

- Резервуар для подвижной фазы. В простейшем случае подвижная фаза подается на вершину колонки по каплям.
- Разделяющая колонка — стеклянная трубка с внутренним диаметром около 1 см и длиной порядка 30 см. Нижняя часть колонки закрыта стеклянным фильтром или слоем стекловаты для удержания наполнителя.
- Шприц или вентиль для ввода раствора пробы.
- Коллектор фракций — набор пробирок, в которые вручную или автоматически последовательно отбирают порции раствора, выходящего из колонки (элюата) объемом несколько миллилитров. Для непрерывной регистрации обычно используется проточный фотометр.

Такое оборудование неприменимо при работе с частицами наполнителя размером 3–10 мкм. В этом случае для обеспечения скорости потока порядка 1 мл/мин необходимо приложить давление не менее 15 МПа. Принципиальная схема высокоеффективного жидкостного хроматографа изображена на рис. 5.20. В его состав входит один или несколько сосудов для растворителей, компонентов подвижной жидкой фазы, система насосов, устройство ввода пробы, возможно, предколонка, разделяющая колонка и детектор. Для уменьшения размывания пиков мертвый объем жидкостной системы (особенно для устройства ввода и детектора) должен быть как можно меньше.

### Подвижные фазы

Растворители и растворы — компоненты подвижной фазы — хранятся в сосудах из стекла или нержавеющей стали. Из жидкостей необходимо тщательно удалить растворенные газы (которые могут образовывать пузырьки и тем самым нарушать работу детекторов) и взвешенные частицы. Для удаления твердых частиц растворы предварительно фильтруют под вакуумом через микропористый фильтр. Растворенные газы (кислород, азот) удаляют, продувая жидкость гелием (который практически нерастворим в воде и других растворителях) или путем ультразвуковой обработки.

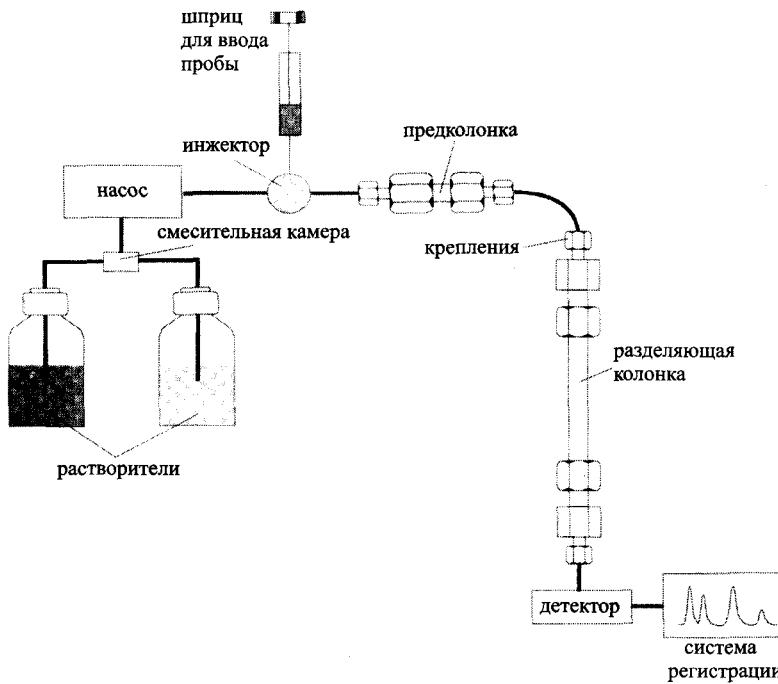


Рис. 5.20. Схема устройства высокоеффективного жидкостного хроматографа с предколонкой.

В жидкостной хроматографии различают изократический и градиентный режим элюирования. В *изократическом* режиме через колонку непрерывно пропускают подвижную фазу постоянного состава, например, смесь 30% об. метанола и 70% об. воды. Однако разделение часто улучшается при *градиентном* элюировании. В этом случае состав подвижной фазы (элюента) в ходе разделения изменяют согласно специально задаваемой программе. Можно, например, непрерывно изменять полярность элюента, изменения относительные содержания компонентов в водно-метанольной смеси (рис. 5.21). Достигаемый эффект аналогичен тому, который наблюдается при программировании температуры в газовой хроматографии: время анализа сокращается, пики компонентов располагаются на хроматограмме более равномерно, имеют одинаковую форму, а точность определения становится равной для всех компонентов.

### Насосы

К насосам, применяемым в ВЭЖХ, предъявляются следующие требования:

- создание давления не менее 15 МПа;
- как можно меньшие пульсации потока;
- химическая устойчивость конструкционных материалов;
- производительность в пределах 0,1–10 мл/мин;
- высокая воспроизводимость скорости потока (погрешность не более 0,5%).

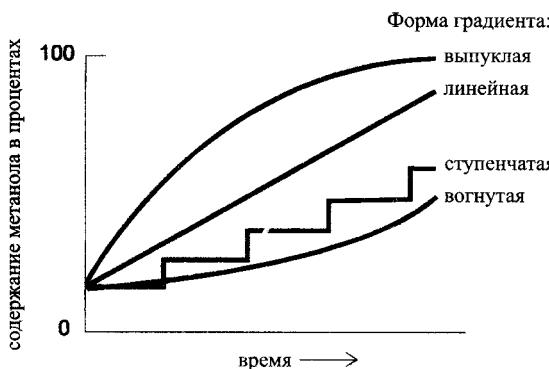


Рис. 5.21. Изменение состава элюента на основе двухкомпонентной системы метанол–вода во времени при градиентном элюировании.

В качестве конструкционных материалов применяют нержавеющую сталь, тefлон, керамику. Для изготовления вентиляй высокого давления используют сапфир. Основными типами насосов являются шприцевые и плунжерные.

Принцип действия *шприцевых насосов* понятен из названия. Они отличаются большой длиной хода поршня. Определенный объем жидкой фазы — порядка 200 мл — засасывают при помощи шприца-поршня и затем без пульсаций подают в жидкостную систему хроматографа. Недостатком шприцевых насосов является необходимость периодической остановки хроматографического процесса для заполнения цилиндра поршня. Обычно шприцевые насосы применяют в миниатюризованных системах с небольшим расходом подвижной фазы.

Преобладающим типом насосов в настоящее время являются *плунжерные* (рис. 5.22). В таких насосах поршень совершают периодические возвратно-поступательные движения с малой длиной хода. Обычно плунжерные насосы объединяют по два, причем поршни обоих насосов работают в противофазе. В этом случае пульсации

скорости подачи подвижной фазы взаимно компенсируются. Существуют плунжерные насосы особой конструкции, так называемые *мембранные*. В них движения поршня при помощи гидравлической системы передаются мемbrane, а непосредственный контакт подвижных деталей насоса с раствором отсутствует.

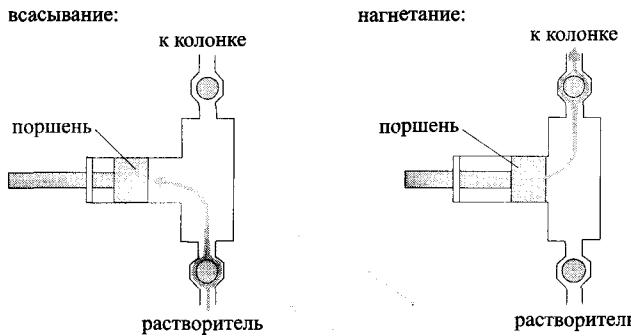


Рис. 5.22. Двухплунжерный насос с шаровыми сапфировыми вентилями.

Достоинствами плунжерных насосов являются малые величины мертвых объемов (40–400 мкл), высокое давление на выходе (до 60 МПа) и постоянство скорости потока независимо от гидравлического со- противления колонки и вязкости растворителя.

Градиент подвижной фазы можно создавать в системе низкого или высокого давления. Формированием градиента в системе *низкого давления* называется способ создания градиента, при котором два или более растворителей смешивают на входе насоса. При создании градиента в системе *высокого давления* каждый растворитель подают при помощи отдельного насоса и смешивают на выходе из насосов. Этот способ позволяет более точно контролировать соотношения компонентов, поскольку предварительное смешение растворителей часто сопряжено со значительными изменениями объема.

### Система ввода пробы

Система ввода пробы должна позволять точно дозировать объемы от 5 до 500 мкл. При этом в процессе ввода давление в системе должно оставаться постоянным. Основным типом устройства для дозирования объема пробы служит *петля инжектора*. Она соединена с двумя выходами шестиходового крана. Раствор вводят в петлю при помощи микрошприца. При этом переключатель шестиходового крана устанавливают в положение, показанное на рис. 5.23 (а); в колонку в это время непрерывно (через выходы 2–3) подается поток

элюента. Затем для ввода отмеренного объема пробы в поток переключатель крана переводят в положение, показанное на рис. 5.23 (б), после чего вновь возвращают его в исходное положение.

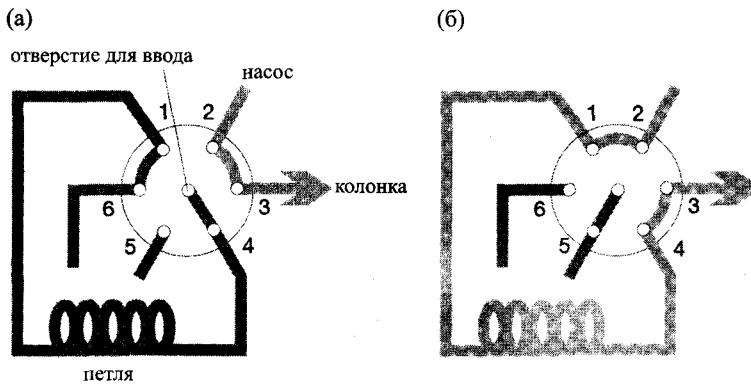


Рис. 5.23. Ввод пробы в колонку при помощи шестиходового крана. (а) — Заполнение петли инжектора, (б) — ввод.

Для повышения точности дозирования используют автоматические системы ввода, работающие от сжатого воздуха.

### Разделяющие колонки

Корпуса разделяющих колонок обычно изготавливают из отполированной нержавеющей стали. Ввиду гладкости внутренней поверхности эффективность колонки возрастает. Применяют и толстостенные стеклянные колонки из специальных сортов стекла (дюран, пирекс). Колонку в виде сменного патрона соединяют с жидкостной системой хроматографа (рис. 5.20). Герметичность соединений обеспечивают при помощи металлических конических шайб. Жидкостные коммуникации представляют собой трубы из нержавеющей стали. Стандартная колонка имеет длину 250 мм и внутренний диаметр 4,6 мм. Она заполнена частицами носителя размером 5 или 10 мкм. При этом число теоретических тарелок достигает 50 000 на метр.

В ВЭЖХ необходимо использовать очень чистые растворители. Для уменьшения их расхода используют микроколонки с внутренним диаметром до 1 мм и длиной 30–75 мм. При заполнении частицами размером 3 мкм эффективность таких колонок может достигать 100 000 теоретических тарелок на метр.

Для предохранения разделяющих колонок, а также для предварительного разделения и, возможно, концентрирования веществ перед

разделяющей колонкой может быть установлена *предколонка*, имеющая обычно внутренний диаметр 4,5 мм и длину порядка 30 мм. Во избежание слишком большого перепада давления предколонку заполняют относительно грубозернистым материалом с размером частиц 10–30 мкм.

Заполнение колонок очень малыми частицами (размером менее 20 мкм) сопряжено с известными трудностями. Такие частицы ввиду высокой поверхностной энергии склонны к накоплению статического электричества и отталкиванию друг от друга. Поэтому заполнение колонки сухим порошкообразным материалом невозможно. Если же для заполнения использовать суспензии, то ввиду процессов седиментации может возникнуть нежелательный градиент размеров частиц по высоте колонки.

Тем не менее использование суспензий является единственно возможным способом заполнения колонок для ВЭЖХ. В обращенно-фазовой хроматографии обычно используют суспензии в метаноле. Очень равномерного заполнения можно достичь при использовании так называемых «взвешенных» суспензий. Это суспензии, в которых плотности твердой и жидкой фаз равны. Для регулирования плотности жидкой фазы используют добавки подходящих растворителей, например, дигромметана.

### Детекторы

В ВЭЖХ используют следующие два основных принципа детектирования.

- Измерение какого-либо *общего свойства подвижной фазы*, например, показателя преломления или электропроводности. Этот способ детектирования является неселективным и потому универсальным.
- Измерение какого-либо *специфического свойства разделяемых веществ* — светопоглощения в УФ-области, интенсивность флуоресценции или сила тока при электролизе вещества на рабочем электроде.

### Фотометрическое детектирование

Для измерения светопоглощения подвижной фазы на выходе из колонки используют проточные фотометрические кюветы (ячейки) Z-образной формы (рис. 5.24). Для предотвращения размывания хроматографических пиков объем ячейки стараются сделать как можно

меньше — 1–10 мкл. Длина оптического пути ячейки составляет от 2 до 10 мм. При измерениях в УФ-области оптические окна кюветы необходимо изготавливать из кварца.

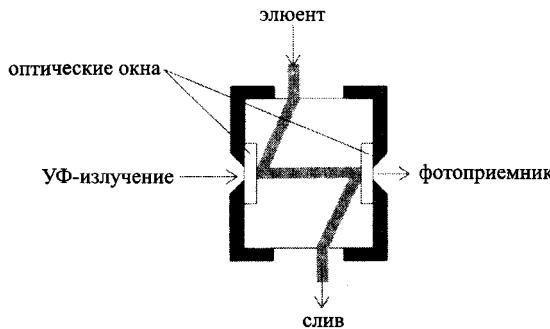


Рис. 5.24. Проточная фотометрическая ячейка для УФ-детектирования в ВЭЖХ.

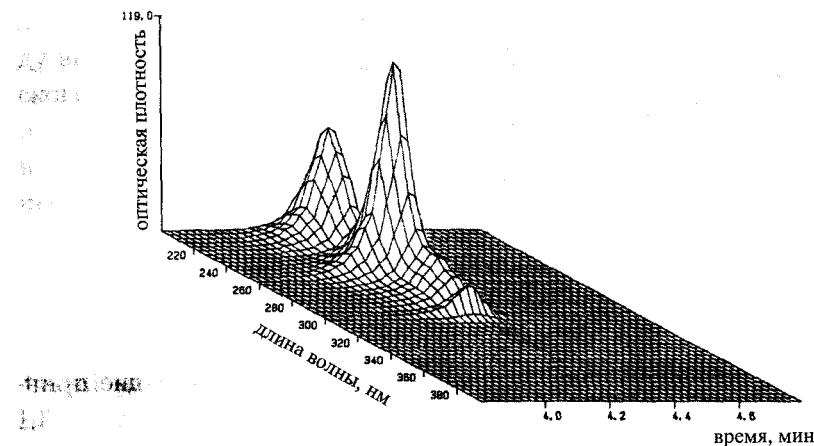
В основе работы фотометрического детектора лежат общие принципы спектрофотометрического анализа, изложенные в разделах 3.1 и 3.3.2. Детектирование в УФ- (реже — видимой) области осуществляют при одной (используя светофильтр) или нескольких длинах волн.

Простейшей разновидностью фотометрического детектора является *одноволновой УФ-детектор*. Источником света служит ртутная лампа. Требуемую длину волны выделяют при помощи светофильтра. Измерения чаще всего проводят при 254 нм. Вблизи этой длины волны находятся максимумы поглощения всех ароматических соединений. Многие другие органические и некоторые неорганические вещества также обладают интенсивным поглощением при этой длине волны (раздел 3.3.2).

Наряду с одноволновыми применяют и многоволновые детекторы — сканирующие (с призменными или решеточными монохроматорами) и многоканальные. В многоканальных детекторах регистрацию осуществляют с помощью массива фотодиодов — диодной линейки (рис. 3.84). Информацию представляют в виде трехмерной диаграммы или проекции ее сечений-горизонталей (линий равной высоты) как зависимость светопоглощения от двух параметров — времени элюирования и длины волны (рис. 5.25). Представление хроматограммы в виде линий горизонтальных сечений очень удобно для выбора оптимальной длины волны детектирования.

В табл. 5.10 приведены коротковолновые границы прозрачности различных растворителей в УФ-области.

В ВЭЖХ принципиально возможно фотометрическое детектирование и в ИК-области спектра (раздел 3.3.1). Однако поскольку в этом диапазоне большинство наиболее распространенных растворителей (вода, метанол и др.) интенсивно поглощает, этот способ детектирования применяют лишь в специальных случаях.



**Рис. 5.25.** Трехмерная хроматограмма пика фенантрена, полученная при помощи детектора — диодной линейки.

### Флуоресцентные детекторы

Использование флуоресцентного способа (раздел 3.3.3) позволяет повысить чувствительность детектирования приблизительно в 1000 раз по сравнению с фотометрическим. В качестве источника возбуждения флуоресценции чаще всего применяют ртутную лампу (в приборах высокого класса — ксеноновую лампу высокого давления). Для выбора длин волн возбуждения и регистрации используют светофильтры. Возможна и регистрация всего спектра флуоресценции в целом при помощи спектрофлуориметра. Для определения многих природных соединений, лекарственных препаратов и других физиологически активных веществ можно использовать их собственную флуоресценцию. Для детектирования нефлуоресцирующих веществ их химическим путем превращают во флуоресцирующие (дивертилизация, см. рис. 5.30).

### Рефрактометрические детекторы

В основе рефрактометрического детектирования лежит измерение показателя преломления подвижной фазы. Этот метод детектирования абсолютно неселективен и потому универсален; он применим ко

всем веществам. Единственное необходимое условие состоит в том, чтобы показатели преломления чистой подвижной фазы и раствора определяемого вещества достаточно сильно различались.

Для измерения показателя преломления используют призму. Измерение можно вести как в отраженном, так и в проходящем свете (см. раздел 3.1). На рис. 5.26 изображена схема рефрактометрического детектора, работающего по принципу отражения света. В ходе измерений приходится непрерывно изменять угол наблюдения. Луч света дважды проходит через призму и слой элюента, отражаясь от полированной поверхности подложки — массивной стальной пластинки, служащей одновременно и зеркалом, и термостатом.

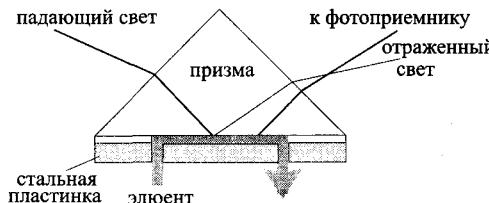


Рис. 5.26. Схема устройства рефрактометрического детектора для ВЭЖХ.

При рефрактометрическом детектировании используют две одинаковые ячейки — измерительную и ячейку сравнения (через которую непрерывно протекает поток чистого элюента). Поэтому такой детектор-рефрактометр называют дифференциальным. Чувствительность рефрактометрического детектора ниже, чем фотометрического в УФ-области. Кроме того, его показания чрезвычайно чувствительны к изменениям температуры. В идеале температуру рефрактометрического детектора следовало бы поддерживать в пределах  $\pm 0,001^\circ\text{C}$ . Рефрактометрическое детектирование применяют в случаях, когда вещество не поглощает в УФ-области, например, при определении сахаров.

#### Электрохимические детекторы

Электрохимическое детектирование можно осуществлять методами вольтамперометрии, амперометрии, кулонометрии и кондуктометрии (глава 4).

Кондуктометрическое детектирование — главный метод детектирования в ионной хроматографии (раздел 5.3.2). Детектором служит проточная кондуктометрическая ячейка, аналогичная описанной в разделе 4.2.

Кулонометрическое детектирование применяется в варианте кулонометрического титрования. При этом происходит взаимодействие определяемого вещества с электрохимически генерированным реагентом, например, галогенид-ионов с электрохимически генери-

рованными ионами  $\text{Ag}^+$  (раздел 4.5). Кулонометрическое детектирование в ВЭЖХ применяют редко.

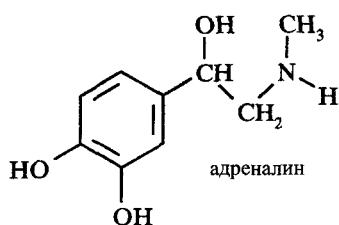
Возможно и вольтамперометрическое детектирование путем регистрации вольтамперных зависимостей на подходящем рабочем электроде. Для обеспечения непрерывного детектирования в потоке скорость развертки напряжения должна быть существенно выше, чем скорость движения подвижной фазы. Обычно используют скорости развертки порядка 1 В/с. В силу конструктивных ограничений можно применять только стационарные рабочие электроды. При столь высоких скоростях развертки на стационарных электродах возможно детектирование лишь компонентов полностью обратимых окислительно-восстановительных систем.

Значительно более распространены амперометрический метод детектирования при постоянном значении потенциала рабочего электрода (стеклоуглеродного, золотого, платинового) в области предельного диффузионного тока определяемого вещества. Для отвода тока от электрода сравнения служит вспомогательный электрод (рис. 5.27).

Амперометрическим методом можно детектировать все вещества, способные окисляться или восстанавливаться при выбранном потенциале рабочего электрода (раздел 4.4). Для детектирования предпочтительнее использовать ток окисления, поскольку в этом случае следы растворенного кислорода не оказывают мешающего влияния. Амперометрическим методом можно селективно и с высокой чувствительностью

(до  $10^{-12}$  моль) детектировать многие биологически активные вещества, например, гормоны стресса адреналин и норадреналин (катахоламин).

Амперометрическое детектирование неприменимо в присутствии поверхностно-активных веществ (белки плазмы крови, моющие средства,



содержащиеся в сточных водах и т.д.), поскольку они отравляют поверхность рабочего электрода.

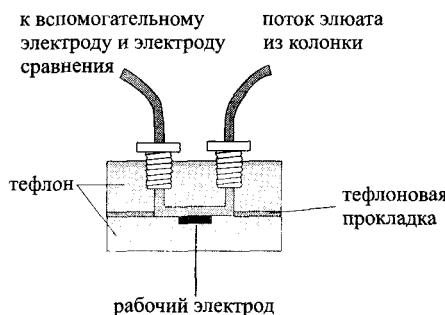
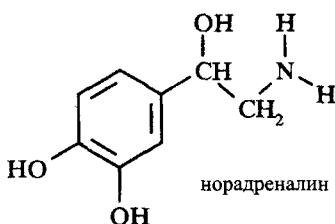


Рис. 5.27. Амперометрический детектор со стеклоуглеродным рабочим электродом.

## Спектроскопические детекторы



Примером спектроскопических детекторов может служить рассмотренный выше фотометрический детектор с диодной линейкой. Для детектирования в ВЭЖХ используют и другие спектроскопические методы — *масс-спектрометрию* (для одновременной идентификации органических веществ), *атомно-абсорбционную*, *атомно-эмиссионную спектроскопию*. Вопросы, связанные с особенностями сопряжения хроматографических и спектроскопических методов, будут рассмотрены в разделе 5.5.

## Распределительная хроматография

Распределительный вариант жидкостной хроматографии используется чаще, чем адсорбционный, ионообменный или эксклюзионный. Как правило, методом распределительной жидкостной хроматографии определяют *незаряженные полярные* вещества с *молярной массой не более 3000*. В последнее время разработаны методы определения и более высокомолекулярных веществ.

### Неподвижные фазы

В жидкостной хроматографии неподвижной фазой служит *иммобилизованная жидкость* или химически модифицированная поверхность носителя (*химически закрепленная фаза*).

### Иммобилизованные жидкости

В классическом варианте жидкостной хроматографии работают с жидким растворителем, который закреплен на поверхности твердого носителя за счет сил физической адсорбции. Основными материалами для носителей служат *силикагель* (удельная поверхность  $10\text{--}500\text{ м}^2/\text{г}$ ) и *оксид алюминия* ( $60\text{--}200\text{ м}^2/\text{г}$ ). В качестве неподвижной фазы используют полярные жидкости — воду, триэтиленгликоль. Подвижная фаза представляет собой неполярную жидкость, например, гексан или диизопропиловый эфир.

Такой вид хроматографии, когда полярность неподвижной фазы выше, чем подвижной, называется *нормально-фазовой* хроматографией. В противном случае, когда неподвижная фаза достаточно малополярна (например, углеводород), а подвижная — полярна (вода, метанол) — метод называется *обращенно-фазовой* хроматографией.

При использовании неподвижной фазы, закрепленной посредством физической адсорбции (нековалентно), возникает опасность ее вымывания в ходе хроматографического процесса. При высоких давлениях, используемых в ВЭЖХ, это становится практически неизбежным. Поэтому нековалентно закрепленные неподвижные фазы применяют только в *классическом* варианте жидкостной хроматографии низкого давления. Частичное вымывание неподвижной фазы может происходить и в этом случае, поэтому колонку периодически регенерируют, «подпитывая» ее новыми порциями неподвижной фазы. Такую подпитку можно осуществлять и непрерывно, непосредственно в ходе хроматографического процесса, если в подвижную фазу вводить в небольшой концентрации вещество неподвижной фазы. Однако в этом случае *градиентное разделение* становится *невозможным*.

### Химически закрепленные фазы

Способ химического закрепления неподвижной фазы можно применять как в нормально-фазовой, так и в обращенно-фазовой хроматографии. В настоящее время наиболее распространен *обращенно-фазовый* метод, на долю которого приходится порядка 75% всех хроматографических анализов.

**Обращенные фазы.** Для закрепления обращенных (неполярных) фаз в качестве носителя используют *силикагель*, а также оксид алюминия и ионообменные смолы. В отличие от классических ионообменных материалов с органической матрицей (раздел 2.6), силикагель *не набухает*, т.е. не изменяет своего объема при контакте с водой или другим растворителем.

Силикагель используют в виде однородного пористого (объем пор порядка 1,2 мл/г) порошкообразного материала с размером зерен 3, 5 или 10 мкм. Желательно, чтобы зерна имели сферическую форму. Порошок силикагеля отличается достаточно высокой механической прочностью.

Как мы уже упоминали в связи с газовой хроматографией, поверхность полностью гидролизованного силикагеля покрыта силильными (гидроксильными) группами (рис. 5.12), содержание которых составляет порядка 8 мкмоль/м<sup>2</sup>. Для создания обращенной фазы поверхность силикагеля гидрофобизируют (силанизируют), обрабатывая ее алкилхлорсиланами. При этом образуется химически закрепленная фаза **силоксана**, содержащая Si—O—Si-связи.

Чаще всего алкильным остатком реагента является н-октадецил (C<sub>18</sub>), затем следует н-октил (C<sub>8</sub>). Алкильные группы располагают-

ся перпендикулярно к поверхности зерен силикагеля, образуя щеточную структуру (рис. 5.28).

Поверхностный слой обращенной фазы обычно рассматривают как (псевдо)жидкость, хотя до сих пор нет полной ясности в механизме удерживания веществ на такой поверхности — является ли он распределительным или адсорбционным.

Чем длиннее алкильный радикал обращенной фазы, тем больше времена удерживания органических веществ (рис. 5.29). От длины радикала зависит также емкость колонки и, соответственно, максимальное количество пробы. Для фазы  $C_{18}$  оно вдвое больше, чем для фазы  $C_4$ .

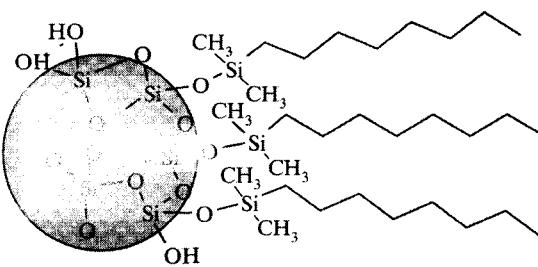


Рис. 5.28. Участок поверхности обращенной фазы  $C_8$ . На поверхности имеются остаточные силенольные группы, частично связанные водородными связями между собой и с атомами кислорода силоксановых групп.

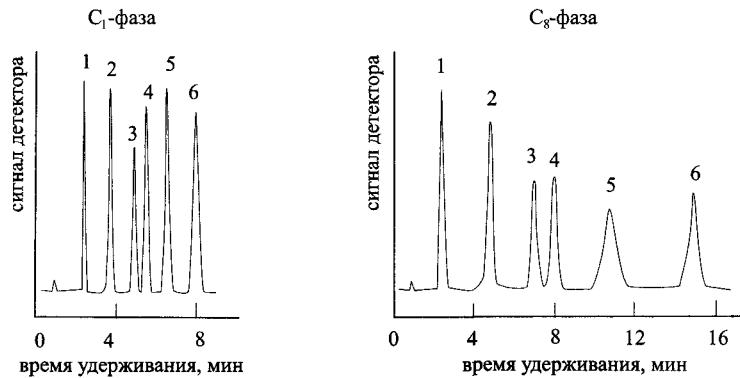


Рис. 5.29. Сравнение хроматограмм, полученных методом ВЭЖХ на силоксановых обращенных фазах с алкильными радикалами  $C_4$  (метил) и  $C_8$  (октил). 1 — урацил, 2 — фенол, 3 — ацетофенон, 4 — нитробензол, 5 — метилбензоат, 6 — толуол. Подвижная фаза — метанол-вода (50 : 50% об.). Скорость потока 1 мл/мин.

В результате силанизации химическому превращению подвергается не более 50% находящихся на поверхности силанольных групп, т.е. порядка 4 мкмоль/м<sup>2</sup>. Непрореагировавшие остаточные силанольные группы являются высокополярными и могут адсорбиро-

ваться из раствора полярные молекулы (рис. 5.28). На хроматограмме это явление проявляется в виде образования нежелательных «хвостов» хроматографических пиков. Поэтому остаточные силенольные группы необходимо как можно полнее дезактивировать. Для дезактивации применяют повторную обработку поверхности силикагеля триметилхлорсиланом. При этом силенольные группы превращаются в метилсилоановые (см. раздел 5.2).

Обращенные силоановые фазы, как правило, химически устойчивы в среде метанола, ацетонитрила и водных растворах при pH 2–8. При pH выше 8 они необратимо гидролизуются, в результате чего наблюдается деградация и даже разрушение частиц носителя.

**Нормальные фазы.** Химически связанные фазы применяются и в *нормально-фазовой хроматографии*. В табл. 5.9 приведены примеры полярных функциональных групп, используемых для синтеза нормальных фаз на поверхности силикагеля, расположенные в порядке убывания полярности.

**Таблица 5.9.** Полярные радикалы, используемые для синтеза химически закрепленных нормальных хроматографических фаз.

Группировка	Радикал
Диольная	$-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$
Нитрильная	$-(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$
Аминная	$-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ( $n = 3$ или 4)
Диметиламинная	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Диаминная	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$

### Наполнители предколонок



В предколонках в качестве наполнителей обычно используют шарики из *непористого стекла* или *полимерных материалов* диаметром порядка 30 мкм. Их поверхность покрыта тонким слоем пористого материала — силикагеля, оксида алюминия, ионообменных смол. На такой пористой поверхности можно адсорбировать слой жидкости, служащей неподвижной фазой. Ее можно также химически модифицировать методами, описанными выше.

### Подвижные фазы

В отличие от газовой хроматографии, в которой подвижная фаза *химически инертна* и выполняет лишь роль переносчика, в жидкостной хроматографии между компонентами подвижной фазы и

молекулами разделяемых веществ наблюдаются достаточно сильные физико-химические взаимодействия. Поэтому выбор подвижной фазы является очень важным элементом в разработке любой жидкостно-хроматографической методики.

Из теории хроматографии известно, что разрешение хроматографических пиков (уравнение (5.23)) зависит от числа теоретических тарелок  $N$ , коэффициента емкости  $k'$  и коэффициента селективности  $\alpha$ . Величины  $k'$  и  $\alpha$  можно изменять посредством выбора соответствующей подвижной фазы. При этом наибольшую роль играет ее *полярность*.

Общая схема действий при выборе хроматографических фаз такова. Сначала выбирают неподвижную фазу — такую, чтобы она была близка по полярности к разделяемым веществам. Затем подбирают подвижную фазу так, чтобы коэффициенты емкости разделяемых веществ по возможности находились в пределах от 2 до 5. При этом следует учитывать, что если полярности неподвижной и подвижной фаз близки, то времена удерживания оказываются слишком маленькими. Наоборот, если фазы сильно различаются по полярности, времена удерживания будут слишком велики.

### Элюотропный ряд растворителей

Полярность растворителей оценивают при помощи специальной шкалы, называемой *элюотропным рядом*. Количественной мерой полярности служит *индекс полярности* Снайдера. Значения индексов полярности  $P'$  для ряда растворителей приведены в табл. 5.10. Как видно из этих данных, наименее полярными растворителями являются алканы, а наиболее полярным — вода.

Для оценки полярности смесей растворителей используют соответствующую аддитивную комбинацию индексов полярности индивидуальных растворителей. Так, индекс полярности смеси метанола и воды, взятых в объемном соотношении 30 : 70, равен

$$P'_{\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}} = 0,3P'_{\text{CH}_3\text{OH}} + 0,7P'_{\text{H}_2\text{O}} = 1,53 + 7,14 = 8,67.$$

В общем случае

$$P'_{\text{смеси}} = \sum_{i=1}^m \Phi_i P'_i, \quad (5.40)$$

где  $\Phi_i$  — объемная доля  $i$ -го растворителя.

### Элюириующая сила растворителей

Элюириующую способность растворителя часто характеризуют при помощи величины, называемой элюириющей силой  $\varepsilon^0$ . В отличие от индекса полярности, являющегося только характеристикой растворителя (подвижной фазы) и не зависящего от природы неподвижной фазы, элюириющая сила является мерой энергии взаимодействия молекул растворителя и неподвижной фазы и, таким образом, имеет смысл лишь применительно к определенной неподвижной фазе. В табл. 5.10 приведены значения элюириющей силы растворителей по отношению к силикагелю  $\varepsilon^0(\text{SiO}_2)$ .

Таблица 5.10. Элюотропный ряд растворителей для жидкостной хроматографии, расположенных в порядке возрастания полярности.

Растворитель	Индекс полярности $P'$	Элюириющая сила $\varepsilon^0(\text{SiO}_2)$	Граница прозрачности в УФ-области, нм
Фторированные алканы	< -2	-0,2	200
Циклогексан	0,04	0,03	200
Н-гексан	0,1	0,01	195
Тетрахлорид углерода	1,6	0,11	265
Диизопропиловый эфир	2,4	0,22	220
Толуол	2,4	0,22	285
Диэтиловый эфир	2,8	0,38	215
Метиленхлорид	3,1	0,34	230
Тетрагидрофуран	4,0	0,35	210
Хлороформ	4,1	0,26	235
Этанол	4,3	0,68	205
Этилацетат	4,4	0,38	255
Диоксан	4,8	0,49	215
Метанол	5,1	0,73	205
Ацетонитрил	5,8	0,50	190
Нитрометан	6,0	0,49	380
Вода	10,2	большая	170

Порядок следования растворителей согласно величинам их элюириющей силы в общем сохраняется и при переходе от силикагеля к другой полярной неподвижной фазе. Например, для оксида алюминия приведенные в таблице значения  $\varepsilon^0$  следует разделить на 0,8. При использовании же неполярных фаз порядок изменяется на противоположный. Например, на обращенной углеводородной фазе

сильно полярный растворитель — вода — обладает гораздо меньшей элюирующей силой, чем неполярный гексан.

Рассмотрим относительный порядок элюирования веществ различной полярности в нормально-фазовой и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. В нормально-фазовой хроматографии, где полярность неподвижной фазы выше, чем подвижной, полярные вещества элюируются в последнюю очередь. При этом, чем менее полярна подвижная фаза, тем больше их времена удерживания. Наоборот, в обращенно-фазовой хроматографии полярные вещества элюируются первыми, а чем более полярна подвижная фаза, тем сильнее удерживаются неполярные вещества.

### Выбор подвижной фазы

Выбор подвижной фазы может быть произведен достаточно обоснованно, если известен *механизм* разделения веществ. Однако выяснение такого механизма требует, как правило, весьма обширного исследования (тем более, что различные механизмы обычно сопутствуют друг другу) и при решении конкретных практических задач далеко не всегда возможно. Поэтому подвижные фазы очень часто находят просто путем *подбора* — случайного («метод проб и ошибок») или направленного, с использованием методов многофакторной оптимизации.

В ходе такого подбора в первую очередь оптимизируют величины коэффициентов емкости  $k'$ . Однако значения коэффициентов емкости сами по себе еще не гарантируют полноты разделения, поскольку она зависит также от коэффициентов селективности  $\alpha$  и числа теоретических тарелок  $N$ . В принципе разделение тем полнее, чем выше коэффициенты селективности. Однако при высокой эффективности колонок (большие значения  $N$ ) разделение возможно и при значениях  $\alpha$ , мало отличающихся от единицы. Таким образом, для улучшения разделения процесс оптимизации состава подвижной фазы обычно бывает необходимо продолжить.

В *обращенно-фазовой хроматографии* компонентами подвижной фазы часто служат метанол, ацетонитрил, тетрагидрофуран и их смеси. Чтобы изменить в нужную сторону величины  $k'$ , элюирующую силу регулируют, добавляя то или иное количество воды. В *нормально-фазовой хроматографии* основными компонентами подвижной фазы могут быть диэтиловый эфир, хлористый метилен или хлороформ. Элюирующую силу можно регулировать, добавляя в подвижную фазу гексан.

### Применение распределительной жидкостной хроматографии

Сейчас *обращенно-фазовая хроматография*, как правило, служит самым первым методом, который опробывают для решения какой-либо новой практической задачи, связанной с определением органических веществ. В отличие от газовой хроматографии с ее обилием разнообразных и часто плохо воспроизводимых неподвижных фаз, в жидкостной хроматографии неподвижные фазы, например, обращенная С<sub>18</sub>-фаза, могут быть строго стандартизированы, а требуемые параметры удерживания и селективности достигнуты за счет выбора состава подвижной фазы.

Обращенно-фазовая хроматография находит применение практически во всех областях, так или иначе связанных с определением органических веществ: в фармацевтике, биохимии, криминалистике, медицине, различных отраслях промышленности. Ее используют при анализе продуктов питания, определении загрязнителей окружающей среды — пестицидов, полихлорбифенилов.

Если удовлетворительного разделения нельзя достичь в *изократическом* режиме, применяют *градиентную хроматографию*. При определении ионогенных веществ элюирующую способность подвижной фазы изменяют, регулируя ее значение *pH* или вводя в нее добавки ионных веществ (*ион-парных реагентов*). Оба эти приема служат для того, чтобы превратить разделяемые вещества в нейтральные частицы, способные удерживаться на неподвижной фазе. Так, в методе *ион-парной хроматографии*, как следует из названия, определяемые ионы переводят в ионные пары, добавляя в подвижную фазу соответствующий противоион. Примеры веществ, которые можно определять методом ион-парной хроматографии, приведены в табл. 5.11.

Таблица 5.11. Ион-парные реагенты для обращенной ВЭЖХ.

Определяемое вещество	Ион-парный реагент	Подвижная фаза
Амины	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,1 М HClO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> O/ ацетонитрил
Карбоновые кислоты	(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup>	pH 7,4
Сульфокислоты	(C <sub>6</sub> H <sub>33</sub> )(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N <sup>+</sup>	вода/пропанол

*Регулирование pH* позволяет перевести вещества основного или кислотного характера в ту или иную *равновесную форму*.

Еще один прием, используемый в жидкостной хроматографии, состоит в *химической дериватизации* определяемого вещества —

превращение его в некоторое производное соединение. с помощью дериватизации можно, например, изменить полярность вещества либо повысить чувствительность или селективность детектирования. Например, аминокислоты — продукты гидролиза белков — при помощи реакции с дансилхлоридом (5-диметиламино-1-нафталинсульфохлоридом) можно превратить во флуоресцирующие соединения (рис. 5.30) и использовать для их детектирования высокочувствительный флуоресцентный метод.

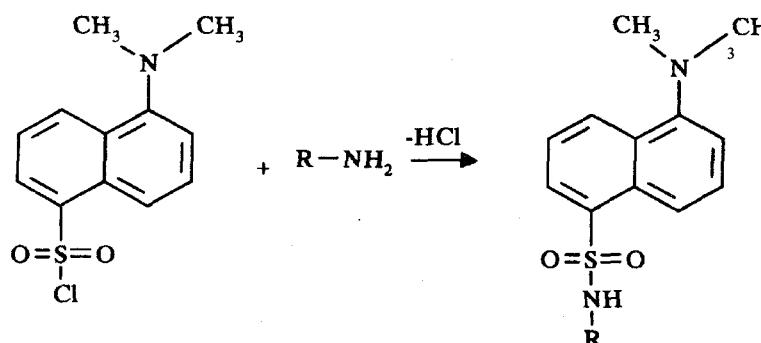


Рис. 5.30. Дериватизация аминокислот и пептидов ( $R-NH_2$ ) при помощи дансилхлорида с образованием флуоресцирующих производных.

Возможно разделять даже энантиомеры, если использовать для этого хиральные фазы. Неподвижные хиральные фазы можно создавать на основе носителя-силикагеля, покрытого слоем полимера,

с которым химически связаны оптически активные молекулы. Одним из механизмов взаимодействия разделяемых веществ с хиральной фазой может быть комплексообразование. На рис. 5.31 показано применение неподвижной фазы, содержащей комплекс меди (II) с L-пролином, для разделения оптически активных аминокислот.

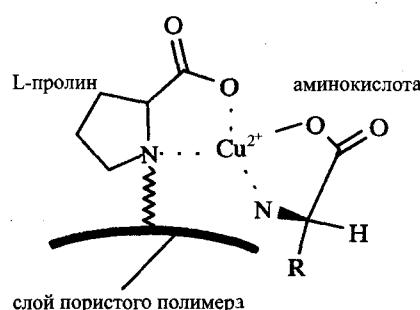


Рис. 5.31. Использование комплексообразования хиральной фазы, содержащей оптически активный комплекс меди(II) с L-пролином, для разделения энантиомеров аминокислот.

Очень важной, хотя и частной, задачей, решаемой при помощи нормально-фазовой хроматографии, является разделение алкилпроизводных ПАУ. Многие из них обладают потенциальными кан-

церогенными и мутагенными свойствами. Они являются опасными загрязнителями, содержащимися в воздухе, сточных водах и других объектах. Для определения незамещенных ПАУ можно с успехом использовать обращенно-фазовую хроматографию, но алкилированные ПАУ этим методом не разделяются. Для разделения и определения алкилпроизводных ПАУ используют нормальную неподвижную фазу, содержащую диаминные группы, и гептан в качестве подвижной фазы.

Другими примерами практического применения нормально-фазовой хроматографии может служить групповое разделение алканов и липидов или стероидов, сахаров и жирорастворимых витаминов.

### Жидкостная адсорбционная хроматография

Адсорбционная, или *жидкостно-твердофазная*, хроматография, явилась самым первым хроматографическим методом, использованным еще в пионерской работе Цвета. Неподвижной фазой обычно служит *силикагель* или *оксид алюминия*. Силикагель применяется более широко, поскольку он обладает большей емкостью и доступен во множестве хорошо охарактеризованных стандартных модификаций.

Удерживание веществ в адсорбционной хроматографии обусловлено процессами *адсорбции* на поверхности твердого адсорбента. При этом молекулы разделяемых веществ конкурируют с молекулами подвижной фазы. Адсорбция — значительно более выгодный с энергетической точки зрения процесс, чем распределение вещества между двумя жидкими фазами. Ввиду того, что процессы диффузии в адсорбционной хроматографии протекают быстрее, чем в распределительной, времена удерживания, как правило, оказываются ниже. Однако изотерма адсорбции линейна лишь в достаточно ограниченном диапазоне концентраций, поэтому в адсорбционной хроматографии даже при малых количествах пробы часто наблюдается *перегрузка колонки*.

Процессы адсорбции локализованы на *активных центрах* поверхности адсорбента. Сильно полярные молекулы такие, как вода, необратимо адсорбируются на этих центрах и, таким образом, дезактивируют поверхность адсорбента. Поэтому в адсорбционной хроматографии следует очень тщательно контролировать содержание воды в используемых растворителях.

Применяемые подвижные фазы, например хлористый метилен или изооктан, как правило, обладают меньшей полярностью, чем адсорбент. Поэтому адсорбционную хроматографию обычно рассматривают как разновидность нормально-фазовой.

Для оценки элюирующей способности растворителей в адсорбционной хроматографии лучше всего использовать величины элюирующей силы  $\varepsilon^0$  (табл. 5.10). Напомним, что значения элюирующей силы как раз и характеризуют энергетику процессов адсорбции молекул растворителя на поверхности адсорбента. Для силикагеля энергии адсорбции составляют в среднем 0,8 от энергий адсорбции на оксиде алюминия. Порядок элюирования большинства веществ на силикагеле и оксиде алюминия мало отличается. На этих адсорбентах времена удерживания веществ различных классов в целом возрастают в ряду

алкены < ароматические углеводороды < галогенпроизводные углеводородов, органические сульфиды < простые эфиры < < нитросоединения < сложные эфиры  $\approx$  кетоны  $\approx$  спирты  $\approx$   $\approx$  амины < сульфоны < сульфоксиды < амиды < карбоновые кислоты.

Адсорбционная хроматография очень удобна для разделения *неполярных веществ*, плохо растворимых в воде. Как и в распределительной хроматографии, здесь возможно разделение веществ с самыми разными функциональными группами.

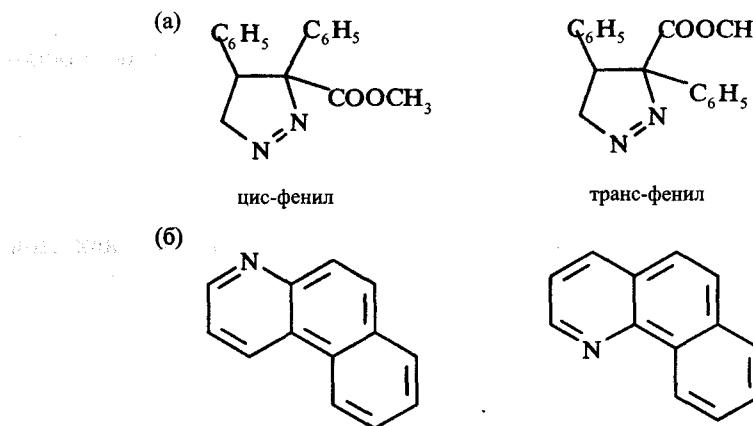


Рис. 5.32. Возможности разделения различных изомеров при помощи жидкостной адсорбционной хроматографии. (а) Геометрические изомеры цис- и транс-замещенных пиразолинов. (б) Изомеры положения: два различных азот-производных фенантролина.

С помощью адсорбционной хроматографии можно успешно разделять геометрические изомеры и изомеры положения. Два примера приведены на рис. 5.32.

Оптимизацию состава подвижной фазы проводят теми же способами, что и в распределительной хроматографии. При этом для предварительных экспериментов можно использовать тонкослойную хроматографию, поскольку она, по существу, является плоскостным вариантом адсорбционной хроматографии.

### 5.3.2. Ионная хроматография: классические и высокоэффективные методы

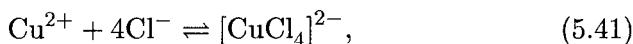
Ионной хроматографией называется *высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии*. Ионную хроматографию применяют для разделения и определения ионов при помощи ионообменников. Особенно широко она используется для определения неорганических ионов.

Теоретические основы явления ионного обмена изложены в разделе 2.6. Однако там мы рассматривали лишь *статический* вариант ионного обмена. Процессы *динамического* ионного обмена основаны на общих принципах элюативной хроматографии (раздел 5.1).

#### Классическая ионообменная хроматография

В *классической ионообменной хроматографии* используют главным образом ионообменные смолы на основе сополимера стирола и дивинилбензола (раздел 2.6; рис. 2.27). Катионообменники на такой основе были давно и успешно использованы для разделения ионов редкоземельных элементов, очень близких по своим химическим свойствам. Определение отдельных элементов при этом проводили в соответствующих фракциях элюата классическими химическими методами.

В качестве примера рассмотрим разделение ионов различных металлов в виде их *хлоридных комплексов* на *анионообменнике* (эта задача очень часто включается в общий практикум по аналитической химии). Предварительно ионообменник помещают в колонку и переводят в хлоридную форму, промывая концентрированной (12 М) соляной кислотой. На вершину колонки помещают раствор смеси солей металлов в соляной кислоте той же концентрации. В этих условиях большинство катионов металлов переходит в форму анионных хлоридных комплексов, например,



и сорбируются на анионообменнике.

При промывании колонки 12 М HCl вымывается только никель, образующий крайне непрочные хлоридные комплексы и потому не сорбирующийся даже в этих условиях. Затем концентрацию соляной кислоты в элюенте последовательно снижают. При этом один за другим вымываются все новые и новые ионы. Порядок их следования соответствует относительной устойчивости их хлоридных комплексов. На рис. 5.33 приведена хроматограмма смеси ионов  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Там же показан ступенчатый градиент концентрации HCl, применяемый для их разделения. Разделенные ионы металлов можно определить в отдельных фракциях титриметрическим или фотометрическим методом.

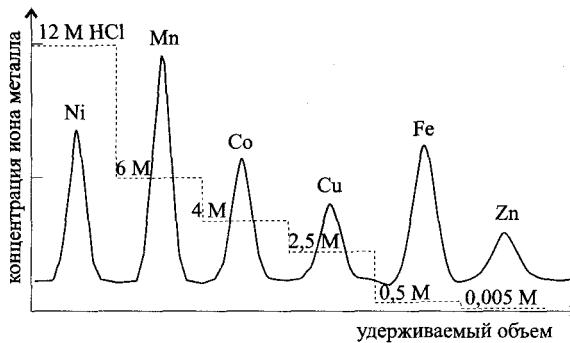


Рис. 5.33. Разделение ионов металлов в виде их хлоридных комплексов на сильноосновном анионообменнике, используя ступенчатый концентрационный градиент элюента — HCl.

### Ионная хроматография

Современная ионная хроматография возникла в середине 1970-х годов, как высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии. При этом требовалось решить две основные проблемы. Во-первых, создать ионообменные материалы, пригодные для работы в условиях ВЭЖХ. Классические ионообменные смолы для этого не годились ввиду их малой механической прочности, набухаемости и малой скорости диффузии в поры частиц сорбента. Во-вторых, требовалось разработать универсальный способ автоматического детектирования, пригодный для всех неорганических ионов.

**Наполнители колонок.** Взамен классических ионообменных смол для ионной хроматографии были разработаны специальные материалы. Они представляют собой сферические частицы (диаметром 30–40 мкм) непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытые тонким слоем пористого ионообменника. Другой тип сор-

бентов представляет собой частицы пористого силикагеля (подобные тем, которые используются в адсорбционной хроматографии), покрытые тонким слоем жидкого ионообменника (раздел 2.6).

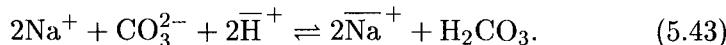
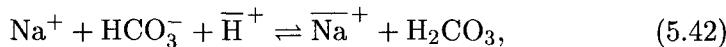
В обоих случаях процессы диффузии ионов осуществляются значительно быстрее, чем для классических ионообменников. В то же время емкость новых ионообменных материалов существенно ниже.

**Кондуктометрическое детектирование.** В качестве универсального метода детектирования неорганических ионов была предложена *кондуктометрия*. Из теории известно, что для водных растворов электролитов электропроводность прямо пропорциональна их концентрации (раздел 4.2). Однако ввиду того, что в ионной хроматографии элюент сам представляет собой раствор электролита достаточно высокой концентрации и поэтому обладает собственной электропроводностью, детектирование путем простого измерения электропроводности элюата невозможно.

### Ионная хроматография с использованием подавляющей колонки

Проблемы детектирования были решены за счет использования дополнительной *подавляющей колонки* и специального выбора подвижной фазы.

Рассмотрим принцип действия подавляющей колонки на примере определения анионов. В этом случае подавляющая колонка заполняется катионообменником в  $H^+$ -форме и располагается непосредственно за разделяющей. Подвижная фаза может представлять собой раствор  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ . Компоненты подвижной фазы, выходящие из разделяющей колонки, реагируют с катионообменником подавляющей колонки согласно уравнениям



Как и ранее (раздел 2.6), чёрта символизирует нахождение соответствующего иона в фазе ионообменника. Таким образом, собственные ионы подвижной фазы в результате ионного обмена превращаются в малодиссоциированную и обладающую очень малой электропроводностью угольную кислоту. Отсюда и происходит название «подавляющая колонка». Определяемые же ионы, например  $Cl^-$  или  $NO_3^-$ , не претерпевают на подавляющей колонке никаких химических превращений и сохраняют свою электропроводность.

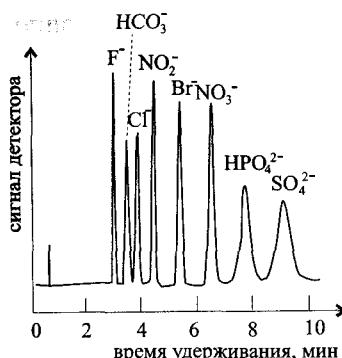


Рис. 5.34. Ионная хроматограмма смеси анионов. Элюент — 2,8 мМ  $\text{NaHCO}_3$ /2,3 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

После этого единственными электропроводящими частицами в растворе становятся разделяемые ионы, в данном случае катионы, например,  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$ .

Недостаток использования подавляющих колонок состоит в том, что после определенного времени работы (обычно порядка 10 часов) емкость ионообменника исчерпывается, и его приходится регенерировать (или заменять колонку). В современных приборах вместо подавляющих колонок все чаще используют *мембранные подавители*, непрерывно регенерируемые в процессе работы. Схематическое устройство такого подавителя представлено на рис. 5.35. Поток элюента омывает две ионообменные мембранны, которые в зависимости от природы определяемых ионов отдают в раствор  $\text{H}^+$ - или  $\text{OH}^-$ -ионы. В то же время обе мембранны непрерывно омываются и противотоком регенерирующего раствора — сильной кислоты или основания, соответственно.

Подавитель электропроводности элюента может быть также выполнен не в виде мембранны, а в виде *полых волокон* из соответствую-

На рис. 5.34 приведен пример ионной хроматограммы смеси анионов и условия их определения.

Для определения катионов разделяющую колонку заполняют катионообменником. Подвижной фазой может служить раствор соляной кислоты, а подавляющую колонку заполняют *анионообменником в  $\text{OH}^-$ -форме*. Реакция элюента в подавляющей колонке в этом случае происходит по уравнению

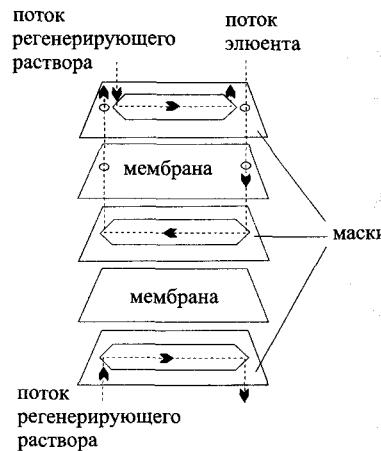
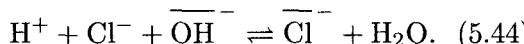
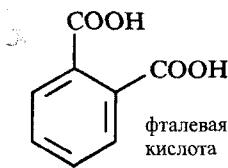


Рис. 5.35. Подавитель электропроводности на основе микромембран. Потоки элюента и регенерирующего раствора движутся через мембранны навстречу друг другу.

ющего ионообменного материала. В этом случае вместо послойного (изображенного на рис. 5.35) движения потоков имеет место их кольцеобразное движение.

### Одноколоночная ионная хроматография



Если собственная электропроводность подвижной фазы достаточно мала, то можно обойтись и без подавляющей колонки. В этом случае необходимо также использовать разделяющую колонку с ионообменником малой емкости. Элюентами с малой электропроводностью могут служить растворы слабых органических кислот, например, фталевой, бензойной или салициловой (их величины  $pK_S$  можно найти в табл. П.1 приложения). Для обеспечения постоянства электропроводности и ионной силы элюента следует очень точно поддерживать значение pH раствора. Поправку на величину собственной (фоновой) электропроводности элюента производит электронная схема регистрирующего устройства.

Одноколоночный вариант ионной хроматографии находит все возрастающее применение для определения органических ионогенных веществ, например аминокислот. Для его реализации подходит обычное оборудование для ВЭЖХ. Однако чувствительность детектирования в одноколоночном варианте ниже, чем в двухколоночном.

Необходимость в подавляющей колонке отсутствует и в том случае, если используется фотометрическое детектирование. Для детектирования ионов, не обладающих собственным светопоглощением, можно применять *косвенное фотометрическое детектирование*. В этом случае в качестве элюента используют раствор вещества, поглощающего в УФ-области, например фталевой кислоты. При выходе из колонки пиков разделяемых ионов интенсивность фонового поглощения уменьшается.

Для *прямого фотометрического детектирования* непоглощающих ионов можно использовать их превращение в светопоглощающие вещества посредством химической реакции, например, при помощи мембранных устройства, аналогичного изображенному на рис. 5.35. Вместо регенерирующего раствора через мембрану пропускают раствор реагента, образующего с ионами металлов окрашенные комплексы, например пиридин-азо-резорцина (табл. 3.23).

### 5.3.3. Гель-хроматография: разделение путем исключения молекул

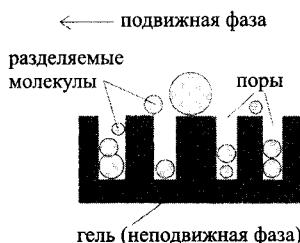


Рис. 5.36. Иллюстрация принципа гель-хроматографии.

Специфическим видом жидкостной хроматографии является **гель-хроматография**. Принцип гель-хроматографии — разделение молекул в соответствии с их размерами (рис. 5.36). Неподвижной фазой являются частицы пористого инертного материала (силикагель, полимеры) с определенным размером пор. Молекулы с размерами, большими, чем размер пор, не задерживаются частицами неподвижной фазы (эффект *молекулярной эксклюзии* или *исключения*). Молекулы же с меньшими размерами проникают в поры неподвижной фазы и, таким образом, удерживаются. В отличие от всех рассмотренных ранее видов жидкостной хроматографии, в ходе гель-хроматографического разделения не происходит никаких физико-химических взаимодействий разделляемых частиц с неподвижной фазой.

Гель-хроматография — важный метод анализа *высокомолекулярных соединений*, в частности, белков или синтетических полимеров.

#### Молекулярная эксклюзия

При контакте молекул раствора с частицами пористой неподвижной фазы возможны два крайних случая. Молекулы с размерами, превышающими максимальный диаметр пор, *не удерживаются* и элюируются первыми, перемещаясь одновременно с подвижной фазой. Молекулы с размерами, меньшими, чем минимальный диаметр пор, свободно проникают в поры и элюируются из колонки в последнюю очередь.

Остальные молекулы, имеющие промежуточные размеры, удерживаются в порах частично и в ходе элюирования разделяются на фракции в соответствии со своими размерами и, частично, формой. Их пики выходят из колонки с временами удерживания, промежуточными между двумя рассмотренными крайними случаями.

Основной характеристикой удерживания в гель-хроматографии служит известная нам величина — *удерживаемый объем*, т.е. произведение времени удерживания на объемную скорость потока подвижной фазы (см. уравнения (5.27) и (5.28)). Он равен объему элюента  $V_E$ , пропущенному через колонку до момента выхода пика компонента.

Общий объем гель-хроматографической колонки  $V_{общ}$  равен

$$V_{общ} = V_0 + V_p + V_{гель}. \quad (5.45)$$

Здесь  $V_0$  — мертвый объем колонки (объем межзеренного пространства),  $V_p$  — суммарный объем пор,  $V_{гель}$  — собственный объем твердой фазы (геля). Для неудерживаемых молекул удерживаемый объем равен мертвому объему  $V_0$ . Для молекул, свободно проникающих в поры геля, удерживаемый объем равен сумме  $V_0 + V_p$  (рис. 5.37).

В общем случае, когда молекула проводит в порах геля некоторую долю  $K$  от общего времени нахождения в колонке, удерживающий объем  $V_E$  равен

$$V_E = V_0 + KV_p. \quad (5.46)$$

Величину  $K$  можно интерпретировать как коэффициент распределения вещества между порами геля и подвижной фазой в межзеренном пространстве колонки. Она может принимать значения от 0 до 1.

- Если молекула совершенно не проникает в поры геля и не удерживается неподвижной фазой,  $K = 0$ .
- Если молекула свободно проникает в поры,  $K = 1$ .
- В промежуточном случае  $0 < K < 1$ .

Все сказанное справедливо лишь в том случае, если между молекулами разделяемых веществ и поверхностью геля не наблюдается никаких физико-химических взаимодействий — в первую очередь адсорбционных. При наличии таких взаимодействий значения  $K$  могут превышать единицу. В этом случае пик вещества выходит из колонки при величине  $V_E$  большей, чем максимально возможное (при отсутствии взаимодействий) значение, равное  $V_0 + V_p$  (рис. 5.37 (а)).

Величину  $K$  можно выразить путем простейшего преобразования соотношения (5.46). В соответствии с уравнением (5.1), она равна отношению концентраций вещества в фазах:

$$K = \frac{V_E - V_0}{V_p} = \frac{c_S}{c_M}. \quad (5.47)$$

Значения коэффициентов распределения можно использовать для сравнительной характеристики удерживания вещества на различных носителях.

## Неподвижные фазы

Наполнителями колонок для гель-хроматографии служат порошкообразные пористые стекла, силикагель, полисахариды или синтетические полимеры. Размер зерен составляет 5–10 мкм.

*Пористые стекла и силикагели* характеризуются большими скоростями диффузии молекул разделяемых веществ и растворителя в поры и высокой механической устойчивостью, в том числе при повышенных температурах. Такими материалами достаточно легко наполнять колонки. Размер пор составляет от 40 до 2500 Å. Недостатком таких материалов является высокая вероятность протекания процессов адсорбции. Поэтому их поверхность часто дезактивируют посредством силанизации.

Из синтетических полимеров первоначально использовали лишь стирол-дивинилбензольные сополимеры. Размер пор можно регулировать, изменяя содержание дивинилбензола и тем самым — степень сшивки. Эти материалы гидрофобны, поэтому их использование возможно лишь при условии, что подвижная фаза неполярна.

В настоящее время используют и гидрофильные полимеры — в частности, на основе сульфированного дивинилбензола или поликарбамидных смол.

Размеры пор для наиболее распространенных наполнителей приведены в табл. 5.12. Этими размерами определяются границы исключения молекул — значения относительных молекулярных масс (дальтон), выше которых молекулы не удерживаются гелем.

Таблица 5.12. Наиболее распространенные наполнители для гель-хроматографии.

Средний размер пор, Å	Граница исключения, дальтон
Сополимеры стирола и дивинилбензола	
$\sim 10^2$	700
$\sim 10^4$	$1 \cdot 10^4 — 20 \cdot 10^4$
$\sim 10^6$	$5 \cdot 10^6 — 10 \cdot 10^6$
Силикагель	
125	$0,2 \cdot 10^4 — 5 \cdot 10^4$
500	$0,05 \cdot 10^5 — 5 \cdot 10^5$
1000	$5 \cdot 10^5 — 20 \cdot 10^5$

Как видно из табл. 5.12, при заданном размере пор границы исключения могут варьироваться в достаточно широком диапазоне.

Строго говоря, определяющей величиной здесь является не молекулярная масса, а объем, который занимает сольватированная молекула в растворе. Он называется *гидродинамическим объемом*.

### Подвижные фазы

Выбор подвижной фазы определяется природой неподвижной фазы. В зависимости от природы фаз методы гель-хроматографии подразделяются на гель-фильтрационную и гель-проникающую хроматографию.

В гель-фильтрационной хроматографии используют гидрофильные гели. Подвижной фазой служат *водные растворы*, как правило, буферные, с контролируемым значением pH. Гель-фильтрационную хроматографию применяют для разделения водно-растворимых веществ. В гель-проникающей хроматографии неподвижная фаза гидрофобна, а подвижная — неполярна (тетрагидрофуран, хлористый метилен, толуол и др.). Этот метод применяют для разделения гидрофобных, нерастворимых в воде веществ.

### Детекторы

Для детектирования могут использоваться детекторы различных типов, применяемые в жидкостной хроматографии — рефрактометрические, фотометрические (в УФ- или ИК-области) и др., сигнал которых пропорционален концентрации растворенного вещества.

Специфическим типом детекторов для анализа высокомолекулярных соединений являются *проточные вискозиметры*. Они измеряют вязкость протекающего через них элюента. В присутствии высокомолекулярных веществ вязкость раствора возрастает, что регистрируется на хроматограмме в форме пика.

### Применение гель-хроматографии

Обычно гель-хроматографию применяют для анализа смесей веществ с относительными молекулярными массами выше 2000.

Гель-фильтрационную хроматографию часто используют для отделения высокомолекулярных природных веществ от низкомолекулярных, в том числе солей. Например, при использовании неподвижных фаз, характеризующихся границами исключения порядка нескольких тысяч дальтон (см. табл. 5.12), можно отделять белки от аминокислот и низкомолекулярных пептидов.

С помощью гель-проникающей хроматографии можно разделять различные гомологи и олигомеры гидрофобных органических ве-

ществ, например, жирные кислоты с молекулярными массами в области 100–350. Для этого в качестве неподвижной фазы используют полимерные гели с границами исключения не выше 1000.

Обе разновидности гель-хроматографии широко используются для определения молекулярных масс и молекулярно-массового распределения природных и синтетических полимеров.

Для определения молекулярных масс используют тот факт, что зависимость между логарифмом удерживаемого объема и логарифмом молекулярной массы в некотором диапазоне является линейной (см. рис. 5.37 (б)). Предварительно колонку калибруют, используя стандартные вещества с известными значениями молекулярных масс  $M_r$  и близкие по своей природе и свойствам к анализируемым. Измерив для стандартных веществ удерживаемые объемы  $V_E$ , методом линейного регрессионного анализа находят коэффициенты  $b_0$  и  $b_1$  в уравнении калибровки

$$\lg M_r = b_0 - b_1 \lg V_E. \quad (5.48)$$

В качестве стандартных веществ, растворимых в воде, используют декстрыны, полиэтиленгликоль, сульфированные полистиролы и белки. Примерами нерастворимых в воде стандартных веществ могут служить полистирол, политетрагидрофуран и полизиопрен.

Принцип определения молекулярной массы по значениям удерживаемых объемов проиллюстрирован на рис. 5.37 (б) и (в).

**Достоинства гель-хроматографии.** В гель-хроматографии все возможные значения удерживаемых объемов укладываются в точно определенный интервал между  $V_0$  и  $V_0 + V_p$ . Поэтому данный метод характеризуется небольшими временами удерживания, определяемыми значениями коэффициента распределения  $K$ . Пики на гель-хроматограммах обычно достаточно узкие и хорошо воспроизводимые. Ввиду того, что вещество не претерпевает в ходе хроматографического процесса никаких химических взаимодействий, оно выходит из колонки в неизменном виде и без потерь. Поэтому гель-хроматографию можно использовать и в препаративных целях. С другой стороны, и вещество не оказывает никакого воздействия на колонку, что нередко наблюдается в других видах хроматографии.

**Недостатки гель-хроматографии.** Ввиду ограниченности диапазона значений  $K$  (между 0 и 1) максимальное число разрешенных пиков в гель-хроматографии относительно невелико (см. табл. 5.4).

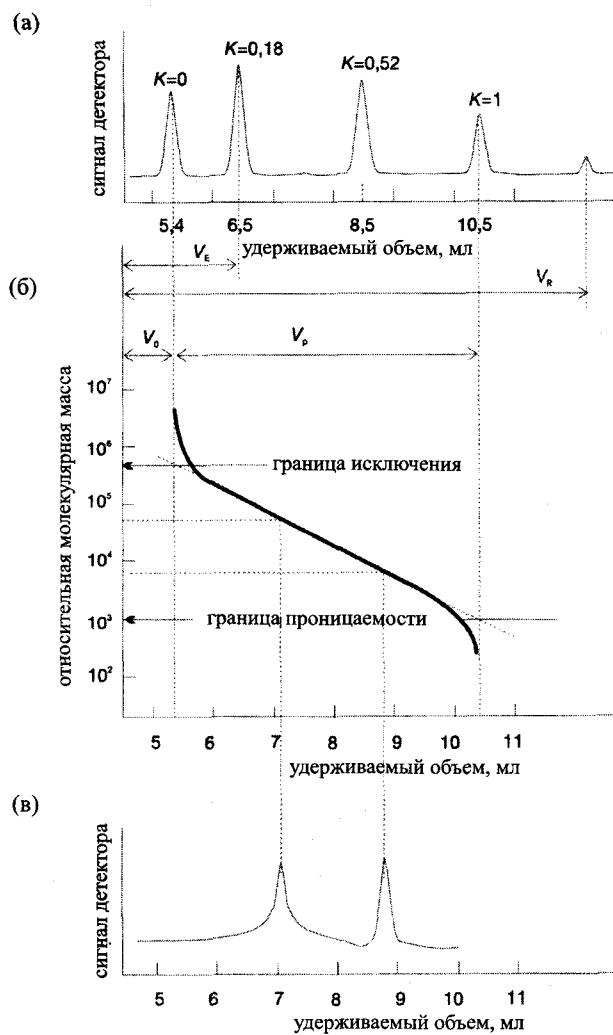


Рис. 5.37. Удерживание веществ и калибровка колонки в гель-хроматографии. (а) Гель-хроматограмма смеси стандартных веществ с относительными молекулярными массами от  $10^6$  до  $10^3$  и коэффициентами распределения от 0 до 1. Последний, пятый, пик принадлежит веществу, испытывающему физико-химические взаимодействия с неподвижной фазой. (б) Биологарифмическая зависимость между удерживаемыми объемами и относительными молекулярными массами стандартных веществ, полученная по данным рис. 5.37 (а). (в) Определение молекулярных масс неизвестных веществ. Все условия хроматографического процесса (объем пробы, скорость потока элюента и др.) должны быть строго идентичны условиям калибровки.

Этим методом невозможно разделить молекулы *одинакового размера*, в частности, изомеры. Обычно считают, что удовлетворительного разделения двух веществ можно достичь лишь в случае, если их молекулярные массы различаются *не менее, чем на 10%*.

### 5.3.4. Тонкослойная хроматография: плоскостной вариант жидкостной хроматографии

В предыдущих разделах, посвященных жидкостной хроматографии, мы рассматривали исключительно ее колоночный вариант. В этом разделе мы коснемся методов плоскостной хроматографии, в которых регистрируют *внутренние хроматограммы* (см. раздел 5.1). К плоскостным методам относятся *бумажная* и *тонкослойная* хроматографии, а также *электрохроматография*.

Плоский носитель неподвижной фазы может использоваться непосредственно (полоска бумаги в бумажной хроматографии) или быть нанесен в виде тонкого слоя на пластинку (из стекла, пластины, металла). Движение подвижной фазы может обеспечиваться капиллярными, гравитационными или электромиграционными силами.

Мы ограничимся рассмотрением лишь наиболее распространенного метода плоскостной хроматографии — *тонкослойной хроматографии (ТСХ)*. Метод ТСХ может рассматриваться как модифицированный вариант колоночной жидкостной хроматографии. Очень часто эксперименты по тонкослойной хроматографии являются предварительным этапом разработки методик колоночной хроматографии, поскольку они более просты в выполнении и позволяют за короткое время опробовать большое число подвижных фаз и разнообразные условия разделения.

Тонкослойная хроматография широко используется для *обзорного анализа* в химических, производственных, медицинских, фармацевтических, биохимических и биологических лабораториях.

#### Неподвижные и подвижные фазы

В тонкослойной хроматографии используют те же неподвижные фазы, что и в соответствующих методах колоночной ВЭЖХ — адсорбционной, распределительной (нормально-фазовой и обращенно-фазовой), ионообменной, молекулярно-эксклюзионной. Слой тонкоизмельченного носителя наносят на пластиинки размерами  $5 \times 10$ ,  $10 \times 20$  или  $20 \times 20$  см. Для стандартных пластиинок толщина слоя носителя составляет 200–250 мкм, а размеры частиц носителя —

20 мкм и более. При длине разделяющего пути 12 см число теоретических тарелок может достигать 2000, а время разделения составлять порядка 25 мин.

Современным методом ТСХ является *высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)*. В этом методе толщина слоя носителя составляет порядка 100 мкм, а размер зерен — 5 мкм и менее. Разделение происходит более полно и за более короткое время, около 10 мин. При длине разделяющего пути 3 см число теоретических тарелок достигает 4000. Однако емкость неподвижной фазы и, соответственно, максимальное количество пробы в этом случае существенно меньше.

### Нанесение пробы и получение хроматограмм

*Нанесение пробы* (в виде раствора с концентрацией от 0,01 до 0,1%) на пластинку проще всего осуществить при помощи капилляра. Объем раствора составляет от 0,5 до 5 мкл. Каплю раствора наносят на расстоянии 1–2 см от края пластинки. Для качественного анализа диаметр образовавшегося пятна раствора не должен превышать 5 мм, для количественного он должен быть еще меньше. В ВЭТСХ обычно используют капилляры из сплава платины с иридием, при использовании которых объем капли раствора составляет от 100 до 200 нл. Этот объем можно достаточно точно дозировать. После нанесения капли раствора необходимо полностью испарить растворитель.



Рис. 5.38. Хроматографическая камера для тонкослойной хроматографии.

Для получения хроматограммы необходимо обеспечить движение подвижной фазы вдоль пластинки. Для этого пластинку помещают в закрытую хроматографическую камеру (рис. 5.38). На дно камеры наливают немного растворителя — подвижной фазы и насыщают ее парами. При установке пластинки необходимо следить, чтобы пятно пробы не касалось жидкого слоя растворителя. Под действием капиллярных

сил растворитель начинает перемещаться вверх по пластинке. Однако скорость его движения неравномерна. Зависимость скорости движения растворителя от пройденного пути выражается гиперболической функцией.

После того, как растворитель пройдет примерно две трети длины пластиинки, пластиинку вынимают из камеры. На этом получение хроматограммы заканчивается. После этого растворитель высушивают и детектируют пятна компонентов пробы.

### Детектирование

В ходе предварительных, *обзорных*, анализов, как правило, ограничиваются визуальным детектированием с целью идентификации компонентов смеси. Для определения *положения* пятен компонентов пробы существуют следующие способы.

- Использование *люминесцентных свойств* разделяемых веществ. Для органических веществ, как правило, наблюдают флуоресценцию, для неорганических — фосфоресценцию (см. раздел 3.3.3).
- Нанесение *флуоресцентного индикатора* на носитель. При облучении пластиинки ультрафиолетовым пятна компонентов наблюдаются как темные, не флуоресцирующие области на общем светящемся фоне пластиинки. В качестве индикаторов можно использовать производные пирина, флуоресцеин, морин, родамин Б.
- Опрыскивание пластиинки раствором неспецифического *сильного окислителя* —  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{KMnO}_4$ , а также концентрированной серной кислотой. В результате окисления органических веществ на пластиинке будут наблюдаться темные пятна.
- Опрыскивание раствором *группового* или *селективного* реагента, образующего с соединениями определенных классов окрашенные продукты: нингидрина в качестве реагента на  $\text{NH}_2$ -группы (рис. 5.39), хлорида железа(III) как реагента на

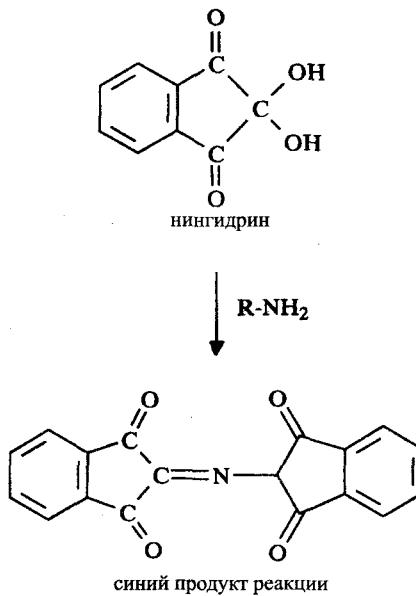


Рис. 5.39. Образование продукта, окрашенного в синий цвет, при взаимодействии нингидрина с  $\text{NH}_2$ -группами.

фенолы, анилинфталата для проявления пятен некоторых сахаров или лигандов, образующих окрашенные комплексы, — для проявления пятен ионов металлов.

Идентификацию вещества на основании положения его пятна можно осуществить очень легко, если одновременно с пробой на той же пластинке для сравнения провести хроматографирование индивидуальных предполагаемых веществ. При этом в случае использования проявляющих реактивов должны совпасть не только положения пятен, но и их окраска. Более подробно о способах идентификации веществ на основании положения их пятен мы поговорим ниже.

Среди инструментальных методов детектирования преобладает измерение интенсивности *локального диффузного отражения света* в УФ- или видимой области. Предназначенный для этого прибор называется *денситометром* или сканнером. Кроме того, можно послойно снимать носитель с пластинки и анализировать его отдельные порции обычными методами химического анализа, например спектроскопическими.

### Величина $R_f$ и коэффициент емкости

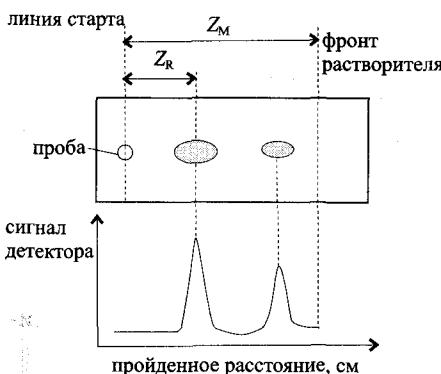


Рис. 5.40. К расчету характеристики удерживания в тонкослойной хроматографии.

Для количественной характеристики удерживания веществ на *внутренних хроматограммах*, к которым принадлежат тонкослойные, используются специальные параметры. Основным является *коэффициент удерживания*, обозначаемый (и чаще всего так и называемый)  $R_f$ . Он представляет собой отношение расстояний, пройденных на пластинке данным веществом ( $z_R$ ) и фронтом подвижной фазы ( $z_M$ ; рис. 5.40):

$$R_f = \frac{z_R}{z_M}. \quad (5.49)$$

Для симметричных пятен  $z_R$  находят по положению центра пятна, для несимметричных — по положению максимума интенсивности.

Выразим связь между величиной  $R_f$  и *коэффициентом емкости*. Для этого сначала найдем, за какие времена  $t_M$  и  $t_R$  фронт раствори-

рителя и вещество пройдут *одно и то же* определенное расстояние, скажем равное  $z_R$ . Пусть средняя линейная скорость движения растворителя равна  $\bar{u}$ . Тогда

$$t_M = \frac{z_R}{\bar{u}}. \quad (5.50)$$

Вещество проходит расстояние  $z_R$  за то же самое время, за какое фронт растворителя проходит расстояние  $z_M$ . Поэтому

$$t_R = \frac{z_M}{\bar{u}}. \quad (5.51)$$

Подставляя выражения (5.50) и (5.51) в формулу для расчета коэффициента емкости (5.9), получаем:

$$k' = \frac{z_M - z_R}{z_R}. \quad (5.52)$$

Отсюда  $k'$  выражается через  $R_f$  следующим образом:

$$k' = \frac{1 - \frac{z_R}{z_M}}{\frac{z_R}{z_M}} = \frac{1 - R_f}{R_f}. \quad (5.53)$$

Далее, выразив  $k'$  через *коэффициент распределения*  $K$  и фазовое отношение  $\beta$  (уравнение (5.6)), получаем следующее соотношение:

$$R_f = \frac{1}{1 + k'} = \frac{1}{1 + \beta K}. \quad (5.54)$$

Величину расстояния, пройденного веществом, можно использовать для расчетов числа теоретических тарелок и высоты, эквивалентной теоретической тарелке. Для тонкослойной хроматографии соответствующие выражения выглядят следующим образом.

$$\text{Число теоретических тарелок: } N = 16 \left( \frac{z_R}{w} \right)^2. \quad (5.55)$$

$$\text{Высота, эквивалентная теоретической тарелке: } H = \frac{z_R}{N}. \quad (5.56)$$

### Применение тонкослойной хроматографии

Мы уже упоминали о важной сфере применения тонкослойной хроматографии как очень простого в исполнении метода *обзорного анализа* в самых разнообразных областях. Дополнительным достоинством ТСХ является возможность *одновременного* анализа нескольких проб на одной и той же пластинке.

Для качественного анализа можно использовать характеристики удерживания, а также данные, полученные при помощи инструментального детектирования (в случае его применения).

Отметим, что непосредственное использование абсолютных значений  $R_f$  для идентификации веществ, как правило, невозможно, поскольку эти значения сильно зависят от конкретных условий эксперимента. К ним относятся толщина слоя носителя, влажность подвижной и неподвижной фаз, температура, степень насыщения хроматографической камерыарами растворителя, а также количество пробы (и, соответственно, размеры пятен). Поэтому предпочтительнее использовать *относительные* значения  $R_f$ , рассчитанные по отношению к некоторому стандартному веществу:

$$R_{f,\text{отн}} = R_f(\text{в} - \text{ва}) / R_f(\text{станд. в} - \text{ва}) \quad (5.57)$$

Основным методом *инструментального качественного и количественного анализа* служит фотометрия диффузного отражения (раздел 3.3.2). Чтобы сигнал линейно зависел от концентрации, используют преобразование при помощи функции Кубелки–Мунка (уравнение (3.84)). Для количественного анализа большую роль играет поправка на *сигнал фона*, величина которого сильно зависит от состояния слоя носителя.

По сравнению с ВЭЖХ метод тонкослойной хроматографии имеет и ряд существенных недостатков.

Скорость потока подвижной фазы не может быть задана произвольно и не является *постоянной величиной*. Она зависит от размеров зерен носителя, вязкости растворителя и множества других факторов. Кроме того, она изменяется в ходе хроматографического процесса, что приводит к уширению пятен. По мере движения растворителя его скорость значительно уменьшается, поэтому длина участка пластиинки, который может быть использован для разделения, достаточно ограничена. Соответственно, ограничено и реально достижимое число теоретических тарелок.

При использовании многокомпонентной подвижной фазы ее состав может непрерывно изменяться в течение хроматографического процесса из-за наличия многообразных равновесий между жидкой, твердой и газообразной (пространство хроматографической камеры) фазами. Это приводит к плохой воспроизводимости величин  $R_f$ , соответственно, плохой воспроизводимости разделения как такового.

Эти недостатки могут быть до некоторой степени преодолены при использовании новейшего метода тонкослойной хромато-

графии — радиальной тонкослойной хроматографии, использующей принудительное движение растворителя с постоянной скоростью от центра пластиинки к периферии.

## 5.4. Сверхкритическая флюидная хроматография и электрофорез

В этом разделе мы рассмотрим последние достижения в области хроматографических и родственных методов такие, как методы сверхкритической флюидной хроматографии и капиллярного электрофореза.

### Сверхкритическая флюидная хроматография

В методе сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) по-движной фазой является так называемая *флюидная фаза*. Этот метод удачно сочетает в себе основные достоинства как газовой, так и жидкостной хроматографии и часто оказывается незаменим для решения задач, которые не могут быть решены ни с помощью газовой, ни жидкостной хроматографии. Это относится, в частности, к проблемам определения веществ, которые *нелетучи*, т.е. не могут быть переведены в газовую фазу без разложения и потому не могут быть определены методом газовой хроматографии. С другой стороны, существует много веществ, определение которых при помощи жидкостной хроматографии затруднено из-за отсутствия подходящих способов детектирования. Согласно некоторым оценкам, доля задач, не решаемых ни с помощью газовой, ни с помощью жидкостной хроматографии, достигает 25% от общего числа практических задач химического анализа, требующих разделения веществ. Они часто встречаются в ходе анализа природных веществ, лекарственных препаратов, продуктов питания, полимеров, нефти, при определении пестицидов.

Как известно из курса физической химии, для любого вещества существует некоторая *критическая температура*, выше которой оно ни при каком давлении не может существовать в жидком состоянии. Давление, соответствующее критической температуре, называется *критическим давлением*. Совокупность критических значений температуры и давления называется *критической точкой*. Вблизи критической точки вещество находится в так называемом *сверхкритическом (флюидном) состоянии* и обладает свойствами, промежуточными между свойствами газа и жидкости.

Из физических свойств вещества в сверхкритическом состоянии для хроматографии наиболее важны *плотность, вязкость и коэффициенты диффузии*. В табл. 5.13 приведены сравнительные величины, характеризующие эти свойства для газов, сверхкритических флюидов и жидкостей. Следствием достаточно высокой плотности флюидов является *хорошая растворимость* в них многих нелетучих веществ большой молярной массы. Так, в диоксиде углерода в сверхкритическом состоянии хорошо растворяются все нормальные алканы с числом атомов углерода от 5 до 40, полициклические ароматические углеводороды.

Таблица 5.13. Сравнение важных для хроматографического анализа свойств веществ в газообразном, флюидном и жидком состояниях.

Свойство, характеристика	Газы	Сверхкритические флюиды	Жидкости
Плотность, $\text{г}\cdot\text{см}^{-3}$	$0,6 \cdot 10^{-3} — 2 \cdot 10^{-3}$	$0,2 — 0,5$	$0,6 — 2$
Вязкость, $\text{г}\cdot\text{см}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$	$1 \cdot 10^{-4} — 3 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4} — 3 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-2} — 3 \cdot 10^{-2}$
Коэффициенты диффузии, $\text{см}^2\cdot\text{с}^{-1}$	$1 \cdot 10^{-1} — 4 \cdot 10^{-1}$	$10^{-4} — 10^{-3}$	$0,2 \cdot 10^{-5} — 2 \cdot 10^{-5}$

В табл. 5.14 приведены характеристики ряда веществ в критической точке. Все эти вещества можно использовать в качестве подвижных фаз в СФХ. Обычно рабочая температура колонки составляет около  $1,2T_k$ , а давление — от 1 до  $3p_k$ .

Таблица 5.14. Критические величины для веществ, используемых как подвижные фазы в сверхкритической флюидной хроматографии.

Флюид	Темп. $T_k$ , $^{\circ}\text{C}$	Давл. $p_k$ , МПа	Плотн. $d_k$ , $\text{г}\cdot\text{см}^{-3}$
CO <sub>2</sub>	31,3	7,39	0,468
N <sub>2</sub> O	36,5	7,27	0,457
NH <sub>3</sub>	132,5	11,40	0,235
Метанол	239,4	8,10	0,272
н-Бутан	152,0	3,80	0,228
Дихлордифторметан	111,8	4,12	0,558
Диэтиловый эфир	195,6	3,64	0,265

Для большинства веществ, приведенных в табл. 5.14, критические температуры и давления относительно невелики и не выходят

за пределы обычных для газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии рабочих диапазонов. В силу этого и аппаратура для СФХ мало отличается от газовых и жидкостных хроматографов и представляет собой в некотором роде их гибрид.

Особенности свойств сверхкритических флюидов могут быть использованы и для *сверхкритической флюидной экстракции* в процессе пробоподготовки. В промышленности сверхкритическая флюидная экстракция широко используется для извлечения кофеина из кофе и никотина из табака.

### Аппаратура

Как уже упоминалось, флюидный хроматограф устроен как комбинация отдельных узлов аппаратуры для высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии. Важным требованием является поддержание *постоянства температуры* колонки. Это обеспечивается при помощи терmostатируемых печей, подобных тем, что используются в газовой хроматографии. Кроме того, в колонке необходимо постоянно поддерживать *давление*, достаточное для того, чтобы подвижная фаза все время находилась в сверхкритическом состоянии. На выходе же из колонки давление сбрасывают. При этом

подвижная фаза переходит в газообразное состояние, и для детектирования используют обычные для газовой хроматографии методы. Для сброса давления служат устройства, называемые дросселями. Они представляют собой капилляры длиной от 2 до 10 см с внутренним диаметром, приблизительно в 10 раз меньшим, чем внутренний диаметр колонки (5–10 и 50–100 мкм, соответственно).

Рис. 5.41. Вытянутый капилляр — дроссель давления для капиллярной СФХ.

В простейшем случае капиллярный дроссель насаживают непосредственно на выходное отверстие колонки (рис. 5.41).

Давление в системе следует контролировать с высокой точностью, поскольку от величины давления зависит плотность флюида и, соответственно, коэффициенты емкости. При повышении давления возрастают плотность и элюирующая способность флюида, и времена удерживания уменьшаются. Так, повышение давления флюида  $\text{CO}_2$  от 7 до 9 МПа приводит к уменьшению времени удерживания с 25 до 5 мин. В СФХ используют и прием *градиентного программирования давления*, полностью аналогичный программированию тем-



пературы в газовой хроматографии или состава подвижной фазы в жидкостной хроматографии.

### Неподвижные и подвижные фазы

В СФХ применяют как набивные, так и капиллярные колонки. *Набивные колонки* аналогичны тем, что применяются в распределительной ВЭЖХ. Они также имеют внутренний диаметр от 0,5 до 4,6 мм, длину до 25 см и заполняются частицами размером от 3 до 10 мкм.

*Капиллярные колонки* подобны применяемым в газовой хроматографии. Их изготавливают из плавленого кварца. Неподвижную фазу наносят на внутреннюю силанизированную поверхность в виде тонкой жидкой пленки или химически связывают с ней. Длина капиллярных колонок обычно составляет 10–20 м, внутренний диаметр — от 0,05 до 10 мм, толщина слоя неподвижной фазы — от 0,05 до 1 мкм.

В качестве *подвижной фазы* чаще всего используют *диоксид углерода*. Он удобен в работе, дешев, нетоксичен, не обладает запахом и не обладает светопоглощением в УФ-области вплоть до 190 нм. Критические характеристики  $\text{CO}_2$  (табл. 5.14) позволяют варьировать температуру и давление в широких пределах, совместимых с техническими возможностями обычной аппаратуры для ВЭЖХ. Иногда в подвижную фазу добавляют модификатор — небольшие количества метанола или диоксана. Другие вещества, используемые как подвижные фазы в СФХ, перечислены в табл. 5.14.

### Детекторы

Детектирование в газовом потоке, выходящем из дросселя давления, можно осуществить при помощи обычного пламенно-ионизационного детектора для газовой хроматографии. Условием его применимости является низкая величина фонового сигнала, что имеет место при использовании в качестве подвижной фазы  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  или  $\text{NH}_3$ .

По сравнению с жидкостной хроматографией в СФХ технически проще реализовать сочетание хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования. В сверхкритической хроматографии масс-спектрометрическое детектирование применяется более широко, чем в жидкостной. Используют также фотометрические детекторы в УФ- и ИК-области, флуоресцентные, пламенно-фотометрические детекторы, а также катарометры и детекторы электронного захвата (см. раздел 5.2).

### Показатели эффективности СФХ

Из сопоставления характеристик сверхкритических флюидов, газов и жидкостей (табл. 5.13) можно сделать два основных вывода.

Поскольку вязкость флюидов меньше, чем жидкостей, в СФХ можно использовать более высокие скорости потоков подвижной фазы, чем в ВЭЖХ (рис. 5.42). Времена выполнения анализа в СФХ такого же порядка, как и в газовой хроматографии, и существенно меньше, чем в жидкостной.

С точки зрения величин коэффициентов диффузии флюиды занимают промежуточное положение между газами и жидкостями. Поэтому уширение пиков в сверхкритической хроматографии выражено сильнее, чем в жидкостной, но слабее, чем в газовой хроматографии.

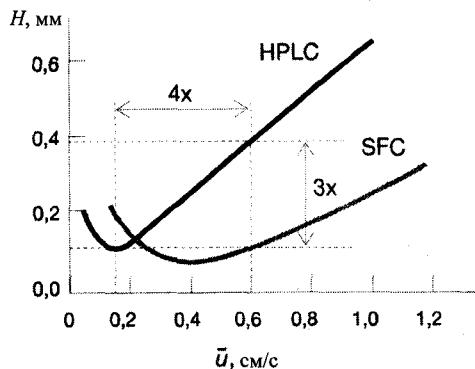


Рис. 5.42. Сравнение зависимостей ВЭТТ ( $H$ ) от линейной скорости потока подвижной фазы ( $\bar{u}$ ) для ВЭЖХ и СФХ (подвижная фаза — диоксид углерода).

ские пики в СФХ в  $\sqrt{3}$  раза уже, чем в ВЭЖХ.

Теперь сравним скорости потоков, соответствующие минимальным значениям ВЭТТ. Для ВЭЖХ она составляет 0,15 см/с, а для СФХ — 0,6 см/с, т.е. в 4 раза больше.

В отличие от газовой хроматографии, в сверхкритической хроматографии подвижная фаза не является лишь переносчиком разделяемых веществ. Как и в ВЭЖХ, в СФХ могут иметь место физико-химические взаимодействия разделяемых веществ с компонентами подвижной фазы. Изменение состава подвижной фазы можно использовать для целенаправленного изменения величин коэффициентов селективности  $\alpha$ .

Сравним зависимости высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости потока подвижной фазы для сверхкритической и жидкостной хроматографии (рис. 5.42). Начнем с величин ВЭТТ. При одной и той же линейной скорости потока, равной 0,6 см/с, для СФХ ВЭТТ равна 0,13 мм, а для ВЭЖХ — 0,39 мм, т.е. в три раза больше. Как следует из уравнения (5.17), это означает, что при одинаковых условиях хроматографические

Ввиду высокой растворимости веществ в сверхкритических фазах их определение можно проводить при температурах значительно более низких, чем температуры испарения. Это открывает широкие возможности для определения методом СФХ синтетических и биологических полимеров, а также различных термически нестабильных соединений, для которых неприменим метод газовой хроматографии. Верхняя граница молекулярных масс определяемых веществ значительно выше, чем в газовой хроматографии и, как и в ВЭЖХ, достигает порядка  $10^5$ . Молекулы с еще большей массой (до  $10^7$ ) следуют определять методом гель-хроматографии.

### Применение сверхкритической флюидной хроматографии

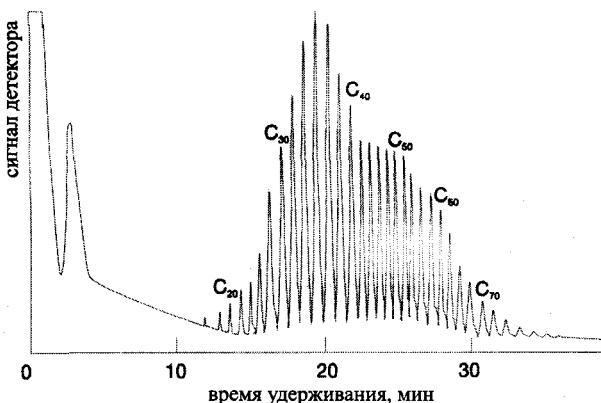
О больших возможностях использования СФХ для определения не-летучих веществ с достаточно большими молекулярными массами мы уже сказали. К ним относятся многие природные вещества и синтетические материалы, компоненты продуктов питания, нефти, пестициды, поверхностно-активные вещества, полимеры, взрывчатые вещества.

Сверхкритическая флюидная хроматограмма смеси олигомеров полиэтилена приведена на рис. 5.43. Обратите внимание, что пики достаточно узкие несмотря на то, что использована набивная колонка. Характер градиента давления типичен для метода СФХ: в начале процесса — постоянное давление, затем линейное повышение до максимального значения в течение определенного времени, затем постоянное максимальное значение до окончания разделения.

### Электрофорез

В основе методов электрофореза лежит явление *миграции* ионов, т.е. их движение в электрическом поле. Коротко об этом явлении было сказано в разделе 4.1. Для разделения используют различия в величинах подвижностей отдельных ионов.

Большинство электрофоретических методов, строго говоря, нельзя отнести к хроматографии, поскольку здесь не происходит разделения частиц между подвижной и неподвижной фазами. Однако с точки зрения аппаратурного оформления и некоторых теоретических положений как классический вариант электрофореза — на бумаге, так и современный — капиллярный — достаточно сходны с соответствующими разновидностями хроматографии (плоскостной и капиллярной).



**Рис. 5.43.** Анализ смеси олигомеров полиэтилена средней молекулярной массы 740 при помощи СФХ. Разделяющая колонка: 10 × 0,01 см, набивная, нормально-фазовая, наполнитель —  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , размер зерен 5 мкм. Подвижная фаза:  $\text{CO}_2$ , давление 10 МПа в течение 7 мин, затем программируемое повышение до 36 МПа в течение 25 мин, затем постоянное 36 МПа. Температура колонки 100°С. Детектор — пламенно-ионизационный.

Различия в скоростях движения в электрическом поле можно использовать для электрофоретического разделения не только низкомолекулярных ионов, но и коллоидных частиц, макромолекул, вирусов и даже целых живых клеток.

### Классический электрофорез

Классический вариант электрофореза до сих пор широко применяют при исследованиях в области биохимии и молекулярной биологии для разделения, выделения и определения белков, полинуклеотидов и других биополимеров. Различают метод простого электрофореза и электрофореза на носителе.

Предложенный А. Тизелиусом (Нобелевская премия, 1948 г.) метод *простого электрофореза* был первоначально реализован как процесс перемещения ионов вблизи границы контакта двух растворов — исследуемого и буферного. Растворы заливают в U-образную трубку; находящийся сверху буферный раствор во избежание механического перемешивания должен иметь плотность меньшую, чем исследуемый (рис. 5.44). При наложении при помощи платиновых электродов постоянного напряжения ионы различной природы, находящиеся в исследуемом растворе, в силу их различных подвижностей концентрируются в разных зонах вблизи поверхности раздела растворов. Эта разновидность метода называется *фронтальным*

электрофорезом. Фронтальный электрофорез не позволяет достичь полного разделения.

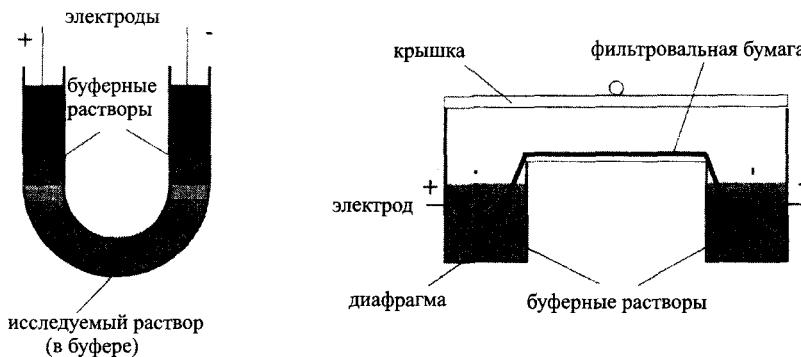


Рис. 5.44. Схемы установок для простого электрофореза (слева) и электрофореза на бумажном носителе (справа).

Чаще применяют метод *электрофореза на носителе*. Здесь ионы перемещаются в неподвижном слое носителя — бумаги или геля, например агарового, полимерного или силикагеля. Слой носителя пропитывают раствором инертного электролита. По концам слой носителя контактирует с буферными растворами, в которые погружены электроды (рис. 5.44). Прилагаемое постоянное напряжение составляет сотни и тысячи вольт.

Исследуемый раствор наносят в виде как можно более узкой полоски вблизи одного из концов слоя носителя. В процессе электрофореза различные ионы исследуемого раствора образуют отдельные зоны. Этот метод называется *зонным электрофорезом*.

Получаемая в результате картинка — распределение разделяемых ионов по зонам — носит название *электрофорограммы*. Если ионы окрашены, ее можно наблюдать визуально или регистрировать фотометрически. На рис. 5.45 приведена классическая электрофорограмма белков сыворотки крови.

### Дальнейшее развитие метода

Для разделения *амфолитов*, например аминокислот или белков, применяют вариант электрофореза, называемый *изоэлектрическим фокусированием*. В этом методе в направлении электрического поля создают градиент  $pH$  при помощи подходящей смеси буферов. Как известно из теории кислотно-основных равновесий (раздел 2.2), молекулы амфолитов при значении  $pH$  раствора, равном  $pH$  изоэлектрической точки, не движутся в электрическом поле. Поэтому в

#### 5.4. Сверхкритическая флюидная хроматография и электрофорез

условиях градиента pH молекула каждого амфолита при наложении электрического поля перемещается к области с величиной pH, равной pH ее изоэлектрической точки. Таким образом, различные амфолиты концентрируются в различных зонах.

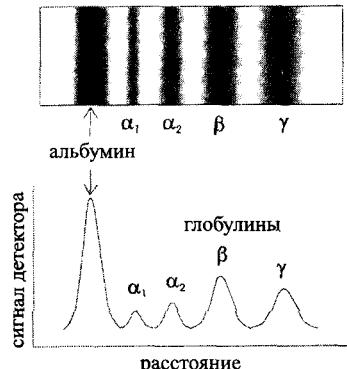


Рис. 5.45. Электрофорограмма белков сыворотки крови, полученная при помощи фотометрической регистрации.

равный и «таксос» — скорость). Как следует из названия, в условиях изотахофореза различные частицы движутся в электрическом поле с одинаковыми скоростями.

Во всех рассмотренных до сих пор электрофоретических методах частицы движутся в постоянном электрическом поле  $\mathbf{E}$  с различными скоростями  $v_i$ :

$$v_i = \mathbf{E} u_i, \quad (5.58)$$

где  $u_i$  — подвижность  $i$ -го иона.

Ввиду того, что подвижности ионов различны, для обеспечения равенства скоростей их движения

$$v = \mathbf{E}_1 u_1 = \mathbf{E}_2 u_2 = \dots = \mathbf{E}_n u_n, \quad (5.59)$$

необходимо, чтобы каждый  $i$ -й ион находился под воздействием поля соответствующей напряженности  $\mathbf{E}_i$ . Например, если

$$u_1 > u_2 > \dots > u_n,$$

то

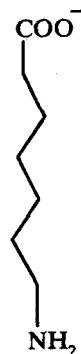
$$\mathbf{E}_1 < \mathbf{E}_2 < \dots < \mathbf{E}_n.$$

При этом, если ион движется слишком быстро, то он попадает в находящуюся впереди зону с меньшей напряженностью поля и, таким образом, затормаживается. Наоборот, в случае медленного движения ион оказывается в зоне с большей напряженностью поля и ускоряется. В результате ионы каждого сорта концентрируются в очень узкой области пространства. Это явление называется *динамическим обострением* границ зон.

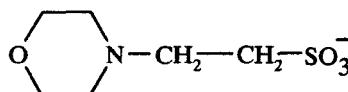
На практике движение ионов с одинаковыми скоростями достигают следующим образом. Для изотахофореза используют капилляр (например, тефлоновый) и два буферных раствора с ионами разных подвижностей. Один конец капилляра заполняют *ведущим* раствором, другой — *замыкающим* раствором. Ионы ведущего раствора должны иметь более высокую подвижность, чем ионы замыкающего раствора. Анализируемый раствор помещают между зонами обоих буферных растворов. При наложении поля все ионы, находящиеся в капилляре, располагаются в порядке убывания их подвижностей и тем самым разделяются.

В частности, для разделения и определения иммуноглобулина методом изотахофореза в качестве ведущего используют раствор морфолинэтансульфоната с pH 9, а в качестве замыкающего — раствор аминокапрата с pH 10,8. Капиллярный изотахофорез является очень распространенным вариантом электрофоретических методов.

В целом использование *капиллярной техники* позволяет преодолеть многие недостатки, присущие классическим методам электрофореза. Главные из них — недостаточные эффективность и воспроизводимость разделения, а также трудности регистрации зон отдельных ионов. В методах простого электрофореза серьезную проблему представляет джоулево тепло, в значительных количествах выделяющееся в ходе процесса вследствие высоких значений используемого напряжения и малого сопротивления раствора. Выделение



6-аминокапронат как замыкающий ион



морфолинэтансульфонат как ведущий ион

тепла приводит к возникновению тепловых конвекционных потоков, перемешивающих раствор электролита и ухудшающих разделение.

### Капиллярный электрофорез

Использование в электрофорезе технических наработок, применяемых в капиллярной газовой хроматографии, резко расширило возможности метода. Современный вариант электрофореза называют капиллярным электрофорезом или, по аналогии с ВЭЖХ, высокоэффективным капиллярным электрофорезом.

Капиллярная техника принципиально позволяет реализовать все разновидности электрофоретических методов. Как и в хроматографии (газовой или флюидной), при этом значительно снижаются помехи вследствие диффузионных процессов. Кроме того, в капиллярном варианте сопротивление раствора намного выше, чем в классическом. Поэтому количество выделяемого джоулевого тепла меньше, а его отвод (термостатирование капилляра) осуществляется намного проще.

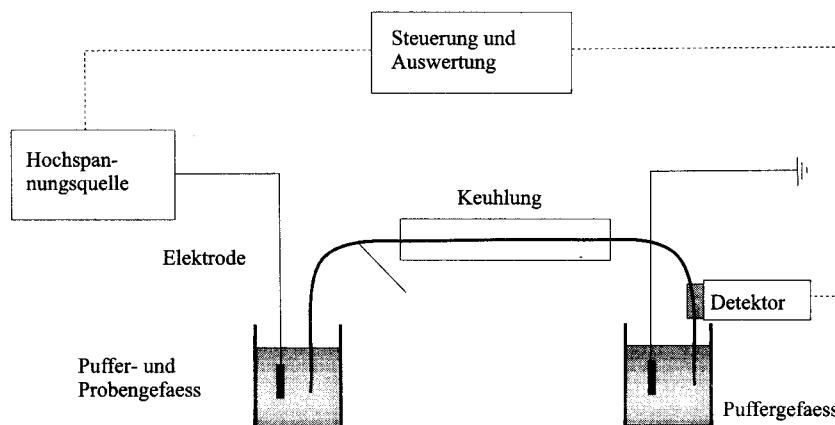


Рис. 5.46. Схема устройства для капиллярного электрофореза.

### Аппаратура

Схема установки для капиллярного электрофореза приведена на рис. 5.46. Установка состоит из двух резервуаров с буферными растворами, капилляра с системой охлаждения, источника высокого напряжения, устройства ввода пробы, детектора и регистрирующего устройства.

Капилляры для электрофореза обычно имеют длину 10–100 см и внутренний диаметр 25–100 мкм. Материалом служит плавленый

кварц. Используют капилляры как с немодифицированной, так и с модифицированной внутренней поверхностью. Модификацию осуществляют за счет адсорбции или химического связывания. Капилляр заполняют буферным раствором, гелем или раствором полимера.

Величина *напряжения*, налагаемого на платиновые электроды для создания электрического поля, составляет до 30 кВ.

*Ввод пробы* обычно осуществляется со стороны отрицательно заряженного электрода (катода) и может производиться под действием силы тяжести. Для этого конец капилляра со стороны катода опускают в сосуд с анализируемым раствором и приподнимают его на некоторое время приблизительно на 10 см над уровнем жидкости в другом сосуде. Пробу можно вводить и под действием *электрокинетических сил*. В этом случае конец капилляра погружают в анализируемый раствор и подают короткий импульс (несколько секунд) высокого напряжения (порядка 5 кВ). В результате возникающего электроосмотического потока (см. ниже) в капилляр засасывается объем раствора (5–50 нл), пропорциональный времени подачи импульса. Разработаны и автоматизированные системы ввода пробы, основанные на изложенных выше принципах.

Во внутреннем пространстве капилляра, охлаждаемого окружающим воздухом или при помощи термостата, разделяемые ионы движутся к противоположному электроду. Как мы уже упоминали, ввиду того, что сечение капилляра очень мало, электрическое сопротивление раствора велико, а количество выделяемого джоулевого тепла незначительно. Кроме того, тонкий капилляр характеризуется большой величиной отношения внешней поверхности к объему, что способствует быстрому отводу тепла. Таким образом, в ходе разделения капилляр практически не нагревается, поэтому конвекционные потоки жидкости и вызванное этим уширение пиков весьма незначительны. В методе капиллярного электрофореза ширина пиков часто соответствует теоретически возможному минимуму, обусловленному лишь молекулярной диффузией, а число теоретических тарелок достигает 500 000 или даже миллиона.

Для детектирования можно использовать методы фотометрии (одноволновой УФ-детектор или диодная линейка), флуоресценции или различные электрохимические методы. Детектор располагается вблизи одного из концов капилляра. Расстояние от детектора до противоположного конца капилляра называется *эффективной длиной* капилляра.

### Электроосмотический поток и его использование для разделения веществ

Разделение веществ в методе капиллярного электрофореза в целом основано на тех же принципах, что и в классическом варианте. Однако капиллярные методы имеют одну особенность, связанную с наличием электроэндоосмотического потока, обычно называемого просто *электроосмотическим потоком*. Причина возникновения электроосмотического потока — образование *двойного электрического слоя* между раствором и внутренней поверхностью капилляра. Немодифицированная внутренняя поверхность кварцевого капилляра содержит множество сианольных групп, которые обладают кислотными свойствами и в щелочных средах диссоциируют с отщеплением протона. При этом внутренняя поверхность электрода заряжается отрицательно и притягивает из раствора положительно заряженные противоионы. В результате жидкость, находящаяся в капилляре, оказывается как бы заключенной в положительно заряженную с поверхности трубку (рис. 5.47). Поэтому при наложении напряжения весь объем жидкости, находящейся внутри капилляра, начинает двигаться к отрицательно заряженному электроду (катоду) как единое целое. Это движение и называется *электроосмотическим потоком*. Его скорость зависит от плотности отрицательного заряда на внутренней поверхности капилляра и, следовательно, от величины pH раствора (причем очень резко). Обычно электроосмотический поток наблюдается лишь при  $pH > 4$ . При этом чем выше pH, тем больше его скорость. Путем соответствующей химической модификации поверхности капилляра электроосмотический поток можно уменьшить, подавить или даже повернуть в противоположном направлении.

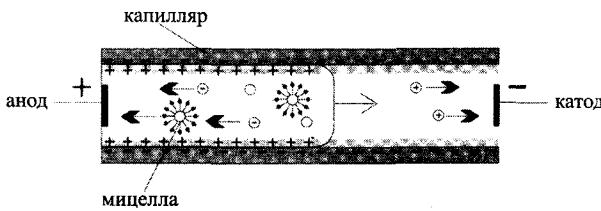


Рис. 5.47. Электроосмотический поток, возникающий в результате образования двойного электрического слоя между раствором и внутренней поверхностью капилляра.

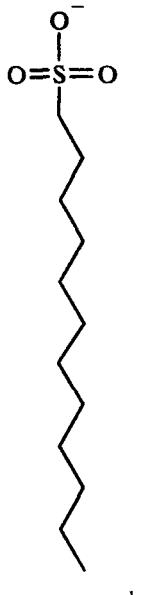
Фронт электроосмотического потока имеет практически плоскую форму (рис. 5.47), что обуславливает равномерность течения

жидкости вдоль сечения капилляра. Фронт же обычного гидродинамического потока, например, в любом варианте хроматографии, имеет параболическую форму. Ввиду равномерности электроосмотического потока его наличие не приводит к заметному дополнительному уширению пиков.

Если бы электроосмотического потока не было, то при наложении напряжения все положительно заряженные ионы двигались бы к катоду, а все отрицательно заряженные — к аноду. Однако электроосмотический поток вызывает дополнительное перемещение к катоду *всего объема раствора*. Естественно, что при этом *положительно заряженные* ионы будут по-прежнему двигаться к катоду (причем с большей скоростью). Однако относительно направления движения отрицательно заряженных ионов уже нет однозначного ответа. Если собственная скорость движения иона превышает скорость электроосмотического потока (что бывает редко), то такой ион будет по-прежнему двигаться к аноду, хотя и с меньшей скоростью. В противном же случае ион будет медленно перемещаться к катоду. К катоду, вместе с электроосмотическим потоком, перемещаются и все незаряженные частицы. Таким образом, детектор, установленный вблизи катода, будет регистрировать сначала катионы, затем нейтральные частицы и, наконец, некоторые анионы.

Очевидно, что в описанных условиях все незаряженные частицы движутся с одной и той же скоростью и поэтому не могут быть разделены. Однако их электрофоретическое разделение становится возможным, если ввести в раствор поверхностно-активное вещество, образующее *мицеллы*, например, додецилсульфат натрия. В водных растворах ядро мицеллы гидрофобно и может захватывать нейтральные молекулы. Внешний же слой мицелл заряжен. Поэтому в электрическом поле мицелла перемещается, унося с собой захваченную внутрь нейтральную молекулу (рис. 5.47).

Метод разделения нейтральных молекул в электрическом поле при помощи мицелл называется *мицеллярной электрохроматической капиллярной хроматографией*. Слово «хроматография» в названии метода не случайно. В отличие от всех остальных рассмотренных нами электрофоретических методов, здесь разделение веществ, как



и в хроматографии, основано на *распределительном равновесии* с участием двух (псевдо)фаз — мицеллярной (аналог подвижной фазы в хроматографии) и фазой раствора (аналог неподвижной фазы).

### Применение электрофоретических методов

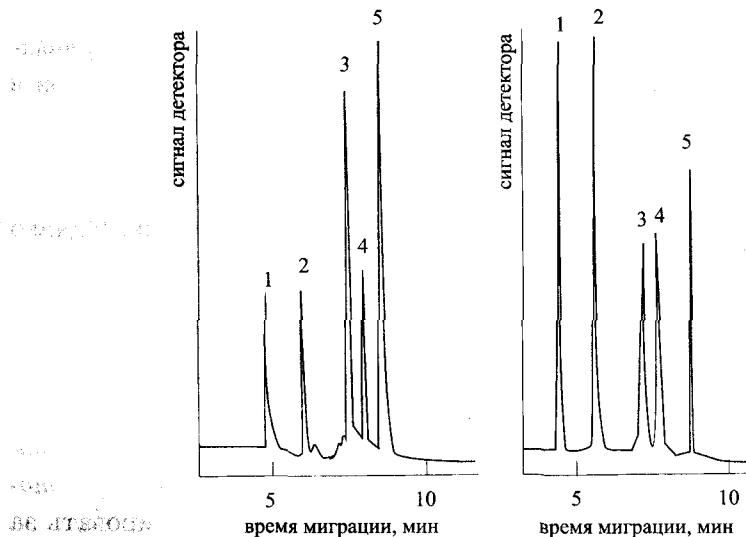
Классический электрофорез (в «макроскопическом» масштабе) является одним из самых распространенных аналитических методов в биологии и биохимии, поскольку биомолекулы в большинстве случаев заряжены. Как правило, здесь применяют *электрофорез на полимерном носителе*. Использование носителя значительно уменьшает нежелательное влияние тепловых конвекционных потоков. Однако методы классического электрофореза с трудом поддаются автоматизации и поэтому часто оказываются длительными и трудоемкими.

Применение *капиллярного* электрофореза позволяет устраниć самые главные проблемы метода — тепловую конвекцию и трудности детектирования. Капиллярный электрофорез — высокоеффективный метод, широко применяемый для определения *аминокислот*, *пептидов*, *белков*, *нуклеиновых кислот* и других *биополимеров*. Так, смесь фрагментов ДНК можно проанализировать за 10 мин, используя капилляр длиной 35 см и внутренним диаметром 50 мкм в среде боратного буфера при напряжении на электродах 8 кВ с фотометрическим детектированием при 260 нм. При помощи классического электрофореза на полиамидном геле такой же анализ занимает около трех часов.

На рис. 5.48 приведены две электрофореграммы смеси белков. При использовании кварцевого капилляра с немодифицированными внутренними стенками (рис. 5.48 (а)) необходимо использовать достаточно высокую концентрацию буферного раствора, чтобы предотвратить адсорбцию разделяемых веществ на стенках капилляра. При внимательном рассмотрении электрофореграммы видно, что пики несимметричны и имеют «хвосты». Если же поверхность капилляра покрыть поливиниловым спиртом (рис. 5.48 (б)), то пики становятся симметричными. В данном случае при эффективной длине капилляра 57 см число теоретических тарелок составляет около 1000 000.

Методом электрофореза можно определять и *низкомолекулярные ионы*, в частности, катионы и анионы, содержащиеся в биологических жидкостях. Диапазон линейности зависимости сигнала детектора от концентрации в этих случаях составляет обычно три порядка и выше.

Применение мицеллообразования позволяет определять методом мицеллярной электрохроматографии и *нейтральные молекулы*. Это используют при анализе объектов окружающей среды, например, для определения фенолов.



**Рис. 5.48.** Анализ смеси белков методом капиллярного электрофореза с использованием немодифицированного капилляра (а) и капилляра, покрытого слоем поливинилового спирта (б). 1 — цитохром, 2 — лизоцим, 3 — трипсин, 4 — трипсиноген, 5 —  $\alpha$ -химотрипсин. Капилляр: эффективная длина 57 см, общая длина 70 см, внутренний диаметр 50 мкм. Буфер: фосфатный, pH 3, 150 мМ (а), 50 мМ (б). Напряжение 30 кВ. Ввод пробы: электро-кинетический, 15 кВ, 5 с. Детектирование: УФ, 214 нм.

## 5.5. Сочетание хроматографии и спектроскопии

Сочетание нескольких методов анализа в одно целое позволяет резко увеличить объем извлекаемой информации о веществе. В данном разделе мы рассмотрим те дополнительные возможности, которые открываются в результате сочетания методов хроматографии и спектроскопии.

Одновременное использование этих двух методов позволяет получать данные в виде зависимости *интенсивности* сигнала одновременно от *времени удерживания* и *длины волны*. Графически ее можно представить в форме трехмерной диаграммы (рис. 5.25).

Возможности сочетания отдельных методов хроматографии и спектроскопии представлены в табл. 5.15. Сочетание газовой хроматографии с масс-спектрометрией и жидкостной хроматографии с УФ-спектроскопией используется повсеместно. Постепенно возрастает и роль комбинации жидкостная хроматография — масс-спектрометрия, а также применение атомно-эмиссионной спектроскопии с различными источниками возбуждения в сочетании с газовой и жидкостной хроматографией. Наиболее важные комбинации хроматографических и спектроскопических методов будут подробнее рассмотрены ниже.

Таблица 5.15. Возможности сочетания хроматографических и спектроскопических методов. +++ — используется повсеместно, ++ — используется часто, + — принципиально возможно.

Хроматография	Спектроскопия				
	МС	УФ	ИК	ААС	АЭС
ГХ	+++		++		++
ВЭЖХ	++	+++		+	++

ГХ — газовая хроматография, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, МС — масс-спектрометрия, УФ — УФ-спектроскопия, ИК — ИК-спектроскопия, ААС — атомно-абсорбционная спектроскопия, АЭС — атомно-эмиссионная спектроскопия.

## Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии

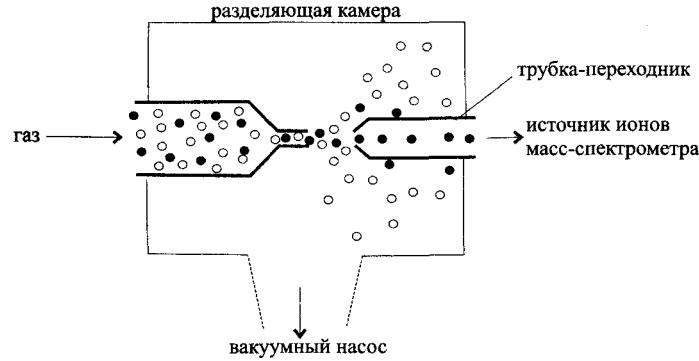
### Техническая реализация

Для капиллярной газовой хроматографии объединение хроматографа и масс-спектрометра не встречает технических трудностей. В этом случае скорость потока газа-носителя (1–25 мл/мин) достаточно мала, и выходящий газовый поток можно непосредственно вводить в ионизационную камеру масс-спектрометра.

При использовании *набивных* колонок поток газа слишком велик и не может быть введен в вакуумированную систему масс-спектрометра непосредственно. Поэтому между колонкой и масс-спектрометром устанавливают *сепаратор*.

Действие сепаратора основано на принципе *молекулярных пучков*. Наиболее распространенная конструкция сепаратора представлена на рис. 5.49. Поток газа из колонки поступает через сопло в

камеру, из которой непрерывно откачивается газ. При этом преимущественно откачиваются молекулы газа-носителя как более легкие. Поэтому газовая среда относительно обогащается (примерно на 50%) молекулами определяемого вещества. Часть разреженного газового потока через трубку-переходник поступает в ионизатор масс-спектрометра.



**Рис. 5.49.** Сепаратор для соединения набивной газо-хроматографической колонки и масс-спектрометра. Темные кружки — молекулы определяемого вещества, светлые кружки — молекулы газа-носителя.

Обычно в сочетании с газовой хроматографией используют квадрупольные или секторные магнитные масс-анализаторы. Соответствующие приборы — хромато-масс-спектрометры — серийно выпускаются промышленностью.

### Регистрация масс-хроматограмм

В ходе хроматографического разделения с масс-спектрометрическим детектированием можно регистрировать *полный ионный ток* — сумму ионных токов, отвечающих всевозможным массовым числам — как функцию от времени удерживания.

Можно также настроить масс-спектрометрический детектор на одно или несколько определенных значений массового числа и непрерывно регистрировать соответствующие ионные токи (селективный мониторинг ионов). Преимуществом этого способа является возможность более длительной регистрации, что увеличивает чувствительность определения.

Для одного пика или всей хроматограммы в целом можно регистрировать и полный масс-спектр. Обработку и графическое представление полученной *масс-хроматограммы* обычно осуществляют



при помощи компьютера. В частности, масс-хроматограмму можно представить в виде набора отдельных масс-спектров и идентифицировать вещества, пользуясь *библиотекой масс-спектров*.

### Практическое применение

Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии — очень мощный метод *идентификации* органических веществ по их масс-спектрам. Этим методом можно анализировать пробы сложного состава — природные и сточные воды, продукты питания (в частности, для определения вкусовых и ароматических добавок), определять различные метаболиты в биологических жидкостях.

Путем сравнения масс-спектров, зарегистрированных на *краях пика*, можно судить о том, насколько этот пик соответствует индивидуальному веществу и, таким образом, о полноте хроматографического разделения. Часто для контроля полноты разделения вычисляют отношения интенсивностей характерных масс-спектрометрических пиков при определенных массовых числах. При полном разделении эти отношения должны быть постоянны на всем протяжении хроматографического пика.

### Сочетание жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии

Как и для газовой хроматографии, для ВЭЖХ масс-спектрометрическое детектирование представляет интерес в первую очередь в плане расширения возможностей *идентификации* веществ в многокомпонентных смесях. Однако ввиду использования достаточно больших объемов жидкой фазы в ВЭЖХ непосредственный ввод потока элюата в вакуумную систему масс-спектрометра, как правило, невозможен. Некоторую часть потока можно ввести в масс-спектрометр непосредственно лишь при использовании *микрокапиллярных колонок*, для которых скорость потока жидкой фазы составляет от 10 до 50 мкл/мин. Во всех остальных случаях необходимо применять специальные устройства сопряжения.

Одним из первых таких устройств была движущаяся лента-транспортер, при помощи которой поток жидкости, выходящий из колонки, поступал в нагревательную камеру, где растворитель испарялся. Затем пробу переносили в ионизационную камеру масс-спектрометра и ионизировали ее при помощи десорбционных методов.

В настоящее время для определения неполярных и умеренно полярных веществ чаще всего применяют струйный интерфейс. По-

лярные соединения определяют, используя термораспыление или химическую ионизацию при атмосферном давлении. Для определения высокополярных, ионных и высокомолекулярных веществ используют электрораспыление.

### Сопряжение при помощи пучка частиц (струйный интерфейс)

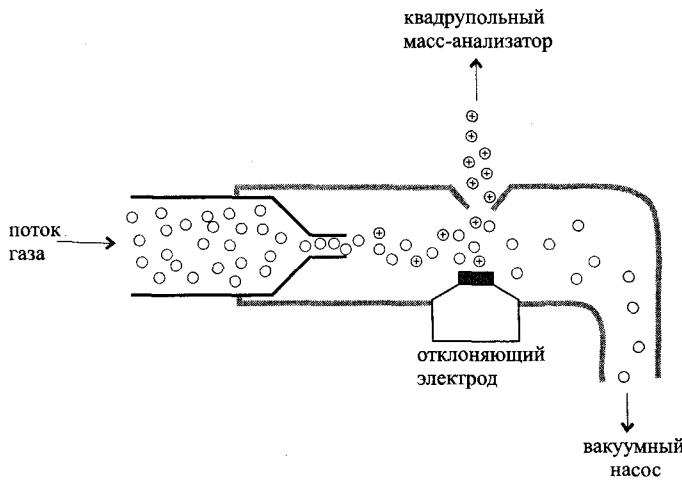
Устройство струйного интерфейса напоминает сепаратор для сопряжения газового хроматографа и масс-спектрометра (рис. 5.47). Элюат со скоростью 0,1–1 мл/мин поступает в распылительную камеру, где под действием потока гелия превращается в аэрозоль (аналогично устроен и распылитель в атомно-абсорбционных спектрометрах). Затем аэрозоль перемещается в десольватационную камеру, температура в которой составляет 50°C, а давление — порядка  $3 \cdot 10^4$  Па. Здесь растворитель улетучивается, а определяемое вещество переходит в форму микроскопических взвешенных капелек. В следующей, разделительной, камере пары растворителя отсасывают при помощи насоса, а пучок частиц определяемого вещества через сопло и трубку-переходник поступает в масс-спектрометр. Перед ионизацией частицы вещества испаряют в вакууме при температуре 250°C.

Для ионизации можно использовать методы электронного удара или химической ионизации. Описанный способ сопряжения применим как для нормально-фазовой, так и для обращенно-фазовой хроматографии в изократическом или градиентном режиме. Однако, поскольку здесь требуется полное испарение растворителя, подвижная фаза не должна содержать нелетучих компонентов — в частности, *буфера*. Струйный интерфейс применяют обычно при определении неполярных веществ.

### Термораспыление

Для определения полярных веществ удобным методом сопряжения и одновременно ионизации является *термораспыление*. Поток жидкой подвижной фазы, выходящий из колонки со скоростью порядка 2 мл/мин, поступает в нагреваемый капилляр, где жидкость частично испаряется, а частично распыляется (рис. 5.50). Образуется аэрозоль, состоящий из частиц растворителя и определяемого вещества. Особенностью метода термораспыления является то, что здесь не требуется внешнего источника ионизации. Для осуществления ионизации в жидкую фазу добавляют специальный реагент, обычно ацетат аммония, который образует с молекулами определяемого

вещества аддукты с ионом  $\text{NH}_4^+$ . Они поступают непосредственно в масс-анализатор.



**Рис. 5.50.** Сочетание ВЭЖХ с масс-спектрометрией посредством термораспыления. Отклоняющий электрод служит для направления потока ионов к масс-анализатору. Он должен быть заряжен одновременно с определяемыми ионами.

Термораспыление является *мягким* методом ионизации. Масс-спектры, получаемые с использованием термораспыления, достаточно просты и содержат молекулярный пик, а значительного фрагментирования, как при электронном ударе, не происходит. Таким образом, возможности идентификации веществ по их масс-спектрам довольно ограничены. Поскольку ионизирующий реагент — соль аммония — должен быть хорошо растворим в подвижной фазе, она должна быть полярной. Таким образом, метод термораспыления применим главным образом к определению полярных веществ методом обращенно-фазовой хроматографии, использующей полярные подвижные фазы.

При использовании термораспыления можно регистрировать масс-спектры большинства полярных, нелетучих, термически устойчивых соединений, в частности, пептидов и нуклеотидов. Пределы обнаружения составляют до 1 пг.

### Ионизация при атмосферном давлении

Ионизация при атмосферном давлении может осуществляться посредством электрораспыления или как химическая ионизация. Здесь поток элюата также превращают в аэрозоль, а затем ионизируют при атмосферном давлении.

В методе электрораспыления как распыление, так и последующая ионизация осуществляются под действием электрического поля высокой напряженности. Элюат поступает в стальной капилляр, являющийся одним из электродов. Между ним и вторым электродом создают разность потенциалов около 3 кВ.

Метод электрораспыления применим для определения умеренно и высокополярных, ионных и высокомолекулярных соединений. При определении веществ, молекулы которых содержат множество функциональных групп, например, белков, часто образуются многочленно заряженные ионы. При этом массовое число иона уменьшается по сравнению с молекулярной массой вещества в соответствующее число раз. Поэтому даже при использовании недорогих квадрупольных масс-анализаторов с верхней границей массовых чисел порядка 3000 дальтон становится возможным определение веществ с очень высокой молекулярной массой. Ограничение метода электрораспыления — необходимость очень малых скоростей потока жидкой фазы (1–10 мкл/мин). При более высоких скоростях применяют метод ионного распыления, в котором аэрозоль создают с помощью быстрого потока газа.

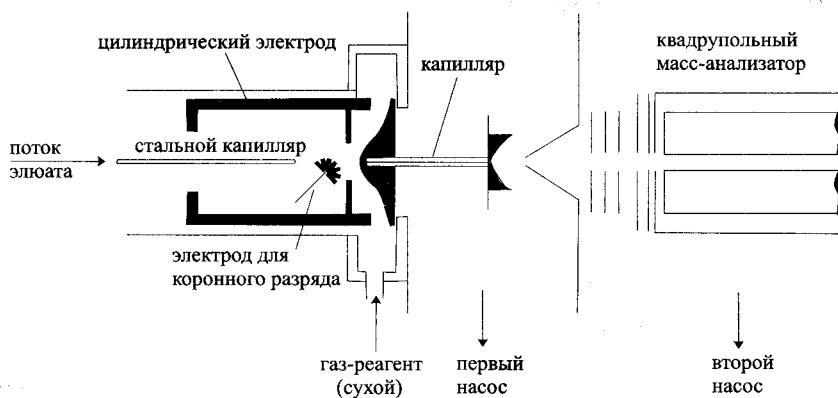


Рис. 5.51. Сопряжение жидкостного хроматографа и масс-спектрометра посредством электрораспыления или химической ионизации при атмосферном давлении.

Метод химической ионизации при атмосферном давлении с аппаратурной точки зрения очень похож на метод электрораспыления. Оба вида сопряжения хроматографа и масс-спектрометра можно реализовать в одном техническом устройстве (рис. 5.51). В методе химической ионизации распыление потока элюата осуществляют пнев-

матически. Полученный аэрозоль смешивают с газом-реагентом, а источником ионизации служит коронный электрический разряд.

## Сочетание газовой хроматографии и ИК-спектроскопии

Для детектирования в газовой хроматографии посредством ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием используют газовую кювету — стеклянный капилляр длиной от 10 до 40 см и внутренним диаметром 1–3 мм. Внутренние стенки капилляра покрыты слоем золота, поэтому при прохождении через капилляр светового потока наблюдается многократное отражение (рис. 5.52). Для предотвращения конденсации паров определяемого вещества газовую кювету непрерывно обогревают током горячего газа с температурой до 300°C.

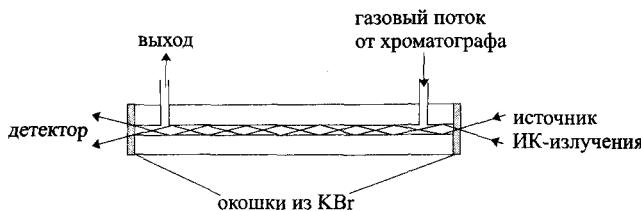


Рис. 5.52. Устройство газовой кюветы для сопряжения газовой хроматографии и ИК-спектроскопии с фурье-преобразованием.

Для регистрации поглощения в ИК-области используют высокочувствительные детекторы, например, на основе теллурида кадмия–ртути. Их охлаждают жидким азотом.

Для регистрации хроматографических пиков применяют универсальный неразрушающий детектор, обычно катарометр. Как и при использовании масс-спектрометрического детектирования, при ИК-детектировании возможно регистрировать как общую величину поглощения, так и поглощение при определенных длинах волн, а также ИК-спектров целиком. Однако, если использовать полученные ИК-спектры для идентификации веществ, то следует иметь в виду, что библиотечные ИК-спектры, как правило, относятся к веществам в жидком или твердом состоянии. В газовой же фазе спектры содержат дополнительные полосы, обусловленные вращательными переходами молекул. Напротив, полосы, обусловленные межмолекулярными взаимодействиями, например, водородными связями, в газовой фазе, как правило, не наблюдаются.

## Другие способы сочетания

Существуют и другие способы сочетания хроматографических и спектроскопических методов. О некоторых из них, например, о сочетании жидкостной хроматографии и УФ-спектроскопии с многоканальной регистрацией, мы уже упоминали (рис. 5.25).

В газовой хроматографии используют и сочетание с атомно-эмиссионным детектированием (раздел 5.2). В этом случае поток газа-носителя поступает через нагретый капилляр непосредственно в плазму. В газовой хроматографии обычно используют атомизатор на основе микроволновой, а в жидкостной — на основе индуктивно-связанной плазмы. Хроматография с атомно-эмиссионным детектированием — очень удобный способ определения *отдельных химических форм* какого-либо элемента. В разделе, посвященном анализу объектов окружающей среды (8.1), мы рассмотрим пример определения отдельных форм мышьяка (рис. 8.5).

Сочетание ВЭЖХ с атомно-абсорбционным детектированием осуществить особенно просто при использовании гидридной техники для определения элементов, образующих летучие гидриды (раздел 3.2.1).

Возможные комбинации различных методов анализа не ограничиваются лишь сочетанием методов хроматографии и спектроскопии. Можно комбинировать между собой отдельные хроматографические методы. Аналогично, возможны и сочетания спектроскопических методов, например, в форме тандемной масс-спектрометрии (см. раздел 3.5). Следует ожидать, что в будущем появятся новые гибридные методы, сочетающие в себе уже несколько хроматографических и спектроскопических методов в различных комбинациях.

## 5.6. Литература

- G.Schomburg, Gaschromatographie — Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik, VCH, Weinheim, 1987.
- G.Guichon, L.Guillemin, Quantitative Gas Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- K.K.Unger (Hrsg.), Handbuch der HPLC, Teil 1 bis 3, GIT-Verlag, Darmstadt, 1986.
- L.R.Snyder, J.L.Glajch, J.J.Kirkland, Practical HPLC Method Development, Wiley, New York, 1988.



K.Zielow, H.-P.Frey, Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie — Grundlagen und Praxis, VCH, Weinheim, 1993.

H.Engelhardt, W.Beck, T.Schmitt, Kapillarelektrophorese, Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994.



## ГЛАВА 6

## ХЕМОМЕТРИКА

Сейчас компьютер стал неотъемлемой деталью любой химико-аналитической лаборатории. В современных аналитических приборах компьютер служит средством управления, обработки, хранения и интерпретации данных. Даже простое представление данных в графической форме и их численную обработку уже трудно себе представить без помощи компьютера.

Применение компьютеров в аналитической химии и осуществляемые с их помощью математические и статистические методы обработки данных составляют предмет особого раздела аналитической химии, называемого *хемометрикой*.

В разделе 1.3 мы уже кратко касались простейших статистических приемов обработки химико-аналитических данных. Однако для осуществления всестороннего контроля качества результатов следует использовать и ряд более сложных методов. К ним в первую очередь относятся разнообразные статистические тесты, применяемые для проверки результатов анализа в соответствии с определенными алгоритмами.

Методы хемометрики незаменимы, когда требуется выделить полезный сигнал на фоне шумов, оптимизировать методику анализа или обработать информацию, представленную в виде многомерного массива данных — спектра, хроматограммы или хроматоспектра (см. раздел 5.5).

### 6.1. Компьютерно-ориентированные методы обеспечения качества результатов анализа

В основе всех понятий, характеризующих качество результатов анализа или методик таких, как точность, чувствительность и т.д., так или иначе лежит представление о *случайном характере* результатов измерения. Их случайный характер проявляется в том, что при многократном повторении измерительного процесса каждый раз будет получено, вообще говоря, другое значение. При этом между отдельными значениями может наблюдаться или не наблюдаться

какая-либо зависимость. Мы рассмотрим лишь методы анализа не-коррелированных, т.е. независимых друг от друга, данных. Для исследования *коррелированных данных*, которые, в частности, могут встретиться в ходе производственного анализа (ряд значений концентрации продукта, закономерно изменяющихся с течением времени), используют специальные методы, например, анализ временных рядов.

## Распределение случайных величин

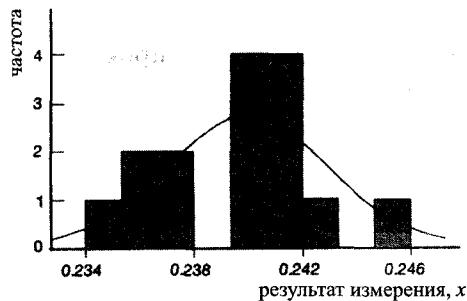


Рис. 6.1. Представление частот попадания данных из табл. 6.1 в интервалы значений в виде гистограммы и теоретическое распределение частот (кривая Гаусса).

в соответствии с табл. 6.1. Графически данные табл. 6.2 можно представить в виде гистограммы (рис. 6.1).

Таблица 6.1. Результаты повторных измерений оптической плотности одного и того же раствора. Среднее значение равно 0,2397.

Измерение	Значение	Измерение	Значение
1	0,2350	9	0,2410
2	0,2400	10	0,2419
3	0,2379	11	0,2410
4	0,2400	12	0,2430
5	0,2360	13	0,2418
6	0,2370	14	0,2360
7	0,2400	15	0,2400
8	0,2450		

При неограниченном увеличении числа измерений и, соответственно, неограниченном сужении интервалов значений эксперимен-



тальная гистограмма в пределе превратится в плавную колоколообразную кривую, называемой кривой *гауссова* или *нормального распределения* (рис. 6.1). Математически кривая нормального распределения описывается следующим уравнением:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}, \quad (6.1)$$

где:  $f(x)$  — относительная частота (плотность вероятности),

$\sigma$  — стандартное отклонение,

$\mu$  — среднее значение,

$x$  — результат измерения или, в общем случае, произвольная случайная переменная.

Таблица 6.2. Частота попадания данных из табл. 6.1 в интервалы значений.

Интервал значений	Частота (число данных)	Относительная частота, %
0, 2340–0, 2353	1	6, 67
0, 2353–0, 2367	2	13, 33
0, 2367–0, 2380	2	13, 33
0, 2380–0, 2393	0	0
0, 2393–0, 2407	4	26, 67
0, 2407–0, 2420	4	26, 67
0, 2420–0, 2433	1	6, 67
0, 2433–0, 2447	0	0
0, 2447–0, 2460	1	6, 67

Среднее значение характеризует *положение*, а стандартное отклонение — форму (ширину) гауссовой кривой, т.е. *разброс* данных (рис. 6.2).

По традиции в статистике греческими буквами (в данном случае —  $\mu$  и  $\sigma$ ) принято обозначать параметры, относящиеся к бесконечной (генеральной) совокупности данных. При наличии конечного числа данных можно рассчитать лишь приближенные, случайные оценки этих параметров. Они обычно обозначаются соответствующими латинскими буквами (за исключением среднего, которое обозначается при помощи черты над символом переменной). С использованием таких оценочных значений кривую Гаусса можно приблизенно описать как

$$f(x) \approx \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2s^2}}, \quad (6.2)$$

где  $s$  — оценка стандартного отклонения,

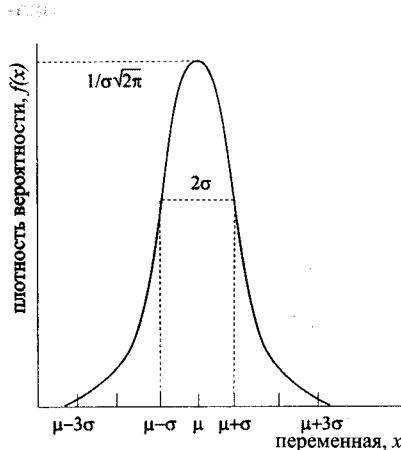
$\bar{x}$  — оценка среднего значения.

При наличии серии из  $n$  результатов эти оценки вычисляются следующим образом (см. уравнения (1.5) и (1.6)):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (6.3)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}. \quad (6.4)$$

## Другие статистические распределения



**Рис. 6.2.** Кривая плотности вероятности нормального распределения (уравнение (6.1)) для среднего значения  $\mu$  и стандартного отклонения  $\sigma$ .

(раздел 3.2.3), то распределение таких данных, как правило, хорошо описывается моделью *распределения Пуассона*. Однако в большинстве случаев при достаточно большом числе данных (измерений) подобные модели приближаются к нормальному распределению.

Среди специальных типов распределений в математической статистике большую роль играют те, которые используются при проведении *статистических тестов*. К ним в первую очередь относятся *F*- и *t*-распределения.

Нормальное распределение — не единственная математическая модель, которая может описывать статистическое распределение результатов измерения (и вообще случайных величин). Например, вероятность обнаружить в партии из определенного числа изделий, среди которых могут быть хорошие и бракованные, заданное число хороших изделий описывается моделью *биномиального распределения* (см. также уравнение (2.160)). Если результат измерения представляет собой определенное число относительно редко происходящих событий, например, число импульсов, регистрируемых пропорциональным счетчиком

## Другие характеристики положения и разброса данных

Для характеристики положения и разброса данных чаще всего используют, соответственно, среднее значение (уравнение (6.3)) и стандартное отклонение (уравнение (6.4)). Однако можно использовать и другие характеристики.

Так, при клинических испытаниях вместо среднего часто используют *медиану*. Медиана представляет собой среднее *по порядку* значение в серии данных, упорядоченных по возрастанию. Для данных, приведенных в табл. 6.1, медиана равна 0,2400. Для несимметрично распределенных данных медиана является более реалистичной оценкой, чем среднее. Для симметричных распределений медиана и среднее (в пределе) совпадают.

Для характеристики разброса данных можно, наряду со стандартным отклонением и его квадратом (дисперсией), использовать величину, называемую *размахом* серии. Она представляет собой разность между наибольшим и наименьшим значением. Для данных из табл. 6.1 размах составляет  $0,2450 - 0,2350 = 0,0100$ .

## Статистические тесты и критерии проверки гипотез

### Нормированное гауссово распределение

Обычно при статистической проверке результатов химического анализа исходят из того, что они подчиняются нормальному (гауссово-му) распределению. Для удобства в качестве стандартного распределения используют так называемое нормированное гауссово распределение, для которого среднее равно 0, а стандартное отклонение — 1. Чтобы произвольное гауссово распределение с параметрами  $\mu$  и  $\sigma$  преобразовать к нормированному, вводят новую переменную  $z$ , равную

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma}. \quad (6.5)$$

При обработке экспериментальных данных вместо  $\mu$  и  $\sigma$  используют их оценки  $\bar{x}$  и  $s$ .

В результате подстановки выражения (6.5) в общее уравнение нормального распределения (6.1) получаем следующее выражение для математической модели нормированного гауссова распределения:

$$f(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}}. \quad (6.6)$$

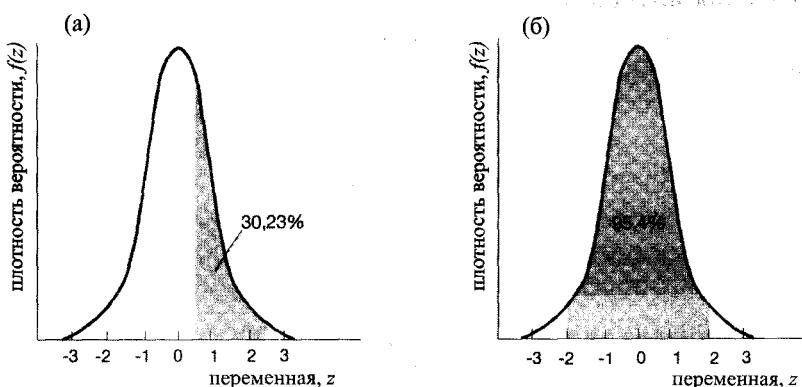


Рис. 6.3. Примеры интегрирования функции нормального распределения в заданных пределах: между значениями  $z$  от 0,5 до 2,5 (а) и от -2 до 2 (б).

Как видно из рис. 6.2, вероятность появления значений, сильно отличающихся от среднего (например, более, чем на  $3\sigma$ ), довольно мала. Для любой заданной вероятности  $P$  можно определить интервал значений, в который величина попадет с вероятностью  $P$ .

Соответственно, вероятность того, что величина не попадет в этот интервал, равна  $\alpha = 1 - P$ . Вероятность  $P$  равна площади участка под кривой распределения в заданных границах. Эту вероятность можно рассчитать, используя интеграл от функции нормированного гауссова распределения (интеграл Гаусса). График этой функции приведен на рис. 6.4.

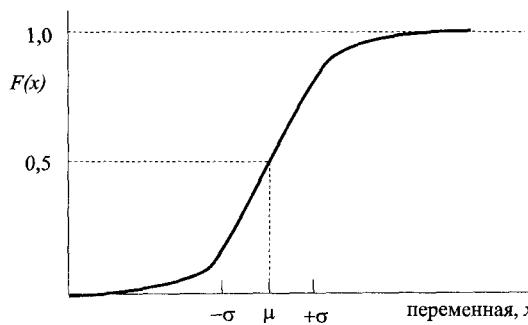


Рис. 6.4. Интеграл от функции нормированного гауссова распределения.

**Пример.** Какова вероятность того, что результат измерения окажется между значениями 27,5 и 37,5, если среднее значение равно  $\mu = 25,0$ , а дисперсия  $\sigma^2 = 25,0$ ?

Преобразуем данные в соответствии с формулой (6.5):

$$z_1 = \frac{27,5 - 25,0}{\sqrt{25,0}} = 0,5, \quad z_2 = \frac{37,5 - 25,0}{\sqrt{25,0}} = 2,5.$$

Значения интеграла Гаусса для 0,5 и 2,5 (которые можно взять из соответствующих таблиц, так как эта функция не выражается через элементарные функции) равны, соответственно, 0,99379 и 0,69146. Искомая вероятность равна  $0,99379 - 0,69146 = 0,30233$ , или 30,23% (см. рис. 6.3 (а)).

В табл. 6.3 приведены некоторые практические важные значения вероятностей нахождения величины в тех или иных интервалах. Один из этих случаев (нахождение величины в интервале  $\mu \pm 2\sigma$ ) графически проиллюстрирован на рис. 6.3 (б).

**Таблица 6.3.** Вероятности нахождения случайной величины в некоторых границах.

Границы значений $x$ $x_1$	$x_2$	Вероятность попадания в интервал $P$ , %	Вероятность непопадания в интервал $\alpha$ , %
$\mu - 1\sigma$	$\mu + 1\sigma$	68,3	31,7
$\mu - 2\sigma$	$\mu + 2\sigma$	95,4	4,6
$\mu - 3\sigma$	$\mu + 3\sigma$	99,7	0,3
$\mu - 1,96\sigma$	$\mu + 1,96\sigma$	95,0	5,0
$\mu - 2,58\sigma$	$\mu + 2,58\sigma$	99,0	1,0
$\mu - 3,29\sigma$	$\mu + 3,29\sigma$	99,9	0,1

В химическом анализе для проверки результатов чаще всего используют значения  $P$ , равные 0,95 или 0,99.

Еще раз отметим, что распределение Гаусса строго применимо лишь для описания бесконечно большой серии данных, для которой величины  $\mu$  и  $\sigma$  известны *точно*. Если же известны лишь их *приближенные оценки*  $\bar{x}$  и  $s$ , то для расчета вероятностей и соответствующих им границ значений вместо распределения Гаусса следует использовать распределение Стьюдента (*t*-распределение). Оно очень часто используется в различных статистических тестах.

### Сравнение среднего значения и константы: простой *t*-тест Стьюдента

Экспериментальное среднее значение, рассчитанное из конечного числа данных — случайных значений, также является случайной величиной. Поэтому для проверки любых предположений о возможном значении среднего следует использовать *статистические тесты проверки гипотез*. Отметим, что любой статистический тест может подтвердить или отвергнуть выдвигаемую гипотезу лишь с некоторой *статистической вероятностью*.

Для сравнения экспериментального среднего  $\bar{x}$  для конечного числа данных и среднего  $\mu$  для бесконечного числа данных (или какой-либо иной постоянной, точно известной величиной) используют простой  $t$ -тест Стьюдента. Условием его применимости является подчинение исходных данных (значений  $x$ ) нормальному распределению.

Выдвинем гипотезу  $H_0$  о том, что величины  $\bar{x}$  и  $\mu$  представляют собой, по сути, одно и то же значение, а возможное различие между ними носит чисто *случайный* характер. Назовем эту гипотезу *нуль-гипотезой* и символически запишем ее как  $\bar{x} = \mu$ . Подчеркнем, что знак равенства здесь не следует понимать в буквальном, «арифметическом» смысле: численно величины  $\bar{x}$  и  $\mu$  могут различаться, знак равенства символизирует лишь то, что это отличие не выходит за рамки случайного.

*Альтернативная* гипотеза  $H_1$  состоит в том, что различие между  $\bar{x}$  и  $\mu$  не случайно. Это утверждение можно символически записать как  $\bar{x} \neq \mu$ .

Поскольку проверка гипотез носит статистический характер, всегда существует вероятность ошибочно принять или отвергнуть как нуль-гипотезу, так и альтернативную гипотезу. Как правило, заранее задают некоторую достаточно малую допустимую вероятность ошибочно принять альтернативную гипотезу (или, что то же самое, ошибочно отвергнуть нуль-гипотезу). Эту вероятность, называемую *уровнем значимости*, обозначают  $\alpha$  и обычно выбирают равной 0,05 или 0,01 (см. табл. 6.3).

Простой  $t$ -тест Стьюдента для проверки гипотезы о различии между средним  $\bar{x}$  и постоянной величиной  $\mu$  начинается с вычисления величины  $t$ , называемой *тестовой статистикой*:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n}, \quad (6.7)$$

где  $s$  — оценка стандартного отклонения той серии данных,

из которой рассчитана величина  $\bar{x}$ ;

$n$  — число данных в этой серии:

Затем рассчитанное значение  $t$  сравнивают с табличным критическим значением функции  $t$ -распределения для выбранного уровня значимости  $\alpha$  и числа степеней свободы  $f = n - 1$  (табл. 6.4). Если рассчитанное значение не превышает табличного, принимают нуль-гипотезу, в противном случае — альтернативную гипотезу.

**Пример.** Для стандартного образца сточной воды было выполнено три параллельных определения содержания фенола. Среднее

значение составило  $\bar{x} = 0,513 \text{ мг/л}$ , а стандартное отклонение  $s = 0,05 \text{ мг/л}$ . Аттестованное содержание фенола в образце составляло  $\mu = 0,52 \text{ мг/л}$ . Можно ли утверждать, что погрешность определения носит случайный характер? Уровень значимости  $\alpha = 0,05$ .

Сформулируем нуль-гипотезу и альтернативную гипотезу.

$$H_0 : \bar{x} = \mu,$$

$$H_1 : \bar{x} \neq \mu,$$

$$t = \frac{|0,513 - 0,52|}{0,05} \sqrt{3} = 0,242.$$

Из табл. 6.4 находим критическое значение (для двустороннего теста)  $t(\alpha = 5\%, f = 2) = 4,303$ . Поскольку рассчитанное значение меньше критического, различие между величинами незначимо, т.е. случайно.

В этом примере мы использовали тест Стьюдента в двустороннем варианте, поскольку нас интересовало, есть ли вообще значимое различие (в любую сторону) между сравниваемыми величинами. Односторонний вариант теста следует применять в тех случаях, когда важно выяснить, превышает или нет экспериментальное значение некоторую заданную величину. Можно ли, например, из приведенных данных утверждать, что содержание фенола превышает предельно допустимую для стран Европейского Союза величину, равную  $0,5 \text{ г/л}$ ? В этом случае нуль-гипотеза и альтернативная гипотеза будут выглядеть так:

$$H_0 : \bar{x} \leq \mu,$$

$$H_1 : \bar{x} > \mu,$$

$$t = \frac{|0,513 - 0,5|}{0,05} \sqrt{3} = 0,45.$$

Теперь (односторонний вариант теста!) табличное значение равно  $t(\alpha = 5\%, f = 2) = 2,920$ . И в этом случае рассчитанное значение также меньше критического. Утверждать о превышении предельно допустимой концентрации нет оснований.

### Сравнение двух средних значений: расширенный $t$ -тест Стьюдента

Сравнение двух средних значений  $\bar{x}_1$  и  $\bar{x}_2$  производится аналогично сравнению среднего и константы. Для этого случая тестовая стати-

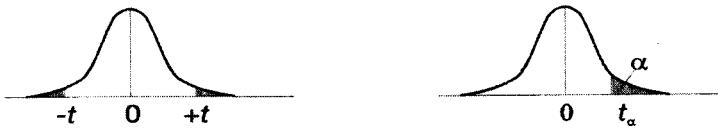
стика вычисляется как

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_d} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}. \quad (6.8)$$

Здесь:  $n_1, n_2$  — числа значений в сериях данных, из которых рассчитаны, соответственно,  $\bar{x}_1$  и  $\bar{x}_2$ ;  $s_d$  — среднее стандартное отклонение, вычисляемое как

$$s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}.$$

**Таблица 6.4.** Критические значения для двустороннего и одностороннего  $t$ -теста Стьюдента для различных уровней значимости  $\alpha$  и чисел степеней свободы  $f$  от 1 до 20.



Двусторонний $t$ -тест Стьюдента			Односторонний $t$ -тест Стьюдента		
$f$	$\alpha = 5\%$	$\alpha = 1\%$	$f$	$\alpha = 5\%$	$\alpha = 2,5\%$
1	12,706	63,657	1	6,314	12,706
2	4,303	9,925	2	2,920	4,303
3	3,182	5,841	3	2,353	3,182
4	2,776	4,604	4	2,132	2,776
5	2,571	4,032	5	2,015	2,574
6	2,447	3,707	6	1,943	2,447
7	2,365	3,499	7	1,895	2,365
8	2,306	3,355	8	1,860	2,306
9	2,262	3,250	9	1,833	2,262
10	2,228	3,169	10	1,812	2,228
11	2,201	3,106	11	1,796	2,201
12	2,179	3,055	12	1,782	2,179
13	2,160	3,012	13	1,771	2,160
14	2,145	2,977	14	1,761	2,145
15	2,131	2,947	15	1,753	2,131
16	2,120	2,921	16	1,746	2,120
17	2,110	2,898	17	1,740	2,110
18	2,101	2,878	18	1,734	2,101
19	2,093	2,861	19	1,729	2,093
20	2,086	2,845	20	1,725	2,086



Нуль-гипотеза о равенстве значений  $\bar{x}_1$  и  $\bar{x}_2$  (точнее говоря, о том, что их возможное различие носит лишь случайный характер) принимается, если рассчитанное значение  $t$  не превышает табличную величину  $t(\alpha, f = n_1 + n_2 - 2)$ .

Предпосылкой применения расширенного  $t$ -теста, помимо подчинения исходных данных нормальному закону распределения, является однородность дисперсий  $s_1^2$  и  $s_2^2$ . Термин «однородность» означает отсутствие значимого различия, т. е. тот факт, что возможное различие между численными величинами дисперсий можно объяснить лишь случайными причинами. Символически это можно записать как  $s_1^2 = s_2^2$ , если понимать знак равенства так же, как в выражении  $\bar{x} = \mu$  (см. выше). Гипотезу об однородности двух дисперсий проверяют при помощи еще одного статистического теста, называемого  $F$ -тестом Фишера.

### Сравнение двух дисперсий: $F$ -тест Фишера

Для сравнения двух дисперсий применяют  $F$ -тест Фишера. Тестовая статистика в этом случае обозначается как  $F$  и вычисляется как отношение большей по величине дисперсии к меньшей:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (s_1^2 > s_2^2). \quad (6.9)$$

Как и при использовании теста Стьюдента, нуль-гипотеза  $s_1^2 = s_2^2$  принимается, если рассчитанное значение  $F$  меньше критической табличной величины  $F$  для заданного уровня значимости  $\alpha$  и чисел степеней свободы  $f_1 = n_1 - 1$  и  $f_2 = n_2 - 1$ . Критические табличные величины  $F$ -распределения для уровней значимости 1% и 5% приведены в табл. 6.5.

### Сравнение нескольких средних значений: простой дисперсионный анализ

Помимо сравнения *одного* среднего значения с константой (уравнение (6.7)) и *двух* средних значений между собой (уравнение (6.8)), часто возникает необходимость сравнения *нескольких* (более двух) средних значений. Предположим, что в одном и том же образце питьевой воды определяли содержание нитратов в четырех различных лабораториях. В каждой лаборатории выполнили по три параллельных определения и рассчитали среднее значение (табл. 6.6). Средние значения, полученные в различных лабораториях, находятся в диапазоне от 10,20 до 10,77 мг/л.

Таблица 6.5. Критические значения для  $F$ -теста Фишера для уровня значимости  $\alpha = 0,05$  (светлым шрифтом) и различных чисел степеней свободы  $f_1$  и  $f_2$ .

$f_2$	$f_2 = 1$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	20	50	$\infty$
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	248	252	254
	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6106	6208	6302	6366
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,33	19,36	19,37	19,38	19,39	19,41	19,44	19,47	19,50	
	98,49	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39	99,40	99,42	99,45	99,48	99,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,88	8,84	8,81	8,78	8,74	8,66	8,58	8,53
	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,34	27,23	27,05	26,65	26,35	26,12
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,80	5,70	5,63
	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,54	14,37	14,02	13,69	13,46
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,78	4,74	4,68	4,56	4,44	4,36
	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,45	10,29	10,15	10,05	9,89	9,55	9,24	9,02
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,87	3,75	3,67
	13,74	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,72	7,40	6,88	
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,63	3,57	3,44	3,32	3,23
	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	7,00	6,84	6,71	6,62	6,47	6,16	5,87	5,65
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,34	3,28	3,15	3,03	2,93
	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,19	6,03	5,91	5,82	5,67	5,36	5,08	4,86
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,13	3,07	2,93	2,80	2,71
	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,62	5,47	5,35	5,26	5,11	4,81	4,53	4,31
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,97	2,91	2,77	2,64	2,54
	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,21	5,06	4,95	4,85	4,71	4,41	4,13	3,91
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,92	2,85	2,80	2,76	2,69	2,54	2,41	2,30
	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,65	4,50	4,39	4,30	4,16	3,86	3,58	3,36
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,12	1,96	1,84
	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37	3,23	2,94	2,65	2,42
50	4,04	3,19	2,80	2,57	2,41	2,30	2,23	2,14	2,08	2,04	1,96	1,80	1,61	1,45
	7,20	5,08	4,22	3,74	3,45	3,21	3,04	2,91	2,81	2,72	2,58	2,29	1,98	1,70
$\mu$	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,57	1,36	1,00
	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32	2,18	1,88	1,53	1,00

Таблица 6.6. Значения концентраций нитрат-ионов (мг/л) в пробе питьевой воды, определенные в четырех различных лабораториях.

Измерение	Лаборатория			
	1	2	3	4
1	10,2	10,6	10,3	10,5
2	10,4	10,8	10,4	10,7
3	10,0	10,9	10,7	10,4
Среднее	10,20	10,77	10,47	10,53

Установить, является ли различие между средними величинами случайнм или нет, можно при помощи *простого дисперсионного анализа*. В суммарный разброс данных вносит вклад разброс данных внутри лаборатории и между лабораториями. Охарактеризуем суммарный разброс данных в виде дисперсии  $s^2$  и представим ее как сумму межлабораторной дисперсии  $s_L^2$  и внутрилабораторной (остаточной) дисперсии  $s_R^2$ :

$$s^2 = s_L^2 + s_R^2, \quad (6.10)$$

где  $s^2 = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x})^2$ ,  $s_L^2 = \sum_{j=1}^q n_j (\bar{x}_j - \bar{x})^2$ ,  $s_R^2 = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$ ,

$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}$  — общее среднее,

$n = \sum_{j=1}^q n_j$  — общее число измерений,

$q$  — число лабораторий,

$n_j$  — число параллельных измерений, выполненных в  $j$ -й лаборатории,

$x_{ij}$  — результат  $i$ -го измерения, выполненного в  $j$ -й лаборатории,

$\bar{x}_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}$  — среднее значение для  $j$ -й лаборатории.

Нуль-гипотезой является предположение о том, что различие между всеми средними значениями случайно. Для ее проверки применяют  $F$ -тест. Тестовая статистика в этом случае (ср. уравнение (6.9)) вычисляется как

$$F = \frac{s_L^2 / (q - 1)}{s_R^2 / (n - q)}. \quad (6.11)$$

Рассчитанную величину сравнивают с табличным значением для чисел степеней свободы  $f_1 = q - 1$  и  $f_2 = n - q$ . Для результатов опреде-

ления нитратов, представленных в табл. 6.6, соответствующие дисперсии приведены в табл. 6.7. Экспериментальное значение  $F$ , в соответствии с уравнением (6.11), равно

$$F = \frac{0,489/(4-1)}{0,260/(12-4)} = 5,02.$$

Эта величина больше, чем табличное значение  $F(\alpha = 0,05; f_1 = 3; f_2 = 8) = 4,07$ . Таким образом, различие между результатами, полученными в разных лабораториях, не случайно. Данные, представленные по крайней мере одной лабораторией, содержат систематическую погрешность.

**Таблица 6.7.** Величины для проведения дисперсионного анализа, рассчитанные из данных табл. 6.6

Источник разброса данных	Число степеней свободы	Дисперсия
Между лабораториями, $s_L^2$	3	0,489
Внутри лабораторий, $s_R^2$	8	0,260
Всего, $s^2$	11	0,749

При помощи простого дисперсионного анализа можно выявить влияние лишь одного фактора. В нашем случае это различия в условиях анализа в разных лабораториях. Однако на результаты анализа могут оказывать влияние несколько факторов одновременно. Так, наряду с межлабораторными эффектами могут иметь место факторы, связанные с отдельными лаборантами или приборами и т.д. Все эти эффекты могут быть выявлены и оценены при помощи более сложных вариантов дисперсионного анализа — *многоуровневого или многофакторного*.

## 6.2. Обработка сигналов: цифровая фильтрация, преобразование данных

### Отношение сигнал–шум

В ходе эксперимента любой сигнал искажается случайными помехами, называемыми шумами. На рис. 6.5 показано воздействие шумов на сигнал прямоугольной формы.

В простейшем случае средний уровень шумов  $R$  постоянен и не зависит от величины полезного сигнала  $S$ . Поэтому чем меньше величина полезного сигнала, тем больше относительная погрешность,

вносимая шумами. Таким образом, отношение сигнала к шуму служит более хорошей характеристикой качества результата измерения, чем абсолютная величина уровня шумов. Отношение сигнал-шум можно охарактеризовать как отношение средней величины полезного сигнала  $\bar{y}$  к стандартному отклонению сигнала  $s_y$ :

$$\frac{S}{R} = \frac{\bar{y}}{s_y}. \quad (6.12)$$

Как показывает опыт, при отношении сигнал-шум меньшем, чем 2–3, качество результатов оказывается совершенно неудовлетворительным. Для увеличения отношения сигнал-шум используют специальные способы обработки данных. Самый простой из них — *накопление* сигнала посредством суммирования и усреднения результатов многократных измерений. При  $n$ -кратном повторении измерения отношение сигнал-шум  $S/R$  по сравнению с исходным значением  $(S/R)_0$  увеличивается в  $\sqrt{n}$  раз:

$$\frac{S}{R} = \sqrt{n} \left( \frac{S}{R} \right)_0. \quad (6.13)$$

Другой способ увеличения отношения сигнал-шум заключается в использовании специальных *фильтров*.

### Аналоговые и цифровые фильтры

При обработке аналитических данных, представленных в виде некоторой непрерывной зависимости — спектров, хроматограмм и т.д. — возникают следующие основные задачи.

- Увеличение интенсивности полезного сигнала по сравнению с шумами.
- Дифференцирование данных с целью подавления сигнала фона и улучшения разрешения пиков.
- Интегрирование данных для нахождения площади пиков.

Все эти задачи можно решить с помощью методов, называемых фильтрацией данных. Первоначально для этой цели использовали

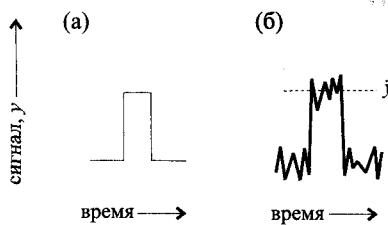


Рис. 6.5. Теоретическая форма сигнала прямоугольной формы (а) и экспериментальный зашумленный сигнал (б).

специальные аппаратные средства, называемые аналоговыми фильтрами. Сейчас ввиду широкого распространения компьютеров, непосредственно сопряженных с аналитическими приборами, преобладают численные методы фильтрации. Соответствующее программное обеспечение называется цифровыми фильтрами.

Цифровые фильтры устойчивее аналоговых. Они не подвержены воздействию электронных шумов. Поскольку данные с прибора обычно поступают в цифровой форме, их преобразование можно осуществить немедленно. Цифровые фильтры можно легко заменять и модифицировать для решения определенных конкретных задач.

### *Фильтрация при помощи скользящего среднего*

Простейший численный метод подавления шумов называется методом скользящего среднего. Фильтр представляет собой окно постоянной, заранее выбранной ширины, перемещаемое вдоль спектра (хроматограммы). Необходимо, чтобы данные (отдельные точки) находились на равных расстояниях друг от друга. Данные, находящиеся внутри окна, усредняются. Таким образом, при ширине фильтра  $2m + 1$  точек исходные данные  $y_k$  заменяются средними

$$y'_k = \frac{1}{2m + 1} \sum_{j=-m}^{j=m} y_{k+j}, \quad (6.14)$$

где  $k$  — индекс обрабатываемого значения,  $2m + 1$  — число данных, используемых для усреднения (ширина фильтра).

За счет усреднения данных уровень шумов уменьшается. Однако этот метод не позволяет уменьшить величину временного дрейфа результатов, если он присутствует. Ширину фильтра следует выбирать так, чтобы не исказить общую структуру данных. На рис. 6.6 показаны результаты фильтрации данных с применением 5-точечного и 11-точечного фильтра. Уже при ширине фильтра 5 точек форма пиков заметно искажается (кривая 1). При ширине 11 точек этот эффект выражен еще сильнее (кривая 2).

### *Полиномиальное сглаживание: фильтр Савицкого–Голея*

В методе скользящего среднего все данные усредняются с одним и тем же коэффициентом, равным  $1/(2m + 1)$ . Более эффективное сглаживание данных можно осуществить при помощи фильтров, использующих взвешенное усреднение. Веса можно выбрать так, чтобы аппроксимировать данные многочленом второй степени. Этот метод сглаживания называется фильтрацией по Савицкому–Голею.

При ширине фильтра  $2m + 1$  точек средние значения равны

$$y'_k = \frac{1}{NORM} \sum_{j=-m}^{j=m} c_j y_{k+j}. \quad (6.15)$$

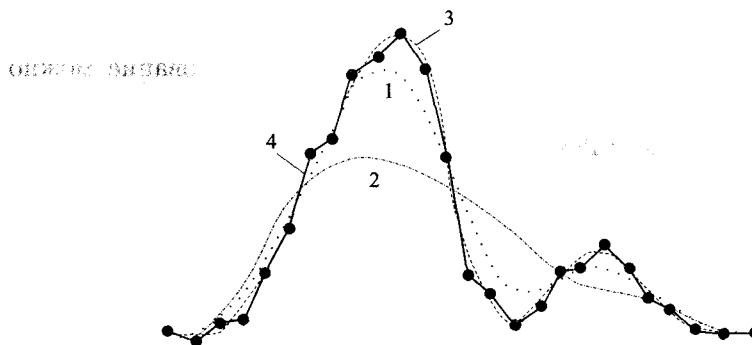


Рис. 6.6. Сглаживание данных при помощи различных цифровых фильтров. 1 — скользящее среднее, 5 точек; 2 — скользящее среднее, 11 точек; 3 — фильтр Савицкого-Голея, 5 точек; 4 — интерполяционный фильтр.

Весовые коэффициенты  $c_j$  для фильтров различной ширины табулированы (табл. 6.8). Значение  $NORM$  равно сумме всех величин  $c_j$ . Кривая 3 рис. 6.6 демонстрирует применение к исходным данным фильтра Савицкого-Голея шириной 5 точек. По сравнению с фильтрацией методом скользящего среднего с той же шириной окна структура исходных данных сохраняется значительно лучше.

Для выбора подходящего фильтра можно пользоваться следующими правилами.

- Ширина фильтра должна быть приблизительно равна половине ширины пика (полосы). Если ширина фильтра слишком мала, сглаживание будет недостаточным. В случае слишком широкого фильтра форма пиков искажается (рис. 6.6).
- Искажение пиков меньше сказывается на их площади, чем на их высоте. Поэтому, если требуется вычислить лишь площади пиков, ширину фильтра можно выбрать побольше.
- При многократном применении одного и того же фильтра наибольший эффект сглаживания ( $> 95\%$ ) достигается при первой фильтрации. Поэтому обычно бывает достаточно применить фильтр только один раз.

**Таблица 6.8.** Весовые коэффициенты для сглаживающих фильтров Савицкого–Голея различной ширины (см. уравнение (6.15)).

Ширина фильтра (число точек)	15	13	11	9	7	5		
–7	–78							
–6		–13	–11					
–5			42	0	–36			
–4			87	9	9	–21		
–3			122	16	44	14	–2	
–2			147	21	69	39	3	–3
–1			162	24	84	54	6	12
0			167	25	89	59	7	17
1			162	24	84	54	6	12
2			147	21	69	39	3	–3
3			122	16	44	14	–2	
4			87	9	9	–21		
5			42	0	–36			
6			–13	–11				
7			–78					
<i>NORM</i>	105	143	429	231	21	35		

Существуют и специальные *рекурсивные* фильтры, использующие уже сглаженные данные и позволяющие осуществлять быструю фильтрацию непосредственно в процессе регистрации данных. Среди рекурсивных фильтров чаще всего используют *фильтр Калмана*.

### Дифференцирование и интегрирование данных

Фильтр Савицкого–Голея может быть использован и для дифференцирования или интегрирования данных. Для этого следует лишь соответствующим образом выбрать весовые коэффициенты. Численные методы дифференцирования и интегрирования сигналов широко применяются в стандартном математическом обеспечении аналитических приборов.

Дифференцирование позволяет устраниТЬ *постоянный сигнал фона* и улучшить *разрешение пиков*. Интегрирование пиков необходимо для нахождения их площади в количественном анализе.

### Фильтрация данных с предварительным преобразованием сигнала

Существуют методы фильтрации, основанные на предварительном математическом преобразовании данных, последующем умножении

результата на некоторую фильтрующую функцию и, наконец, обратном преобразовании. Чаще всего для этого используют фурье-преобразование, о котором мы упоминали в связи с ИК- и ЯМР-спектроскопией.

### Фурье-преобразование

Рассмотрим принцип фурье-преобразования на примере электромагнитных спектров. Обычная форма представления спектра — зависимость интенсивности от частоты излучения. Однако любой спектр можно представить и как зависимость интенсивности от времени. В этом случае он выглядит как суперпозиция периодических синусоидальных колебаний. На рис. 6.7 показано представление спектра, состоящего из двух линий (частот), в разных формах.

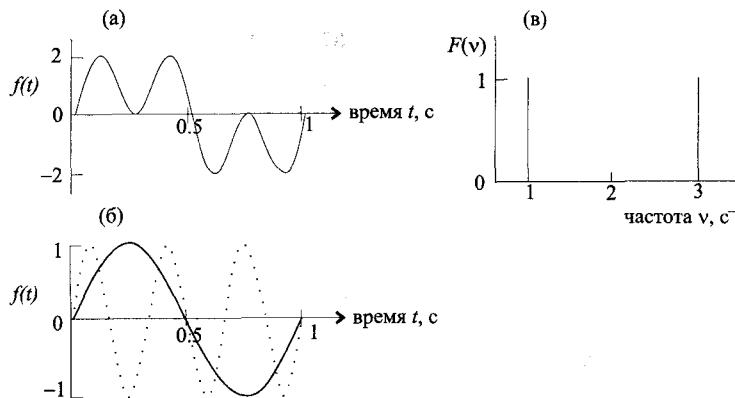


Рис. 6.7. Принцип фурье-преобразования. Суммарный сигнал (а) состоит (б) из двух синусоид с периодами  $t_1 = 1$  с и  $t_2 = 1/3$  с, (в) — этот же спектр, представленный в виде зависимости интенсивности от частоты.

В данном случае преобразование сигнала из функции, представленной в шкале времени  $f(t)$ , в шкалу частот  $F(v)$  дает спектр, состоящий всего из двух линий с частотами  $1$  и  $3 \text{ с}^{-1}$ . Однако подобным образом можно преобразовать и произвольный спектр, в том числе с непрерывным распределением частот.

Представление спектра в шкале времени дает информацию о суммарной амплитуде сигнала, однако информация о частотах в такой форме представления непосредственно не видна. Представление же в шкале частот дает информацию лишь об относительных интенсивностях сигнала при тех или иных частотах, но не его суммарной амплитуде.

В традиционных вариантах спектроскопических методов спектр регистрируют в шкале частот. Ряд новых методов таких, как ИК-спектроскопия с фурье-преобразованием или импульсная ЯМР-спектроскопия, основаны на регистрации спектра в шкале времени. Для перехода к привычной шкале частот в этом случае необходимо выполнить фурье-преобразование.

### Дискретное фурье-преобразование

Если спектр, зарегистрированный в шкале времени, оцифровать, т.е. представить в виде дискретной последовательности значений интенсивности, то к нему можно применить дискретное фурье-преобразование. Пусть оцифрованный спектр представляет собой последовательность из  $n$  значений сигнала, находящихся на равных расстояниях друг от друга по шкале  $t$ . Тогда преобразование спектра в шкалу частот осуществляется как

$$F(\nu) = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n f(t) e^{-(2\pi i \nu t / n)}, \quad (6.16)$$

где  $i = \sqrt{-1}$  — мнимая единица. Экспоненциальная функция от мнимого числа равна

$$e^{-(2\pi i \nu t / n)} = \cos(2\pi \nu t / n) - i \sin(2\pi \nu t / n). \quad (6.17)$$

Полученная в результате преобразования функция  $F(\nu)$  имеет действительную и мнимую часть. Спектр в шкале частот представляет собой ее действительную составляющую.

### Обратное фурье-преобразование

Преобразование спектра из шкалы частот в шкалу времени осуществляется при помощи обратного фурье-преобразования:

$$f(t) = \sum_{\nu=1}^n F(\nu) e^{2\pi i \nu t / n}. \quad (6.18)$$

Как видно из сравнения выражений (6.16) и (6.18), прямое и обратное фурье-преобразование можно выполнить при помощи одного и того же алгоритма. Существуют очень быстрые алгоритмы такого преобразования.

### Фильтрация данных при помощи фурье-преобразования

Фильтрацию с помощью фурье-преобразования осуществляют следующим образом. Сигнал, зарегистрированный в шкале времени, по

уравнению (6.16) преобразуют в шкалу частот. Затем его умножают на подходящую фильтрующую функцию  $H(\nu)$

$$G(\nu) = F(\nu)H(\nu), \quad (6.19)$$

и затем снова преобразуют в шкалу времени согласно уравнению (6.18).

Как правило, полезный сигнал соответствует некоторой средней области частот. Поэтому фильтрующую функцию подбирают так, чтобы она подавляла крайние, высокие и (или) низкие частоты. Для подавления высоких частот, обычно представляющих собой шум, можно применить фильтрующую функцию, график которой представлен на рис. 6.8 (а). График функции для подавления низких частот (в частности, обусловленных временным дрейфом сигнала) изображен на рис. 6.8 (б).

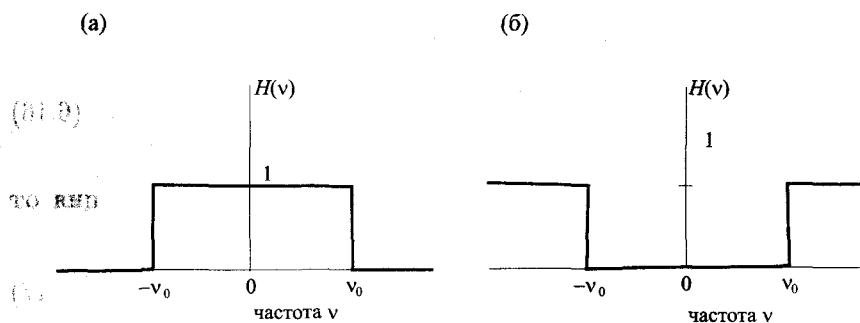


Рис. 6.8. Фильтрующие функции для подавления высоких (а) и низких (б) частот.

Фурье-фильтрация очень эффективна, когда требуется подавить лишь одну частоту (например, обусловленную наведенными помехами от сети переменного тока) или несколько определенных частот. Частотный спектр, полученный при помощи преобразования Фурье, сам по себе часто позволяет делать выводы о характере и источнике помех. Так, один тип помех, называемый *белым шумом*, имеет равномерный спектр, т.е. одну и ту же интенсивность при всех частотах. Белый шум бывает обусловлен тепловым движением частиц (тепловой шум), он часто возникает при регистрации сигнала с помощью ФЭУ. Его можно эффективно подавить при помощи простых цифровых фильтров — скользящего среднего и Савицкого-Голея. Временной дрейф сигнала проявляется в виде шума, интенсивность которого обратно пропорциональна частоте. *Интерференционный шум*, вызванный помехами со стороны сетей переменного тока, имеет очень четкую структуру с пиками при характерных частотах.

Наряду с преобразованием Фурье для тех же целей можно использовать и преобразование Адамара. Алгоритм преобразования Адамара не требует работы с комплексными числами.

### 6.3. Многомерные методы: обработка массивов данных

Аналитические приборы, снабженные компьютерами, позволяют собирать и обрабатывать большие массивы данных. Так, обычный ИК-спектр может быть представлен в виде массива из 2000 чисел, а хромато-масс-спектр — из 600000 чисел. Объемы информации многократно возрастают при анализе сложных многокомпонентных смесей. В частности, проба почвы может содержать до 1000 компонентов.

Методы хемометрики для работы с массивами данных можно разделить на три основные группы.

- Методы многомерного моделирования для градуировки при использовании неселективных методов (одновременный многокомпонентный анализ) и планировании эксперимента (метод поверхностей отклика).
- Методы группировки данных (кластерный анализ) для установления степени сходства между различными объектами — спектрами, химическими структурами, элементными и вещественными составами образцов.
- Методы классификации, т. е. отнесения исследуемого объекта к тому или иному классу. Например, в криминалистике бывает необходимо на основании химического анализа образца автомобильного лака определить его сорт.

Методы хемометрики позволяют анализировать весьма большие массивы данных, которые невозможно обработать без помощи компьютера. Для этого применяют как общестатистическое, так и специализированное химико-аналитическое программное обеспечение.

#### Математическое моделирование аналитических данных

В аналитической химии, как и в других областях, математическое моделирование служит для описания зависимости между несколькими величинами. Например, в жидкостной хроматографии мож-

но построить математическую модель, описывающую зависимость разрешения пиков от величины pH элюента.

В частности, математическое моделирование позволяет описать зависимость аналитического сигнала от концентраций компонентов для неселективных методов анализа. Это важнейшее применение математического моделирования в аналитической химии называют *многокомпонентным анализом*. Так, с использованием методов многокомпонентного анализа можно одновременно определить содержание влаги и белка в образцах зерна при помощи ИК-спектроскопии в ближней области (см. раздел 3.3.1).

Чаще всего используют *линейные модели*. Слово «линейный» означает здесь, что модель представляет собой линейную функцию *относительно оцениваемых параметров*. Простейшей линейной моделью является уравнение прямой линии. Оно представляет собой функцию зависимой переменной  $y$  от независимой переменной  $x$  и включает два параметра — свободный член  $b_0$  и угловой коэффициент  $b_1$ :

$$y = b_0 + b_1 x. \quad (6.20)$$

Однако и квадратичная зависимость  $y$  от  $x$  также представляет собой линейную (относительно параметров!) модель:

$$y = b_0 + b_1 x + b_{11} x^2. \quad (6.21)$$

Все параметры линейных моделей можно оценить методами линейной алгебры. При этом общие подходы и алгоритмы такой оценки применительно как к простейшей модели (6.20), так и к весьма сложным моделям для многокомпонентного анализа остаются одинаковыми и теми же. Начнем с рассмотрения самой простой одномерной линейной модели.

### Одномерное моделирование: линейный регрессионный анализ

Модель, описываемую уравнением (6.20), часто применяют для градуировки (см. рис. 1.14 и уравнение (1.3)). Значения параметров  $b_0$  и  $b_1$  можно оценить методом линейного регрессионного анализа. При наличии  $n$  пар данных  $(x_i, y_i)$ , соответствующие расчетные формулы выглядят следующим образом:

$$b_1 = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}, \quad (6.22)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}, \quad (6.23)$$

где

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i, \quad (6.24)$$

$$\bar{y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i. \quad (6.25)$$

Дисперсии рассчитанных значений параметров равны

$$s_{b_1}^2 = \frac{s_y^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}, \quad (6.26)$$

$$s_{b_0}^2 = \frac{s_y^2 \sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}. \quad (6.27)$$

Величина  $s_y^2$  называется *остаточной дисперсией*. Она характеризует разброс между экспериментальными величинами  $y_i$  и значениями  $\hat{y}_i$ , рассчитанными из модели по уравнению (6.20). Величина  $s_y^2$  равна

$$s_y^2 = \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}. \quad (6.28)$$

В приведенных формулах суммирование везде производится по всем  $n$  значениям.

Используя уравнение (6.20) как градуировочную модель, можно по измеренному значению аналитического сигнала  $y_0$  рассчитать соответствующее значение концентрации  $x_0$  (см. уравнение (1.4)):

$$x_0 = \frac{y_0 - b_0}{b_1}. \quad (6.29)$$

Если для расчета использовано среднее значение  $\bar{y}_0$  из  $p$  параллельных измерений, то стандартное отклонение полученной величины  $x_0$  равно

$$s_0 = \frac{s_y}{b_1 \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}}. \quad (6.30)$$

При использовании математического моделирования всегда необходимо проверять значимость рассчитанных величин параметров. Незначимые, т. е. статистически неотличимые от нуля, параметры следует исключить из модели. Следует также проверить адекватность модели в целом, т. е. степени ее соответствия экспериментальным данным. Для этого служат специальные статистические

тесты — критерии согласия, реализованные в стандартном статистическом программном обеспечении.

Прежде, чем рассмотреть задачу линейного регрессионного анализа в общем виде, перепишем уравнение модели (6.20) в матричном виде. При наличии  $n$  пар данных оно выглядит как

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_1 \\ 1 & x_2 \\ \vdots & \vdots \\ 1 & x_n \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \end{pmatrix}, \quad (6.31)$$

или, в сокращенном виде,

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b}. \quad (6.32)$$

Здесь и далее мы будем изображать векторы полужирными строчными, а матрицы — полужирными прописными буквами.

Аналогично, линейную модель, представленную уравнением (6.21), можно записать как

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & x_1^2 \\ 1 & x_2 & x_2^2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_n & x_n^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_{11} \end{pmatrix}, \quad (6.33)$$

что в сокращенном виде снова записывается как уравнение (6.32). Это уравнение является общей формой записи любой линейной регрессионной модели.

Вектор неизвестных параметров в уравнении (6.32) можно рассчитать с помощью стандартных методов линейной алгебры:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y}. \quad (6.34)$$

Верхние символы  $T$  и  $-1$  означают, соответственно, операции транспонирования и обращения матрицы.

### Многомерное моделирование

Многомерные модели представляют собой линейные (относительно параметров) зависимости, которые могут включать в себя несколько как независимых, так и зависимых переменных. Рассмотрим градуировочную модель для многокомпонентного спектрофотометрического анализа. В этом случае зависимая переменная  $y$  представляется собой массив значений оптических плотностей, а независимые переменные  $x$  соответствуют концентрациям отдельных компонентов. Для измерений оптической плотности при  $r$  длинах волн при

наличии в смеси  $m$  компонентов имеем систему линейных уравнений:

$$\begin{aligned} y_1 &= k_{10} + k_{11}x_1 + k_{12}x_2 + \dots + k_{1m}x_m \\ y_2 &= k_{20} + k_{21}x_1 + k_{22}x_2 + \dots + k_{2m}x_m \\ &\vdots \\ y_p &= k_{p0} + k_{p1}x_1 + k_{p2}x_2 + \dots + k_{pm}x_m, \end{aligned} \quad (6.35)$$

или, в матричной форме,

$$\mathbf{y} = \mathbf{K}\mathbf{x}. \quad (6.36)$$

Элементами матрицы  $\mathbf{K}$  являются коэффициенты поглощения, точнее, произведения молярных коэффициентов поглощения на толщину поглощающего слоя. Система уравнений (6.35) может рассматриваться как математическое выражение закона Ламберта–Бера для многокомпонентной системы (см. раздел 3.3.2).

### Прямая градуировка

Прямую градуировку можно осуществить, если известны все коэффициенты поглощения для индивидуальных компонентов, входящие в матрицу  $\mathbf{K}$ . В этом случае вектор неизвестных концентраций  $\mathbf{x}_0$  компонентов пробы можно рассчитать с использованием вектора значений оптической плотности  $\mathbf{y}_0$  и матрицы коэффициентов поглощения  $\mathbf{K}$ . Если число длин волн равно числу компонентов ( $p = m$ ), то такой расчет можно выполнить как

$$\mathbf{x}_0 = \mathbf{K}^{-1}\mathbf{y}_0. \quad (6.37)$$

Если же число длин волн превышает число компонентов ( $p > m$ ), то

$$\mathbf{x}_0 = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T \mathbf{y}_0. \quad (6.38)$$

### Непрямая градуировка

Часто значения коэффициентов поглощения отдельных компонентов заранее неизвестны — как, например, при анализе зерна методом ИК-спектроскопии в ближней области (раздел 3.3.1). В этих случаях необходимо предварительно найти элементы матрицы  $\mathbf{K}$  по данным измерений для стандартных смесей.

Пусть для градуировки использованы  $n$  стандартных смесей из  $m$  компонентов, а измерения выполнены при  $p$  длинах волн. В этом случае имеем следующую систему уравнений, выписанную на следующей странице.

$$\begin{aligned}
 & \begin{pmatrix} y_{11} & y_{21} & \dots & y_{1p} \\ y_{21} & y_{22} & \dots & y_{2p} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ y_{n1} & y_{n2} & \dots & y_{np} \end{pmatrix} = \\
 & = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} k_{11} & k_{12} & \dots & k_{1p} \\ k_{21} & k_{22} & \dots & k_{2p} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ k_{m1} & k_{m2} & \dots & k_{mp} \end{pmatrix}, \\
 & \text{(а.e.д.)}
 \end{aligned}$$

или

$$Y = XK. \quad (6.39)$$

Решение этой системы относительно коэффициентов матрицы  $K$  имеет следующий вид (ср. с уравнением (6.38)):

$$K = (X^T X)^{-1} X^T Y. \quad (6.40)$$

После того, как элементы матрицы  $K$  найдены, можно рассчитать вектор неизвестных значений концентраций компонентов  $x_0$  (см. уравнение (6.38)):

$$x_0 = (K^T K)^{-1} K^T y_0. \quad (6.41)$$

Недостаток метода непрямой градуировки состоит в том, что здесь приходится два раза выполнять операцию обращения матрицы — для нахождения коэффициентов поглощения (уравнение (6.40)) и для расчета концентраций (уравнение (6.41)). Это может значительно ухудшить точность результатов, особенно в случае так называемой плохой обусловленности обращаемой матрицы — явлении, когда зависимость между ее строками или столбцами близка к линейной. Плохая обусловленность может возникнуть как результат сходства спектров отдельных компонентов или неудачного выбора концентраций для стандартных смесей. Во всех случаях, особенно при плохой обусловленности, для обращения матриц лучше использовать устойчивые численные алгоритмы, основанные на сингулярном разложении.

При отклонениях оптических плотностей исследуемых смесей от закона аддитивности, а также при наличии в образцах дополнительных неизвестных компонентов непрямая градуировка дает более точные результаты, чем прямая градуировка с использованием матрицы коэффициентов поглощения индивидуальных компонентов.

Существует и метод *обращенной градуировки*. Здесь оптические плотности рассматриваются как независимые, а концентрации — как зависимые переменные. В программном обеспечении, поставляемом вместе с аналитическими приборами, для многомерной градуировки часто используются современные высокоеффективные методы регрессионного анализа такие, как регрессия на главных компонентах или блочный (дробный) метод наименьших квадратов. Однако в этих случаях коэффициенты градуировочной матрицы  $K$  лишены определенного физического смысла.

### Методы распознавания образов и классификации

Суть задач, решаемых с помощью методов распознавания образов и классификации, поясним на конкретном примере. В ходе расследования убийства на жертве был найден фрагмент волос. Необходимо установить, кому из трех подозреваемых лиц принадлежат эти волосы. Для этого был выполнен элементный анализ образцов волос подозреваемых на содержание Cu, Mn, Cl, Br и I. Для каждого подозреваемого было сделано по три параллельных анализа. Соответствующие данные представлены в табл. 6.9.

Таблица 6.9. Элементный состав образцов волос трех человек (содержание в частях на миллион).

Номер образца	Cu	Mn	Cl	Br	I
1	9, 2	0, 30	1730	12, 0	3, 6
2	12, 4	0, 39	930	50, 0	2, 3
3	7, 2	0, 32	2750	65, 3	3, 4
4	10, 2	0, 36	1500	3, 4	5, 3
5	10, 1	0, 50	1040	39, 2	1, 9
6	6, 5	0, 20	2490	90, 0	4, 6
7	5, 6	0, 29	2940	88, 0	5, 6
8	11, 8	0, 42	867	43, 1	1, 5
9	8, 5	0, 25	1620	5, 2	6, 2

Для решения поставленной задачи в первую очередь необходимо убедиться, что данные химического анализа волос позволяют однозначно установить, кому принадлежит исследуемый образец. Это можно сделать при помощи хемометрических методов группировки данных. После этого по результатам анализа неизвестного образца можно отнести его к одному из подозреваемых.



Разумеется, подобные задачи можно решать применительно к объектам любой природы. Вместо образцов волос могут быть археологические объекты, образцы материалов, органические соединения и т.д. Будем обобщенно называть их просто *объектами*. Количественные характеристики объектов, служащие основанием для классификации, называются *признаками*. В нашем случае признаки — это содержания определенных элементов. В других случаях признаками могут служить разнообразные физические параметры или численные характеристики (дескрипторы) химической структуры. Спектральные или хроматографические данные также могут служить источником признаков.

Расположим все данные в виде матрицы  $X$ , в которой каждая из  $n$  строк соответствует определенному объекту, а каждый из  $p$  столбцов — определенному признаку:

$$X = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1p} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2p} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{np} \end{pmatrix}. \quad (6.42)$$

### Предварительная подготовка данных

В первую очередь необходимо проверить данные на *полноту*. Все ли позиции в матрице  $X$  заполнены? Если какие-то позиции пусты, их можно заполнить средними значениями по соответствующему столбцу или случайными величинами в пределах диапазона изменения соответствующего признака.

Признаки, имеющие *постоянное* значение (не изменяющиеся или практически не изменяющиеся при переходе от образца к образцу) или *сильно коррелирующие* с другими признаками, не представляют интереса для классификации и должны быть исключены из рассмотрения.

Как видно из табл. 6.9, отдельные признаки могут сильно различаться по своей величине. Поэтому значения признаков необходимо масштабировать. Один из наиболее распространенных способов масштабирования — *автомасштабирование*. Для значений признаков, содержащихся в  $k$ -м столбце, автомасштабирование выполняется как

$$x'_{ik} = \frac{x_{ik} - \bar{x}_k}{s_k}. \quad (6.43)$$

Здесь  $\bar{x}_k$  — среднее значение признака к  $k$ -м столбце, а  $s_k$  — стан-

дартное отклонение:

$$s_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2}{n - 1}}.$$

После автомасштабирования каждый признак будет иметь среднее значение равное нулю, и стандартное отклонение равное единице.

### Методы неконтролируемого обучения

Методы неконтролируемого обучения предназначены для группировки наборов признаков, характеризующих объекты, в определенные классы. Для группировки используют проекционные методы и методы кластерного анализа.

#### Проекционные методы

Основным проекционным методом является *анализ главных компонент*. Для этого исходную матрицу признаков преобразуют так, чтобы по возможности сократить размерность пространства, охватывающего векторы признаков. Векторы, характеризующие направления осей координат в новом пространстве (уменьшенной размерности), называются главными компонентами. Если для описания массива признаков достаточно всего двух или трех главных компонент, данные можно представить графически и сгруппировать в классы визуально.

Вернемся к нашим данным криминалистического анализа. Координата вектора  $i$ -го объекта по первой (а также любой другой) оси главных компонент  $PC_{1i}$  является некоторой линейной комбинацией всех исходных значений признаков объекта:

$$PC_{1i} = a_{11}x_{i1} + a_{12}x_{i2} + \dots + a_{1p}x_{ip}. \quad (6.44)$$

Коэффициенты  $a_{ij}$  можно рассчитать методами линейной алгебры путем анализа собственных (или сингулярных) значений исходной матрицы. Число главных компонент обычно выбирают так, чтобы размерность полученного пространства позволяла описать заранее обусловленную, достаточно большую, долю дисперсии исходных данных. В нашем примере двух главных компонент достаточно для того, чтобы описать 92,9% дисперсии. Таким образом, весь массив исходных данных можно с хорошим приближением представить как множество точек, расположенных в одной плоскости. Взаимное расположение точек, характеризующих составы образцов волос,

в плоскости первых двух главных компонент показано на рис. 6.9. Как видно из рисунка, в этой плоскости четко различаются три отдельные области. Можно заключить, что образцы, расположенные в пределах каждой области, принадлежат одному и тому же человеку. Таким образом, данные содержания указанных элементов позволяют однозначно отнести образец волос определенному человеку.

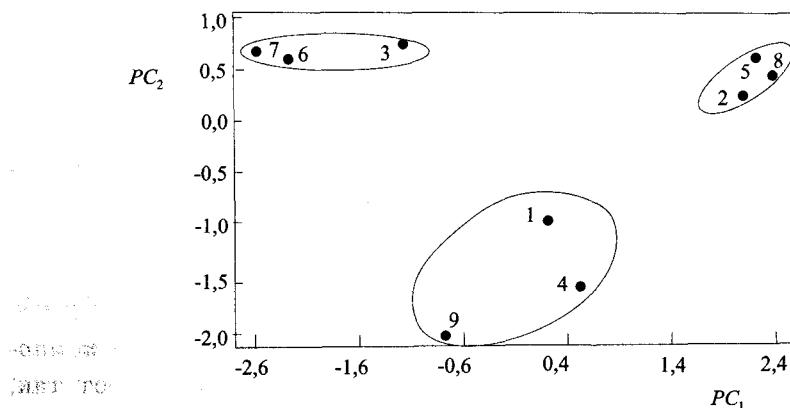


Рис. 6.9. Представление массива данных из табл. 6.9 при помощи первых двух главных компонент. Числа при точках соответствуют номерам образцов.

### Кластерный анализ

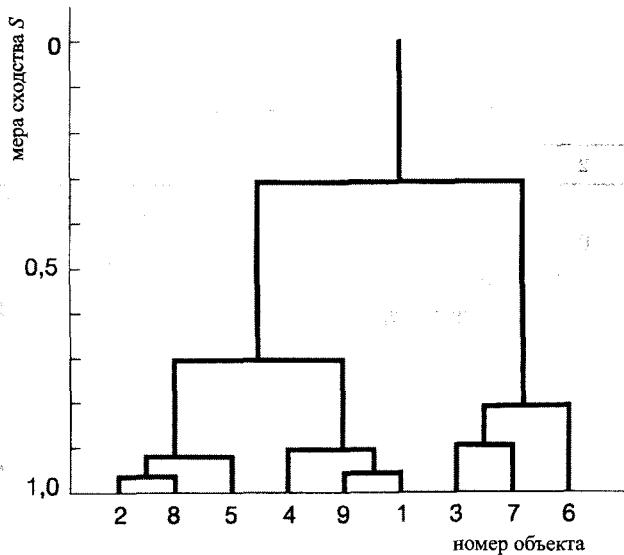
Другой метод группировки данных называется кластерным анализом. В этом методе производят последовательную, шаг за шагом, группировку объектов на основании максимальной близости значений их признаков. В результате образуются группы объектов (кластеры), имеющие иерархическую структуру (рис. 6.10).

Для оценки степени близости объектов друг другу используют ту или иную меру расстояния между ними. Чем меньше расстояние между объектами, тем они более похожи. Чаще всего применяют величину евклидова расстояния. Евклидовым расстоянием  $d_{ij}$  между объектами  $i$  и  $j$  называется величина

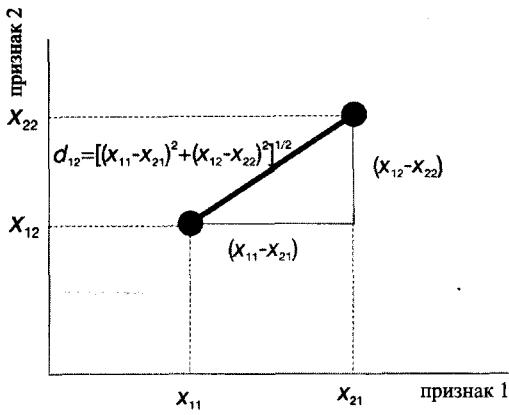
$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}. \quad (6.45)$$

Если представить каждый объект в виде точки в  $p$ -мерном пространстве, координаты которой равны значениям соответствующих признаков, то евклидово расстояние есть длина отрезка, соединяю-

щего две такие точки. Рис. 6.11 иллюстрирует понятие евклидова расстояния для случая, когда каждый объект характеризуется всего двумя признаками.



**Рис. 6.10.** Результат кластерного анализа данных табл. 6.9, представленный в виде дендрограммы. По оси ординат отложены значения меры сходства между объектами — величин  $S_{ij}$ , рассчитываемых из нормированных евклидовых расстояний (уравнение (6.46)).



**Рис. 6.11.** Евклидово расстояние между  $i$ -м и  $j$ -м объектами, описываемыми при помощи двух признаков.

Чем больше евклидово расстояние, тем большее различие между объектами. Вместо меры различия в кластерном анализе часто используют *меру сходства* между объектами. Мера сходства между  $i$ -м и  $j$ -м объектами определяется как

$$S_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{ij}(\max)}, \quad (6.46)$$

где  $d_{ij}(\max)$  есть максимальное среди всех значений  $d_{ij}$ . Для пары полностью тождественных объ-

ектов  $S_{ij} = 0$ . Для объектов, максимально различающихся между собой,  $S_{ij} = 1$ .

Для проведения иерархической кластеризации объектов следует в первую очередь рассчитать все евклидовы расстояния между парами объектов. В табл. 6.10 эти расстояния представлены в виде *матрицы расстояний*.

Таблица 6.10. Матрица расстояний для объектов из табл. 6.9.

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0								
2	2,405	0							
3	2,250	3,392	0						
4	1,321	2,570	3,017	0					
5	2,713	1,613	3,391	2,799	0				
6	3,062	4,232	1,724	3,766	4,623	0			
7	3,378	4,611	1,666	3,793	4,655	1,337	0		
8	2,562	0,666	3,531	2,821	1,189	4,528	4,860	0	
9	1,667	3,603	2,991	1,511	3,987	3,116	3,306	3,910	0

Ввиду того, что матрица расстояний симметрична, приведена только ее нижняя часть. Наименьшее евклидово расстояние, равное 0,666, наблюдается между объектами 2 и 8. Эти два объекта объединим в один кластер и рассчитаем расстояния всех остальных объектов до центра тяжести этого кластера. Такой расчет проще всего выполнить путем усреднения расстояний до объектов, образующих кластер. Например, расстояние от объекта 1 до кластера, образованного объектами 2 и 8, равно

$$d(\text{новое}) = \frac{d_{21} + d_{81}}{2} = \frac{2,405 + 2,562}{2} = 2,484.$$

В результате получим новую матрицу расстояний, уже меньшего размера. Затем вновь найдем два объекта (или кластера), наиболее близкие между собой, и повторим описанную процедуру. Иерархическую структуру формируемых при этом кластеров можно представить в виде дендрограммы (рис. 6.10).

На сколько же кластеров следует в итоге разделить исходные данные? Число кластеров зависит от характера решаемой задачи. В нашем случае заранее известно, что образцы волос принадлежат трем различным людям. Поэтому на дендрограмме следует провести горизонтальное сечение так, чтобы оно пересекало три вертикальных отрезка. В этом случае данные разделятся на три кластера. Такое сечение можно провести, например, при  $S = 0,75$ . К трем

полученным кластерам относятся образцы 2,8,5; 1,9,4 и 3,7,6, соответственно (табл. 6.11). Состав полученных кластеров идентичен тому, который был ранее установлен посредством анализа главных компонент (рис. 6.9).

**Таблица 6.11.** Результаты группировки образцов волос, составы которых приведены в табл. 6.9, методом кластерного анализа.

Номер образца	Принадлежность
1	B
2	A
3	C
4	B
5	A
6	C
7	C
8	A
9	B

Если число кластеров заранее неизвестно, то его можно выбрать, пользуясь непосредственно величинами расстояний между различными объектами.

### Контролируемое обучение

Контролируемым обучением называется собственно процесс классификации, т.е. отнесения неизвестного объекта к тому или иному классу на основании значений его признаков. Классы могут быть известны заранее или установлены при помощи методов неконтролируемого обучения. Для осуществления классификации каждый класс обычно предварительно описывают некоторой математической моделью.

В нашем случае задача классификации состоит в том, чтобы отнести образец волос, найденных на месте преступления, одному из людей — А, В или С — на основании результатов его элементного анализа (табл. 6.12).

**Таблица 6.12.** Элементный состав образца волос (частей на миллион), подлежащего классификации.

Cu	Mn	Cl	Br	I
9,2	0,27	2200	9,8	4,7

Наиболее распространенным методом классификации является линейный дискриминантный анализ (ЛДА). В основе ЛДА лежит по-

строение линейных дискриминирующих функций и их использование для последующей классификации. Один из способов построения дискриминирующих функций состоит в нахождении собственных значений и собственных векторов некоторой матрицы с использованием численных величин признаков объектов, а также информации о принадлежности каждого объекта определенному классу. Дискриминирующие функции строятся последовательно. Так, первый собственный вектор  $w_1$ , соответствующий наибольшему собственному значению, описывает первую дискриминирующую функцию

$$s_1 = w_{11}x_1 + w_{12}x_2 + \dots + w_{1p}x_p. \quad (6.47)$$

Затем находят следующее по величине собственное значение и соответствующий ему собственный вектор  $w_2$  и строят вторую дискриминирующую функцию:

$$s_2 = w_{21}x_1 + w_{22}x_2 + \dots + w_{2p}x_p. \quad (6.48)$$

Дискриминирующих функций строят столько, сколько необходимо, чтобы с их помощью однозначно решить задачу классификации.

Например, для данных, представленных в табл. 6.9, первые две дискриминирующие функции имеют вид

$$s_1 = 0,227x_{\text{Cu}} - 0,694x_{\text{Mn}} + 1,200x_{\text{Cl}} - 0,0394x_{\text{Br}} + 0,0514x_{\text{I}}, \quad (6.49)$$

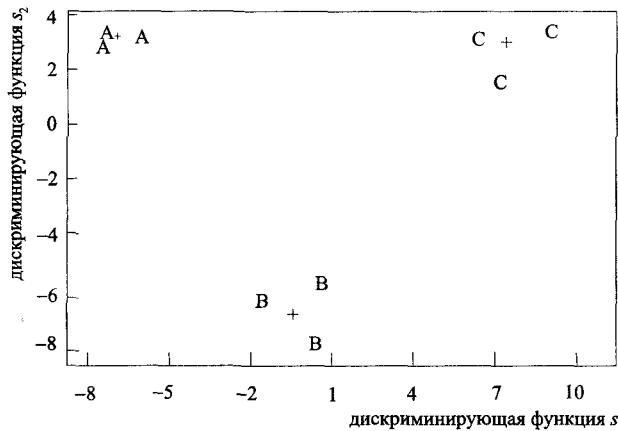
$$s_2 = 0,00672x_{\text{Cu}} + 0,936x_{\text{Mn}} - 0,211x_{\text{Cl}} + 1,342x_{\text{Br}} - 0,395x_{\text{I}}. \quad (6.50)$$

Первая дискриминирующая функция описывает 63,39% общей дисперсии данных, а вторая — еще 36,61%. Таким образом, двух дискриминирующих функций достаточно для того, чтобы в совокупности описать все 100% дисперсии данных. Графическое представление величин первой и второй дискриминирующей функции как координат точек на плоскости (рис. 6.12) наглядно показывает группировку объектов по трем классам.

Чтобы классифицировать неизвестный объект, для него вычисляют дискриминирующие функции на основании значений его признаков. Совокупность полученных значений определяет координаты некоторой точки в пространстве дискриминирующих функций. Объект относят к тому классу, для которого евклидово расстояние от полученной точки до центра тяжести класса наименьшее.

В нашем случае подстановка значений признаков неизвестного образца волос (табл. 6.12) в выражения для дискриминирующих функций (6.49) и (6.50) дает значения  $s_1 = 4,416$  и  $s_2 = -7,15$ . Используя эти величины и координаты центров тяжести трех классов,

находим, что для класса А евклидово расстояние составляет 15,66, для класса В 4,93 и для класса С 10,52. Следовательно, можно сделать однозначный вывод о том, что образец волос принадлежит человеку В.



**Рис. 6.12.** Значения дискриминирующих функций для девяти объектов, составы которых представлены в табл. 6.9. Центр тяжести каждого класса показан крестиком.

Предпосылкой применимости линейного дискриминантного анализа является подчинение данных нормальному закону распределения. Кроме того, классы объектов должны иметь значительные различия в положениях их центров тяжестей, а дисперсии значений внутри классов должны быть одинаковы.

Альтернативой ЛДА служит метод классификации, называемый методом *K* ближайших соседей. Для его применения соблюдение перечисленных выше требований необязательно. Этот метод основан на вычислении расстояний от неизвестного объекта до некоторого заранее заданного общего числа объектов — его ближайших соседей. Неизвестный объект относят к тому классу, который содержит больше всего своих представителей среди общего числа ближайших соседей.

## 6.4. Литература

- K.Doerffel, Statistik in der Analytischen Chemie, 5. Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1990.
- R.Henrion, G.Henrion, Methoden zur Interpretation multivariater Daten mit Beispielen aus der analytischen Chemie, Springer, Berlin/Heidelberg, 1994.

M.Otto, Chemometrie, VCH, Weinheim, 1997.

D.L.Massart, B.G.M.Vandeginste, S.N. Deming, L.M.C. Buydens, S. DeJong, P.J.Lewi, J.Smeysters-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A and B: Elsevier, Amsterdam, 1997 and 1998.

## ГЛАВА 7

# АВТОМАТИЗАЦИЯ АНАЛИЗА И ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

## 7.1. Механизация и автоматизация лабораторий

Постоянно возрастающее число химических анализов в самых разных сферах деятельности — медицине, фармацевтике, промышленности, службах контроля окружающей среды — вызывает возрастающую потребность в полной или, по крайней мере, частичной механизации и автоматизации аналитического процесса. Прогресс в этой области аналитической химии заметно отстает по темпам от развития собственно методов химического анализа.

Основные **цели**, которые преследует механизация и автоматизация химического анализа, следующие.

- Возможность выполнения большого числа анализов в ограниченное время, что бывает крайне актуально, например, для медицинской диагностики.
  - Значительное снижение расходов на *оплату труда персонала*. Автоматические анализаторы могут обслуживаться меньшим числом работников более низкой квалификации. Однако существенная экономия средств будет наблюдаться лишь в том случае, если число выполняемых анализов достаточно велико.
  - Возможность выполнения *сложных и многостадийных* аналитических операций.
  - *Сокращение времени анализа*, в частности, за счет одновременного выполнения нескольких однотипных действий или сокращения времени между выполнением отдельных стадий методики. Часто автоматизация анализа приводит к особенно значительному выигрышу во времени, если в ходе выполнения

методики не требуется установление химического равновесия между реагирующими веществами, например, в кинетических методах анализа.

- *Предотвращение загрязнений* пробы посторонними веществами из окружающей среды при определении следовых количеств путем использования роботов-манипуляторов, способных работать в лабораториях, специально предназначенных для анализа особо чистых веществ, например, в ламинарных боксах.
- *Повышение точности* результатов за счет исключения субъективных источников погрешностей. Не будучи подверженными усталости, роботы позволяют обеспечить одинаковые точностные показатели на протяжении длительного периода работы. Кроме того, автоматизация анализа позволяет повысить точность за счет сокращения времени анализа и улучшения организации всего аналитического процесса в целом.
- *Увеличение эффективности извлечения информации* за счет автоматизированного сбора и обработки данных.

*Механизация* процесса анализа может быть осуществлена с различной степенью полноты. Операции, выполняемые вручную, могут быть механизированы частично или целиком — вплоть до создания полностью автоматизированных аналитических систем, работающих без вмешательства человека непосредственно с исходной пробой, не подвергнутой пробоподготовке и взвешиванию и выдающих конечный результат анализа.

Понятие «автоматизация» в строгом смысле слова означает создание механизмов и инструментов, в совокупности образующих информационно замкнутую систему. Это предусматривает наличие в такой системе множества обратных связей. Применительно к процессу анализа мы будем трактовать понятие «автоматизация» более широко — как разработку и использование инструментов, полностью или частично заменяющих человеческий труд на различных этапах анализа, включая обработку результатов.

Как правило, все методики анализа так или иначе включают в себя ряд однотипных, повторяющихся действий, которые мы будем называть *основными операциями*. Перечень таких типичных основных операций приведен в табл. 7.1. Разумеется, не обязательно все из них должны входить в каждую методику.

Одна из задач механизации аналитического процесса — обеспечение наилучшей «стыковки» отдельных его этапов между собой.



Для этого можно использовать как дискретный, так и непрерывный способ механизации. Такие операции, как гомогенизация и взвешивание пробы, титрование, естественно осуществлять в дискретном режиме, в то время как все операции, связанные со смешением растворов, или диализ, можно проводить как дискретно, так и непрерывно.

**Таблица 7.1.** Основные операции, входящие в состав методики химического анализа.

Операция	Примеры
Пробоподготовка	высушивание, гомогенизация, измельчение
Отбор определенного количества пробы	взвешивание, отбор аликвоты раствора
Вскрытие пробы	растворение, разложение
Разделение, концентрирование	осаждение, фильтрование, экстракция, диализ, хроматография
Добавление реагентов, перемешивание раствора	добавление растворов буфера, маскирующих реагентов, лигандов, ферментов
Измерение	измерение оптической плотности, потенциала, площади пика, эквивалентного объема (при титровании)
Градуировка	анализ образцов сравнения, построение градуировочной зависимости
Обработка результатов измерения	расчет содержания, концентрации, оценка точностных характеристик
Представление результатов	выдача результатов в численной или графической форме

Сбор, хранение, обработка и представление данных выполняются главным образом при помощи компьютера. Этот этап аналитического процесса в настоящее время автоматизирован наиболее полно, и в дальнейшем мы не будем его подробно рассматривать. Существуют и примеры достаточно глубокой автоматизации других стадий анализа. Например, в медицинской лаборатории стало возможным выполнять до 3000 определений в час 20 различных компонентов в пробах плазмы крови объемом по 0,5 мл.

## Дискретные анализаторы

### Механизированная обработка проб

Анализаторы, работающие по дискретному принципу, обрабатывают каждую пробу отдельно.



Рассмотрим дискретный способ автоматизации анализа на примере операции смешения реагирующих веществ. Для этого можно заранее приготовить необходимые растворы и при каждом определении отмерять и смешивать их определенные порции. Можно также смешивать отдельные, заранее приготовленные, порции реагентов. В обоих случаях смешение обычно осуществляют непосредственно в измерительной ячейке, например, в фотометрической кювете.

Процесс автоматического дозирования и смешения порций двух растворов схематически показан на рис. 7.1 на примере фотометрического определения. Даже если перемешивание растворов будет неполным, стандартизация условий автоматического смешения позволяет получать правильные результаты.

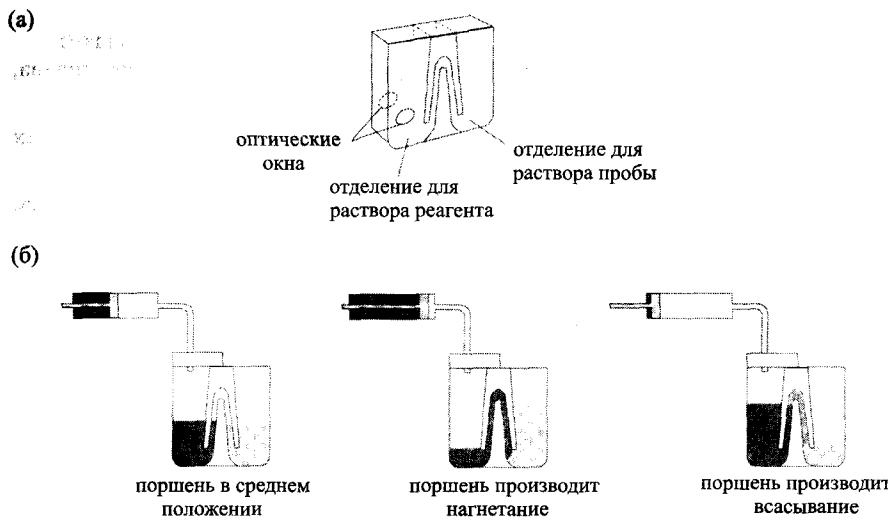


Рис. 7.1. Простейшая конструкция ячейки для автоматизированного фотометрического анализа. (а) Устройство измерительной ячейки. (б) Последовательность операций, предшествующих измерению.

Для механизированной обработки пробы используют различные перемещаемые пластиинки, конвейерные ленты или карусельные устройства. На рис. 7.2 схематически показано карусельное устройство для транспортировки ячейки, изображенной на рис. 7.1.

Транспортное карусельное устройство работает по заранее заданной программе и управляется от компьютера. Различные управляющие программы можно создавать, например, для отдельных методик ферментативного анализа в медицине.

Достоинства дискретных анализаторов состоят в следующем.

- Простота механизации стандартных методик.

- Гибкость, возможность более быстрого, чем при использовании непрерывных анализаторов, изменения программы работы, последовательности и продолжительности отдельных операций.
- Уменьшение расхода реагентов по сравнению с непрерывными анализаторами.

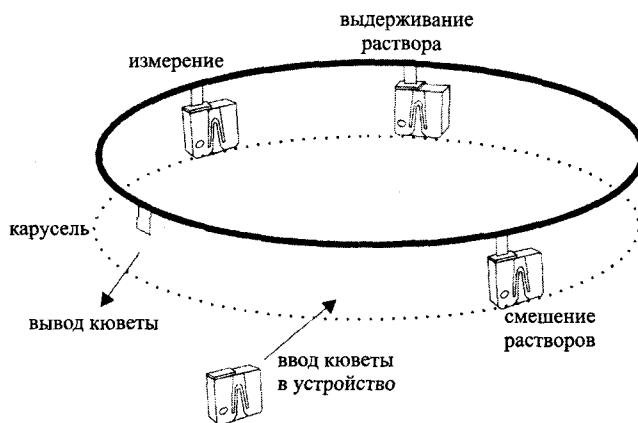


Рис. 7.2. Транспортная карусель для механизации фотометрического анализа.

Основным недостатком дискретных анализаторов является сравнительно низкая надежность в работе из-за большой *сложности механического устройства*.

### Дискретные анализаторы: «безреактивный» анализ

Применение дискретных анализаторов позволяет не только механизировать последовательность операций, выполняемых вручную, но и полностью исключить или, по крайней мере, свести к минимуму некоторые из них. В первую очередь это относится к операциям дозирования и смешения растворов. Весь анализ можно выполнить на одной тестовой пластинке, состоящей из последовательности слоев пористых материалов (мембранны), пропитанных растворами необходимых реагентов. Перемещение раствора пробы от слоя к слою осуществляется самотеком, под действием диффузии или силы тяжести. В отдельных слоях могут осуществляться все необходимые стадии пробоподготовки, разделения, проведения химических реакций и измерения.

Рассмотрим использование такой техники анализа на примере определения мочевины в крови. Устройство соответствующей та-



стовой пластинки схематически представлено на рис. 7.3. Каплю анализируемой пробы объемом порядка 10 мкл помещают на пластинку. В ходе проникновения в самый верхний слой порция крови равномерно в нем распределяется. Второй (сверху) слой содержит фермент уреазу, вызывающий гидролиз мочевины с образованием аммиака (см. уравнение (7.5)). Выделяющийся аммиак диффундирует сквозь следующий слой, представляющий собой полупроницаемую мембрану, в слой, пропитанный раствором кислотно-основного индикатора, и вызывает изменение pH этого раствора и, соответственно, окраски индикатора. Анализ производят фотометрическим методом, направляя луч света через прозрачное окошко в нижней части пластинки. Нижняя поверхность самого верхнего слоя частично отражает свет, поэтому пластинка представляет собой аналог обычной фотометрической кюветы для измерений в проходящем свете.

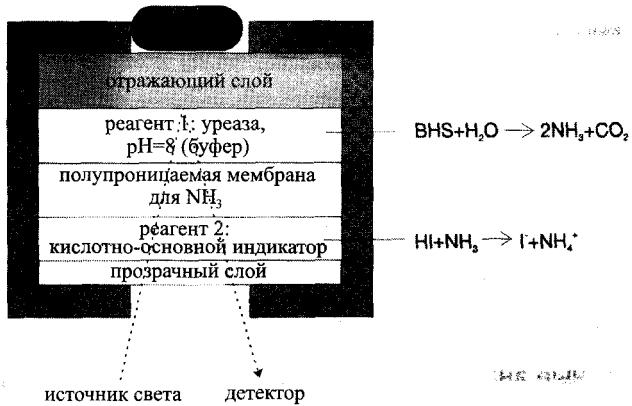


Рис. 7.3. Тестовая пластинка для определения мочевины в крови. Мочевина в результате ферментативной реакции превращается в аммиак, который определяют фотометрически при помощи кислотно-основного индикатора НI.

Подобным образом можно осуществлять не только процессы диффузионного транспорта и мембранных разделения компонентов раствора, но и фильтрование, селективную адсорбцию, стабилизацию реагентов, замедление процессов химического взаимодействия, маскирование и прочие химические реакции, в том числе с участием нескольких реагентов. Такие тестовые пластинки широко применяются в кинетических, особенно ферментативных, методах анализа, например, для определения различных субстратов в присутствии ферментов или кофакторов (раздел 8.3).

Миниатюрные тестовые пластиинки могут служить одноразовыми химическими сенсорами (датчиками). Более подробно об этом мы поговорим в разделе 7.2 на примере оптических датчиков.

Существуют и одноразовые потенциометрические датчики (одноразовые ионселективные электроды). Их применяют в медицине для определения различных ионов в биологических жидкостях. Схема устройства одноразового ионселективного электрода для определения калия приведена на рис. 7.4.

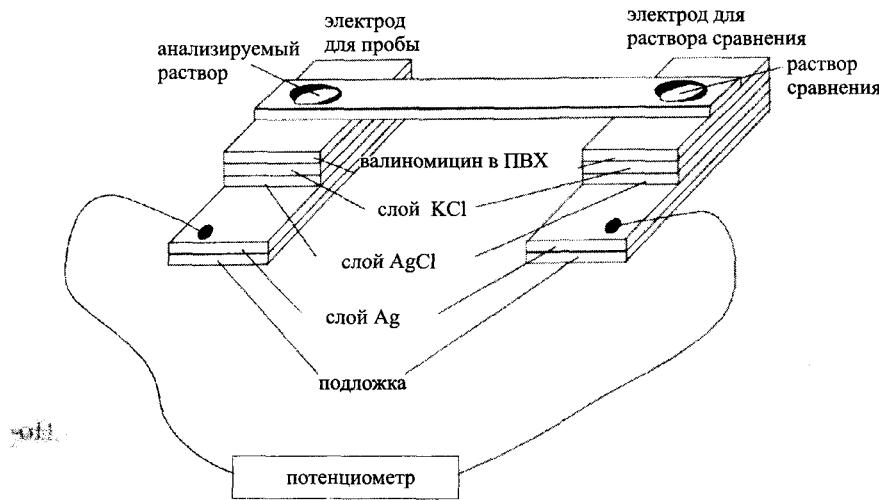


Рис. 7.4. Определение калия в сыворотке крови при помощи одноразового ионселективного электрода.

Устройство состоит из двух идентичных ионселективных электродов — для анализируемого раствора и раствора сравнения с известной концентрацией калия. Электролитический контакт между обоими электродами осуществляется при помощи полоски влажной бумаги. Концентрацию калия в анализируемом растворе находят, измерив разность потенциалов между электродами. Достоинства таких миниатюризованных средств клинической диагностики состоят в следующем.

- Дешевизна устройства.
- Отсутствие необходимости периодического обновления ионселективной мембраны.
- Отсутствие отравления мембраны в результате адсорбции белков из плазмы крови и связанного с этим снижения чувствительности.

Очевидным недостатком любого одноразового датчика является невозможность его повторного использования.

## Непрерывные анализаторы

Непрерывные анализаторы работают по принципу анализа в потоке. Раствор пробы, буфера и всех необходимых реагентов вводят в поток жидкости, перемешивают и регистрируют аналитический сигнал при помощи соответствующего детектора. Различают проточные методы анализа с использованием и без использования сегментации потока. Для сегментации используют пузырьки воздуха, вводимые в поток жидкости с определенной периодичностью. Методы с сегментацией потока называются методами *непрерывного проточного анализа (НПА)*, а без сегментации — методами *проточно-инжекционного анализа (ПИА)*.

### Непрерывный проточный анализ (НПА)

Метод непрерывного проточного анализа предложил Л.Т.Скеггс в 1958 г. Анализируемый раствор подается при помощи перистальтического насоса в непрерывный поток жидкости, содержащий реагенты и буфер, и смешивается с ним в смесительной спирали. Полученную смесь в ряде случаев подвергают дополнительным операциям, например, термостатированию или диализу. Продукт реакции определяют в проточной ячейке при помощи соответствующего детектора. Чтобы уменьшить размывание зоны продукта реакции вследствие диффузии, поток жидкости сегментируют при помощи периодически вводимых пузырьков воздуха. Схематическое устройство непрерывного проточного анализатора показано на рис. 7.5.

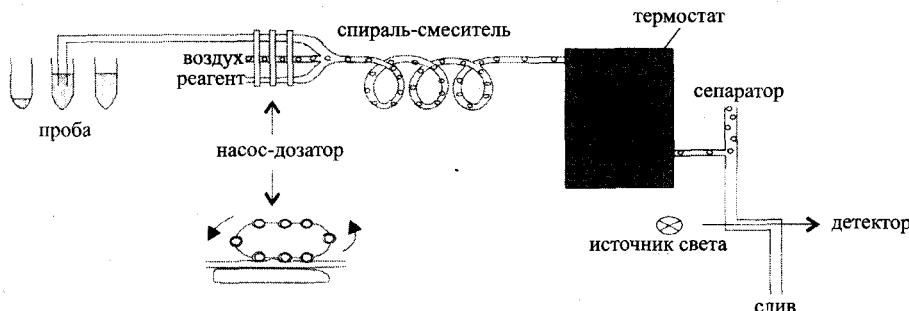


Рис. 7.5. Схема непрерывного проточного анализатора с сегментацией потока пузырьками воздуха и фотометрическим детектированием (согласно Скеггсу).

Перед детектированием из потока жидкости удаляют пузырьки воздуха при помощи сепаратора. Возможно и детектирование непосредственно в сегментированном потоке. Помехи со стороны пузырьков в этом случае устраняют при помощи электронных устройств.

В НПА-анализаторах применяют и многоканальные насосы, управляющие несколькими потоками реагентов. Устройства для непрерывного проточного анализа позволяют автоматизировать множество операций химического анализа: дозирование раствора пробы, разделение компонентов, разбавление, добавление реагентов, перемешивание, термостатирование, выдерживание (инкубирование) растворов, измерение, обработку и представление результатов. Детектирование чаще всего осуществляют фотометрическим методом в УФ- или видимой области. Часто используют и другие методы детектирования: флуориметрию, фотометрию пламени, потенциометрию с использованием ионселективных электродов.

Анализ неизвестного образца можно совместить с градуировкой, вводя в анализатор порции растворов пробы и стандартных растворов в чередующемся порядке. НПА можно использовать и в кинетических, в частности, ферментативных, методах анализа, выдерживая реакционную смесь перед измерением в течение некоторого определенного времени (см. раздел 2.7).

Применение многоканальных насосов позволяет выполнять одновременный анализ *нескольких проб* или анализ одной пробы на *несколько компонентов*. Например, в плазме крови можно определять восемь компонентов —  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_2$ , глюкозу, мочевинный азот, альбумин и общее содержание белков — с производительностью до 2000 полных анализов в час. В кинетических методах можно использовать большие времена инкубации реакционных смесей (и, соответственно, медленно протекающие реакции), поскольку вследствие сегментирования потока продольная диффузия и размывание зон весьма незначительны. В механическом отношении устройство НПА-анализаторов достаточно простое, поэтому они надежны в работе.

Недостатком метода является возможность *загрязнения* растворов в результате продолжительного движения по жидкостной системе. *Переоборудование* НПА-анализаторов для решения другой задачи осуществить сложнее, чем в случае дискретных анализаторов или при использовании технологии ПИА (см. ниже). НПА-анализаторы приспособлены лишь для выполнения множества серийных анализов; производить отдельные нерегулярные анализы с их помощью невозможно или нецелесообразно. Многие методики НПА включены



в официальные нормативные документы. Например, собрание германских стандартов DIN содержит методики определения аммония, нитритов, нитратов, цианидов и фосфатов в водах методом НПА. Как правило, в подобных случаях в сборники стандартов включают и методики ПИА для решения тех же задач.

Конструкция непрерывных проточных анализаторов с середины 1970-х годов, практически не изменилась.

### Проточно-инжекционный анализ (ПИА)

Дальнейшим развитием проточных методов явилось создание в 1974 г. Пунгором и, независимо, Ружичкой метода проточно-инжекционного анализа. В этом методе определенный объем пробы, около 100 мкл, вводят в ламинарный несегментированный непрерывный поток жидкости (носителя или раствора реагента) и осуществляют детектирование приблизительно через 30 с. Первоначально поток жидкости создавали самотеком, под действием силы тяжести. Затем для этой цели стали применять высокоэффективные жидкостные насосы. По своему устройству проточно-инжекционный анализатор сходен с высокоэффективным жидкостным хроматографом без разделяющей колонки (рис. 7.6).



Рис. 7.6. Схема жидкостных потоков в одноканальном проточно-инжекционном анализаторе.

В ПИА обычно используют перистальтические насосы с круговым движением прижимных роликов (см. рис. 7.5). Они позволяют регулировать скорость потока в пределах от 0,0005 до 40 мл/мин. Для ввода пробы используют вентили, аналогичные применяемым в ВЭЖХ. Объемы вводимого раствора пробы обычно составляют от 10 до 30 мкл.

Перемешивание растворов реагентов и пробы происходит под действием конвекции и диффузии. Полного перемешивания при этом обычно не достигается, и сигнал имеет форму пика, а не плато (рис. 7.7).

Обычно детектирование осуществляют фотометрическим методом. Определять содержание вещества можно как по площади, так и

по высоте пика. Соответствующим способом необходимо проводить и градуировку. В методе ПИА не требуется полного завершения реакции, поэтому производительность метода очень высока — до 100 и более анализов в час (рис. 7.8).

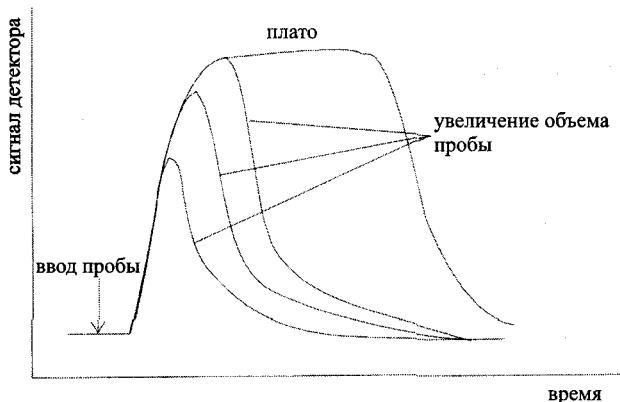


Рис. 7.7. Влияние объема пробы на форму и величину сигнала в ПИА.

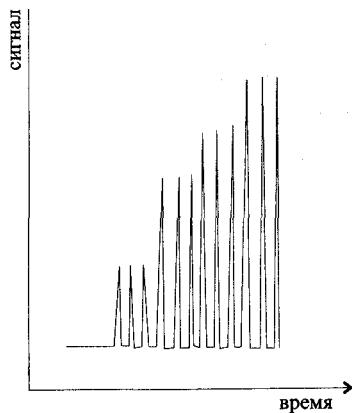


Рис. 7.8. Сигналы детектора при ПИА проб возрастающей концентрации. Каждую пробу анализируют трижды.

шифрования зоны продукта реакции с окружающей жидкостью, ни разбавления анализируемого раствора. Однако, если реагент не содержится в потоке носителя, а вводится дополнительно, то разбавление оказывается неизбежным. Поэтому величины дисперсий в ПИА всегда больше единицы.

В жидкостных системах для ПИА используют очень узкие трубы с диаметром, обычно не превышающим 0,5 мм. Скорость потока необходимо устанавливать очень точно, чтобы обеспечить воспроизводимое размывание зон вследствие диффузии. Размывание зон характеризуют величиной дисперсии  $D$ . Она равна отношению концентрации анализируемого раствора  $c_0$  к концентрации  $c$  в максимуме пика:

$$D = \frac{c_0}{c}. \quad (7.1)$$

Дисперсия, равная единице, соответствует сигналу, имеющему форму плато (рис. 7.7). Это возможно лишь в случае, если в потоке не происходит ни переме-

При увеличении как длины смесительной спирали, так и скорости потока дисперсия возрастает. При этом вследствие конвекции и диффузии изменяется также форма пика (из исходной прямоугольной она становится размытой) и увеличивается его ширина (рис. 7.9).

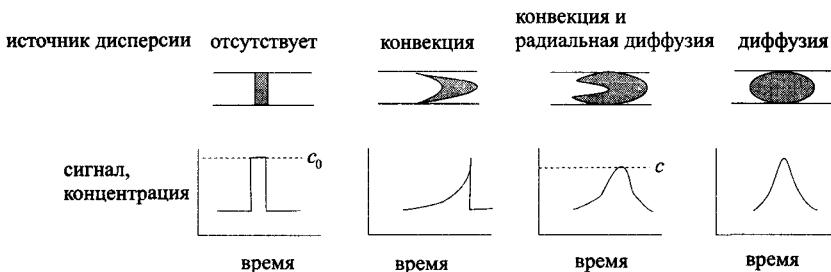


Рис. 7.9. Влияние конвекции и диффузии на концентрационный профиль зоны определяемого вещества и форму сигнала детектора.

В ходе дальнейшего развития ПИА стало возможным дополнительно уменьшить объемы вводимой пробы. Получили распространение и другие методы детектирования — потенциометрический с использованием ИСЭ, атомно-эмиссионный с ИСП, атомно-абсорбционный. Перенесение обычной методики химического анализа в проточно-инжекционный вариант, как правило, требует специального дополнительного исследования. Непосредственно в ходе проточно-инжекционного анализа можно осуществить множество видов пробоподготовки (табл. 7.2). В табл. 7.3 указаны некоторые стандартизованные методики анализа, осуществляемые при помощи ПИА.

Таблица 7.2. Виды пробоподготовки, осуществляемые в ходе ПИА.

Вид пробоподготовки	Применение
Установление pH	как правило, требуется всегда
Разложение под действием УФ-или микроволнового излучения	определение цианидов, фосфатов
Диализ	анализ окрашенных растворов, отделение матрицы
Отгонка	отделение определяемого компонента или матрицы
Экстракция, ионный обмен	отделение матрицы, концентрирование
Разбавление	анализ концентрированных растворов

В качестве примера рассмотрим определение анионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) — сульфонатов и сульфатов —

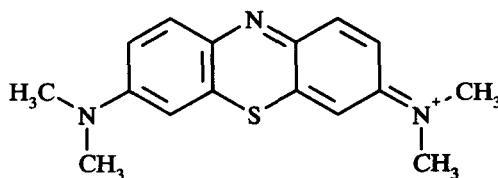


Рис. 7.10. Одна из мезомерных форм метиленового голубого — реагента для определения анионных поверхностно-активных веществ.

нными ПАВ ионный ассоциат, экстрагируемый хлороформом. Его концентрацию можно определить фотометрически при 650 нм.

Таблица 7.3. Методики проточно-инжекционного анализа, включенные в стандарты Германии.

Определяемый компонент	Диапазон концентраций, мг/л	Метод, реагенты	Стандарт
Аммиак	0,1–10	Бертло (газовая диффузия)	DIN 38406 E 23
Нитриты	0,01–1	реакция Грисса	DIN 38405 D 28
Нитраты	0,1–15	Cd-редуктор, реакция Грисса	DIN 38405 D 28
Общий азот	0,02–4	восстановление/окисление, реакция Грисса	ISO CD 11905
Хлориды	10–500	ИСЭ, тиоцианат	готовится
Фенольный индекс	0,01–1	4-аминоантимирин	готовится
Цианиды	0,01–1	хлорамин Т, барбитурат	готовится

На рис. 7.11 схематически изображена проточно-инжекционная установка для определения анионных ПАВ. Пробу вводят в поток носителя, представляющего собой дегазированную воду. Раствор реагента (метиленовый голубой в метаноле при pH 7 — фосфатный буфер) подается отдельным потоком. Органическую фазу (хлороформ) закачивают в поток воды и приводят к равновесию с водно-метанольной фазой, содержащей пробу и реагент, в экстракционной спирали. Органическую фазу отделяют в сепараторе и измеряют сигнал при помощи фотометрического детектора.

Часто возникает вопрос, какой из двух проточных методов — НПА или ПИА — использовать для решения той или иной задачи. Как правило, выбор определяется лишь необходимым числом

при помощи красителя метиленового голубого (хлорида метилтиониния). Эта методика используется для оценки эффективности биологической очистки сточных вод на очистных сооружениях. Катионный краситель метиленовый голубой (рис. 7.10) образует с анионными ПАВ ионный ассоциат, экстрагируемый хлороформом. Его концентрацию можно определить фотометрически при 650 нм.

анализов и временем, отводимым для них. Некоторую роль может играть и природа определяемого вещества, а также состав матрицы. В целом метод ПИА предпочтительнее для выполнения небольших серий анализов, поскольку в ПИА перенастроить оборудование для выполнения другой методики проще, чем в НПА. Для выполнения же большой серии стандартных анализов, а также достижения максимально возможной автоматизации процесса лучше использовать НПА. Этот метод более производительный ввиду возможности выполнения одновременных параллельных анализов при помощи многоканальных анализаторов. Часто метод НПА оказывается и чувствительнее, чем ПИА, поскольку сегментация потока пузырьками воздуха уменьшает дисперсию и размывание пиков. Однако при использовании предварительного концентрирования, применяемого, например, в виде экстракции хлороформом при определении фенольного индекса, метод ПИА по чувствительности может превзойти НПА.

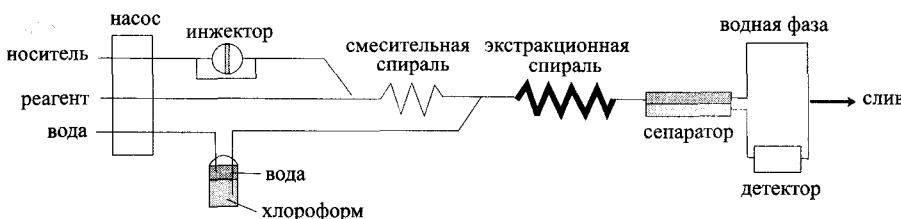


Рис. 7.11. Устройство для проточно-инжекционного определения анионных ПАВ при помощи метиленового голубого и экстракции хлороформом.

### Центрифужные анализаторы

Методы проточного анализа — НПА и ПИА — позволяют, как правило, осуществлять лишь последовательный анализ проб. Если требуемое время анализа достаточно велико как, например в кинетическом методе, то это обстоятельство не позволяет достичь высокой производительности. Поэтому разработаны специальные анализаторы, предназначенные для одновременного анализа целой серии проб. Смешение растворов всех проб с раствором реагента в них производится одновременно. Такие анализаторы находят применение в медицинских лабораториях для выполнения анализов кинетическими методами.

Конструктивно *параллельный анализатор* устроен в виде центрифуги (рис. 7.12). Держатель для проб имеет форму диска и содержит множество гнезд, расположенных по периметру. Каждое

гнездо имеет отсеки для раствора реагента и пробы. Перед началом анализа отсеки заполняют соответствующими растворами, а затем на короткое время приводят диск во вращение со скоростью около 350 оборотов в минуту при помощи центрифуги. При этом под действием центробежной силы растворы в каждом гнезде одновременно перемешиваются и поступают в фотометрическую ячейку. Иногда для ускорения перемешивания используют поток воздуха. После этого в каждой ячейке возможно измерить скорость химической реакции при помощи фотометрической индикации любым доступным способом — методом фиксированного времени или по наклону начального участка кинетической кривой (раздел 2.7).

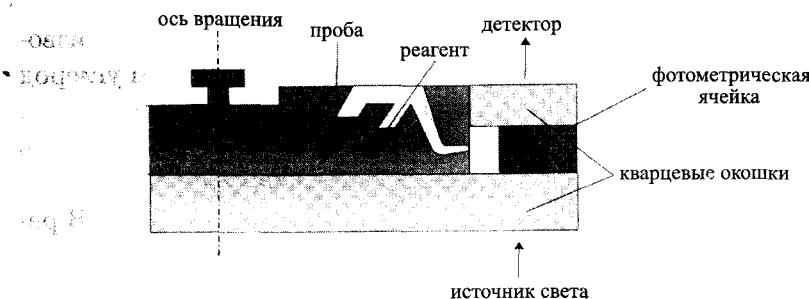


Рис. 7.12. Центрифужный анализатор для одновременного анализа нескольких проб кинетическим методом.

Такие анализаторы особенно часто используют для определения ферментов. В отличие от традиционного варианта ферментативных методов, применяемого для определения субстратов, здесь изучают зависимость скорости реакции от концентрации фермента, а не субстрата.

### Элементные анализаторы

В органической химии элементный анализ был и остается одним из основных методов определения состава молекул. Разработаны методики определения всех элементов, которые могут входить в состав органических веществ. Однако в автоматическом режиме чаще всего определяют лишь важнейшие из них, а именно углерод, водород, азот, а также кислород и серу. В автоматических элементных анализаторах (так называемых CHN-анализаторах) пробу сжигают, образующиеся газы разделяют газо-хроматографическим или адсорбционным методом и определяют, используя обычно детектор теплопроводности (катараметр).

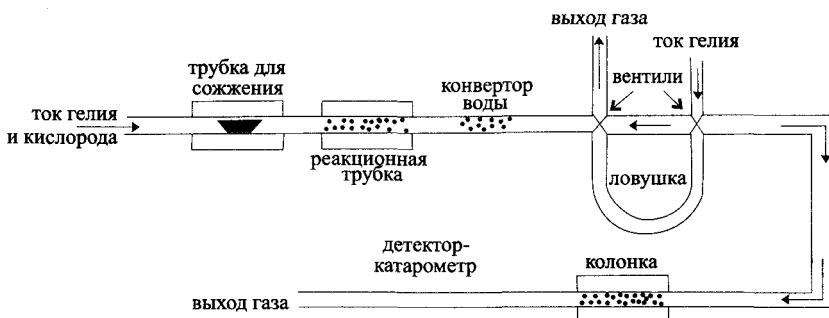


Рис. 7.13. Схема CHN-анализатора на основе газохроматографического разделения.

Масса навески пробы составляет 0,1–0,3 мг. Сожжение производят в атмосфере кислорода при 900°C (рис. 7.13). При этом углерод превращается в CO<sub>2</sub> и частично CO, водород сгорает до воды, а азот высвобождается в форме N<sub>2</sub> или оксидов азота. Газовую смесь пропускают через реактор — трубку, заполненную порошкообразным реагентом (на основе оксида меди) и нагретую до 750°C. В реакторе CO полностью окисляется до CO<sub>2</sub>, оксиды азота превращаются в N<sub>2</sub>, а избыток кислорода удаляется. Далее смесь газов следует через конвертор воды — трубку, заполненную карбидом кальция. При этом вода превращается в ацетилен — вещество, находящееся, в отличие от воды, в газообразном состоянии и при температуре ниже 100°C. Для отделения анализируемой газовой смеси от примесей и других продуктов сгорания ее пропускают через ловушку, охлаждаемую жидким азотом. Наконец, полученную газовую смесь анализируют методом газовой хроматографии, используя в качестве газа-носителя гелий, а в качестве детектора — катарометр. По окончании анализа из ловушки удаляют конденсат, пропуская через нее ток гелия в обратном направлении.

Этим методом невозможно определить кислород и серу. Их определяют отдельно, превращая в диоксид углерода и диоксид серы, соответственно. Для определения кислорода пробу подвергают пиролизу в присутствии платинированного угля; при этом кислород превращается в CO. Далее CO окисляют до CO<sub>2</sub> в реакторе с оксидом меди, как описано выше.

### Лабораторные роботы

Еще одно направление автоматизации процесса анализа — использование лабораторных роботов. Лабораторный робот представля-

ет собой механический манипулятор, устроенный подобно человеческой руке. Он имеет несколько подвижных стержней, аналогичных пальцам, которые приводятся в движение при помощи системы двигателей и могут перемещаться в различных плоскостях. С помощью таких манипуляторов можно выполнять самые разнообразные механические действия с анализируемой пробой: взвешивание, диспергирование (разбавление), операции пробоподготовки, включая смешение с реагентами, управление измерительными приборами (рис. 7.14). Выполнение всей последовательности операций можно осуществлять программным путем.

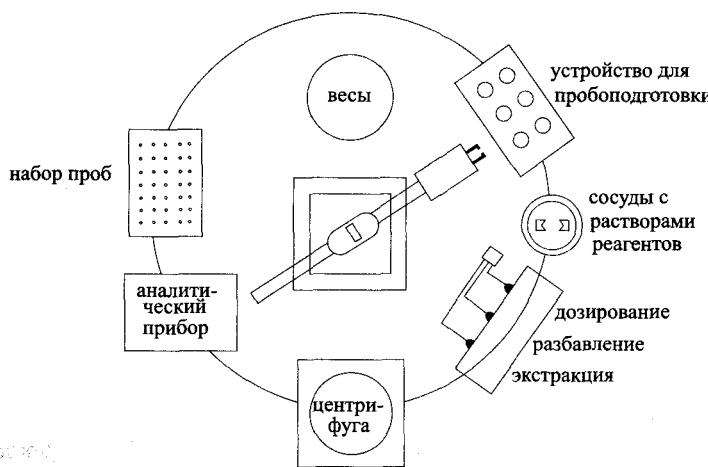


Рис. 7.14. Лабораторный робот и его окружение.

Лабораторные роботы широко применяются при манипуляциях с токсичными веществами и пробами неизвестного состава. Так, в производственных лабораториях весь цикл анализа органических веществ методом ЯМР выполняют при помощи роботов с тем, чтобы оператор не вступал в непосредственный контакт с неизвестным веществом.

## 7.2. Химические сенсоры

Потребность в разработке химических датчиков (сенсоров) обусловлена многими причинами. Во-первых, сенсоры призваны хотя бы отчасти заменить собой выполнение длительных и трудоемких методик химических методов анализа. Характерным примером может служить тенденция к замене метода фотометрии пламени для

определения калия, натрия, лития и кальция в крови на химические датчики на основе ионселективных электродов.

Во-вторых, использование сенсоров неразрывно связано с *автоматизацией производственных процессов*. Для управления и контроля производства необходимо постоянное измерение множества химических параметров. Наилучшим средством таких измерений непосредственно в технологическом производственном потоке (раздел 7.3) являются химические сенсоры. Для использования на производстве к сенсорам предъявляется много требований. Они должны быть *надежны в эксплуатации, иметь большой срок службы и быть устойчивы к воздействиям высоких и низких температур*.

В таких областях, как водное хозяйство, охрана окружающей среды, служба техники безопасности, медицина, необходимо постоянное *наблюдение и контроль* (мониторинг) целого ряда химических параметров. Примерами самых простых задач такого рода могут служить непрерывный контроль величины pH и мутности питьевых или сточных вод. Для решения этих задач можно использовать стеклянный электрод и оптический сенсор. В ближайшее время, вероятно, возникнет острая необходимость в организации такого же непрерывного внелабораторного контроля за содержанием тяжелых металлов или органических веществ в водах. Соответствующие сенсоры должны не реагировать на индивидуальные вещества, а измерять *суммарные параметры загрязненности*.

В области охраны окружающей среды актуальной задачей является контроль за выбросами из дымовых труб, за содержанием оксидов азота и серы в атмосфере. Очень удобным средством такого контроля могут служить газовые сенсоры (оптические и микроэлектронные). Значительно труднее организовать непрерывный контроль загрязнений почвы или донных отложений. Для этого потребуются сенсоры, способные осуществлять дистанционный анализ твердых тел.

Для оценки общего уровня загрязненности нужны недорогие, выпускаемые массовыми партиями датчики, от которых требуется регистрация лишь суммарных (за определенный период времени) или максимальных (пиковых) показателей. Для горнодобывающей промышленности необходимы датчики на взрывоопасные газы, а для метеорологии — датчики влажности или содержания CO в атмосфере.

В медицине бывает необходимо непосредственно в ходе хирургической операции постоянно контролировать соотношение калия

и натрия в отдельно взятой клетке организма, поскольку эта величина является одним из важнейших показателей общего состояния пациента. Роль подобных измерений *in situ* непрерывно возрастает. Химические сенсоры незаменимы и для контроля за концентрацией в организме лекарственных средств и продуктов их метаболизма, анестетиков. В перспективе подобные задачи призваны решать сенсоры нового поколения, не вводимые непосредственно в организм. Уже есть примеры использования такого рода сенсоров для определения глюкозы в крови на основании путем регистрации спектра ногтей в ближней ИК-области.

### Требования к химическим сенсорам и основные принципы их действия

Официальное определение химического сенсора гласит:

*химический сенсор — это измерительное устройство, обычно небольших размеров, способное непрерывно измерять концентрацию какого-либо компонента в потоке жидкости или газа и преобразовывать химическую информацию в электрический или оптический сигнал.*

Сенсор состоит из химически чувствительного слоя («распознавателя» веществ), преобразователя исходной химической информации в электрический или оптический сигнал и устройства регистрации и вывода данных, интегрированного в корпус сенсора. Примером химического сенсора может служить ионселективный электрод. В нем химически чувствительным слоем является твердая или жидкая мембрана, а исходная химическая информация преобразуется в электрический сигнал — величину потенциала, которую можно измерить при помощи соответствующего измерительного прибора.

К химическим сенсорам предъявляется множество разнообразных требований. Часть из них является общими для любых методов анализа, часть — специфическими. Важнейшие из требований представлены в табл. 7.4.

Наличие такого множества различных требований означает, что не может быть единого принципа работы химического сенсора, пригодного для всех случаев. Обзор основных принципов действия химических сенсоров приведен в табл. 7.5. Некоторые из них мы уже обсуждали в главах, посвященных соответствующим методам анализа, поэтому здесь мы остановимся лишь на особенностях реализации этих принципов применительно к сенсорам. Новые принципы,

положенные в основу микроэлектронных и оптоволоконных сенсоров, мы рассмотрим подробнее.

**Таблица 7.4.** Основные характеристики химических сенсоров и требования, предъявляемые к ним.

Характеристика, требование
Чувствительность
Динамический диапазон
Селективность, специфичность
Временной дрейф
Воспроизводимость
Возможность миниатюризации
Механическая устойчивость
Время отклика
Время эксплуатации
Совместимость с окружающими условиями (давление, температура, взрывоустойчивость, радиоактивное излучение, биосовместимость, стерильность)

## Электрохимические и микроэлектронные сенсоры

### Потенциометрические сенсоры

К потенциометрическим сенсорам относятся ионселективные электроды, рассмотренные ранее в разделе 4.3.

Принцип потенциометрических измерений можно применить и для определения газов таких, как диоксид углерода или аммиак, а также некоторых органических веществ, например мочевины.

### Сенсоры на основе твердых электролитов

Для создания сенсоров можно использовать явление электропроводности многих твердых тел при повышенных температурах. Особенно большое практическое значение имеют оксиды, электропроводность которых обусловлена оксид-ионами. Оксидные электроды работают аналогично металлическим как окислительно-восстановительные электроды. Основой оксидных электродов служит обычно  $ZrO_2$  с добавками  $CaO$  или  $Yb_2O_3$ , вызывающими образование вакансий в кристаллической структуре и тем самым увеличивающими электропроводность. Сенсоры на основе оксида циркония применяются для определения кислорода при высоких температурах — в то-

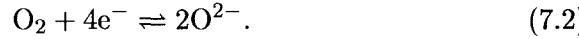


почных газах или в черной металлургии (кислородно-конверторный процесс, происходящий при температурах выше 1000°C).

**Таблица 7.5.** Основные типы химических сенсоров и принципы их действия.

Принцип действия	Тип сенсора
Изменение электропроводности	оксидно-полупроводниковые на основе органических полупроводников
Изменение потенциала	ионселективные электроды твердотельные газовые на основе полевых транзисторов
Изменение силы тока	амперометрические (датчик Кларка, ферментные, иммunoсенсоры, зонды на основе твердых электролитов)
Изменение резонансной частоты	пьезоэлектрические весы поверхностно-волновые акустические
Изменение оптических характеристик	датчики поглощения/пропускания, мутности, флуоресценции, показателя преломления
Термооптические явления	фотоакустические
Тепловые эффекты	термические/калориметрические пеллистиры

Зависимость потенциала оксидных электродов от содержания кислорода обусловлена окислительно-восстановительным равновесием



Возможно определение кислорода непосредственно в расплавах с использованием оксидного и платинового электродов. Для определении кислорода в газовой фазе применяют электрод из пористой платины, поры которого заполнены оксидным материалом. В этом случае электродом сравнения служит идентичный электрод, находящийся в камере сравнения — газовой среде с известным содержанием кислорода (обычно это воздух).

В соответствии с уравнением Нернста разность потенциалов между измерительным электродом и электродом сравнения зависит от парциальных давлений кислорода в измерительной камере  $p$  и камере сравнения  $p_0$  как

$$E = \frac{RT}{4F} \ln \frac{p_0}{p}. \quad (7.3)$$

Оксидные электроды используют и для определения содержания кислорода в выхлопных газах автомобильных двигателей. На основе полученных данных производят необходимую регулировку двигателя.

### Газочувствительные сенсоры

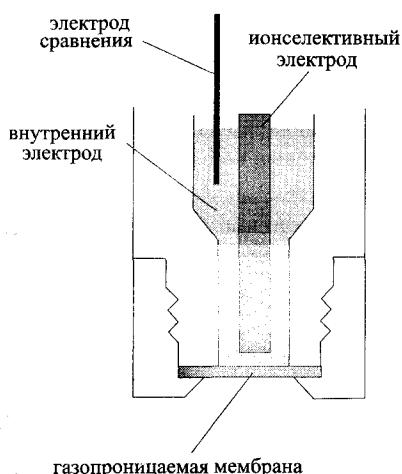


Рис. 7.15. Устройство газочувствительного потенциометрического зонда.

В принципиальном отношении газочувствительные сенсоры не представляют собой ничего нового. Основу их конструкции составляет обычная электрохимическая ячейка с ионселективным электродом и электродом сравнения. Оба электрода погружены во внутренний раствор электролита. Снаружи раствор электролита отделен от анализируемого раствора газопроницаемой мембраной (рис. 7.15). Мембрана может быть гомогенной или микропористой и обычно имеет толщину порядка 0,1 мм. Микропористые мембранны изготавливают из гидрофобного полимера — тефлона или полипропилена. Объем пор составляет

около 70%, размер — менее 1 мкм. Сквозь такие поры из анализируемого раствора во внутренний электролит свободно проникают молекулы газа, а молекулы воды и растворенные в ней ионы задерживаются гидрофобной мембраной.

Основой гомогенных мембранных обычно служит силиконовая резина. В такой мембране газ растворяется и диффундирует во внутренний раствор. Для обеспечения как можно более высокой скорости проникновения газа гомогенные мембранны обычно имеют гораздо меньшую толщину, чем микропористые, — порядка 0,02 мм.

Рассмотрим, как работает газовый сенсор для определения  $\text{CO}_2$ . Газ, диффундирующий через мембрану, проникает во внутренний раствор электролита — в данном случае это  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaCl}$ . При этом происходит кислотно-основная реакция:



Поскольку гидрокарбонат-ион находится в большом избытке, зависимость между концентрациями  $\text{CO}_2$  во внешнем растворе и  $\text{H}^+$



во внутреннем растворе близка к линейной. Для измерения концентрации  $\text{H}^+$  можно использовать любой подходящий ионселективный электрод, например стеклянный. Аналогичным образом можно определять концентрации и других газов, обладающих в водных растворах кислотно-основными свойствами, например,  $\text{SO}_2$  или  $\text{NO}_2$ . Соответствующие реакции приведены в табл. 7.6.

**Таблица 7.6.** Газы, для определения которых существуют промышленно выпускаемые сенсоры.

Определяемый газ	Реакция во внутреннем растворе	Ионселективный электрод
$\text{CO}_2$	$\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}_3\text{O}^+$	pH (стеклянный)
$\text{NO}_2$	$2\text{NO}_2 + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- + 2\text{H}_3\text{O}^+$	pH (стеклянный) или $\text{NO}_3^-$ -ИСЭ
$\text{SO}_2$	$\text{SO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSO}_3^- + \text{H}^+$	pH (стеклянный)
$\text{NH}_3$	$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$	pH (стеклянный)
$\text{H}_2\text{S}$	$\text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{S}^{2-} + 2\text{H}_3\text{O}^+$	$\text{Ag}_2\text{S}$ -ИСЭ
$\text{HCN}$	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CN}^- + \text{H}_3\text{O}^+$	$\text{Ag}_2\text{S}$ -ИСЭ
$\text{HF}$	$\text{HF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{F}^- + \text{H}_3\text{O}^+$	$\text{LaF}_3$ -ИСЭ

Газы, претерпевающие во внутреннем растворе однотипные реакции, мешают определению друг друга. Так, определению  $\text{NO}_2$  с использованием стеклянного электрода мешают  $\text{SO}_2$  и  $\text{CO}_2$ , поскольку они, как и  $\text{NO}_2$ , в водном растворе выделяют протон. Однако, если использовать нитрат-селективный электрод, то этого мешающего влияния уже не будет.

В табл. 7.6 приведены и другие примеры определения газов с использованием ИСЭ. Недостатками газовых сенсоров описанного типа являются значительное время отклика и невысокая чувствительность.

### Биокаталитические мембранные сенсоры

Еще одна разновидность сенсоров представляет собой сочетание ионселективных электродов с биохимическими реакциями, катализируемыми ферментами, например, превращением мочевины в аммиак и диоксид углерода. Образующиеся продукты можно определять, в частности, при помощи газочувствительных сенсоров, описанных выше. С помощью биокаталитических сенсоров обычно определяют вещества, представляющие интерес для биологии и биохимии, в том числе достаточно сложные органические молекулы. В биосенсорах можно использовать простые в эксплуатации ионселективные

электроды с малым временем отклика. Применение биологических катализаторов — ферментов — обеспечивает высокоселективное протекание реакций в мягких, с точки зрения величин рН и температуры, условиях при минимальном расходе субстрата.

Чтобы предотвратить потери достаточно дорогостоящего фермента, его *иммобилизуют*. Иммобилизацию можно осуществлять как непосредственно на поверхности мембранны, так и в специальном слое, покрывающем мембранны.

Примером субстрат-селективного мембранных электрода может служить электрод для определения мочевины на основе аммоний-селективного стеклянного электрода. Ион аммония является одним из продуктов реакции гидролиза мочевины, протекающей под действием фермента уреазы:

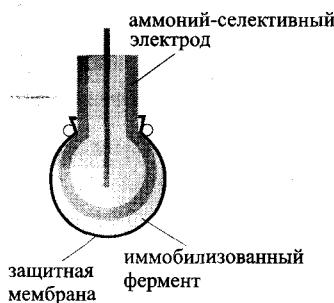
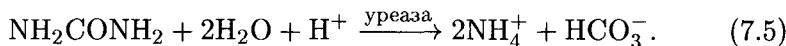


Рис. 7.16. Устройство биокаталитического мембранных сенсора на основе аммоний-селективного электрода и фермента уреазы.

и для определения аммиака (8–9) различаются.

Выпускаемые промышленностью тест-системы для массовых определений мочевины устроены как проточные реакторы с иммобилизованным ферментом. Раствор пробы пропускают через такой реактор, затем подщелачивают и определяют выделившийся аммиак при помощи газочувствительного датчика (см. табл. 7.6).

### Сенсоры на основе полевых транзисторов

Все рассмотренные ранее типы потенциометрических сенсоров включают чувствительную мембранны, электрический контакт которой с

Уреазу иммобилизуют в поликарбонатном слое, нанесенном на поверхность аммоний-селективного электрода (рис. 7.16). К сожалению, исходный электрод недостаточно селективен к ионам аммония, поэтому при анализе биологических жидкостей заметно мешающее влияние ионов натрия и калия.

Вместо стеклянного электрода можно использовать газочувствительный электрод для определения аммиака описанного выше типа. Однако у такого электрода невелика чувствительность, поскольку оптимальные значения рН для протекания ферментативной реакции (около 7) и для определения аммиака (8–9) различаются.

остальными элементами цепи осуществляется посредством раствора электролита. Для усиления и регистрации электрического сигнала в этом случае необходимо отдельное устройство.

Однако возможно интегрирование сенсора и устройства для последующей обработки сигнала в одно целое, если использовать *полевые транзисторы*. Такие сенсоры, впервые разработанные Бергвельдом, называются химическими или ионселективными полевыми транзисторами (ИСПТ). Основой ИСПТ служит известное микроэлектронное устройство — металлооксидный полевой транзистор (рис. 7.17). Он состоит из кремниевой подложки с р-проводимостью, контактирующей с двумя областями из кремния с п-проводимостью. Эти области называются истоком и стоком и посредством металлических контактов (напыленный алюминиевый слой) могут быть включены в электрическую цепь. Подложка, сток и исток покрыты слоем изолятора, диоксида кремния. У транзистора, изображенного на рис. 7.17, имеется еще один дополнительный защитный слой из нитрида кремния.

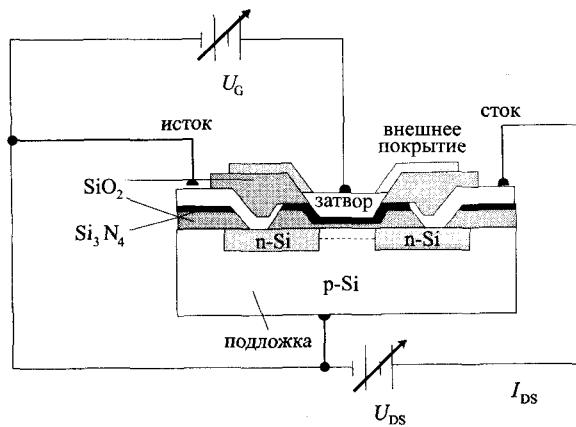


Рис. 7.17. Схема устройства металлооксидного полевого транзистора.

Если к истоку и стоку приложить напряжение  $U_{DS}$ , то между ними не потечет никакой ток, поскольку в любом случае один из р-п-переходов — между истоком и подложкой или подложкой и стоком — окажется запертым. Однако полевой транзистор содержит еще один электрод, называемый затвором. Он отделен от подложки изолирующим слоем из диоксида кремния.

Если приложить напряжение к затвору и подложке  $U_G$ , то в канале (слое подложки между истоком и стоком) возникнет электри-



ческое поле. Под его воздействием между истоком и стоком начнет протекать ток  $I_{DS}$ . Величина этого тока зависит от приложенного напряжения  $U_G$ , причем вполне измеримый ток будет наблюдаться даже при очень малом значении  $U_G$ . В то же время, поскольку затвор отделен от подложки слоем диэлектрика, ток между затвором и подложкой пренебрежимо мал. Полевые транзисторы очень удобны как высокоомные входы вольтметров для потенциометрических измерений и часто используются там в качестве усилителей. Зависимость силы тока  $I_{DS}$  в цепи исток–сток от напряжения  $U_G$  называется вольтамперной характеристикой полевого транзистора.

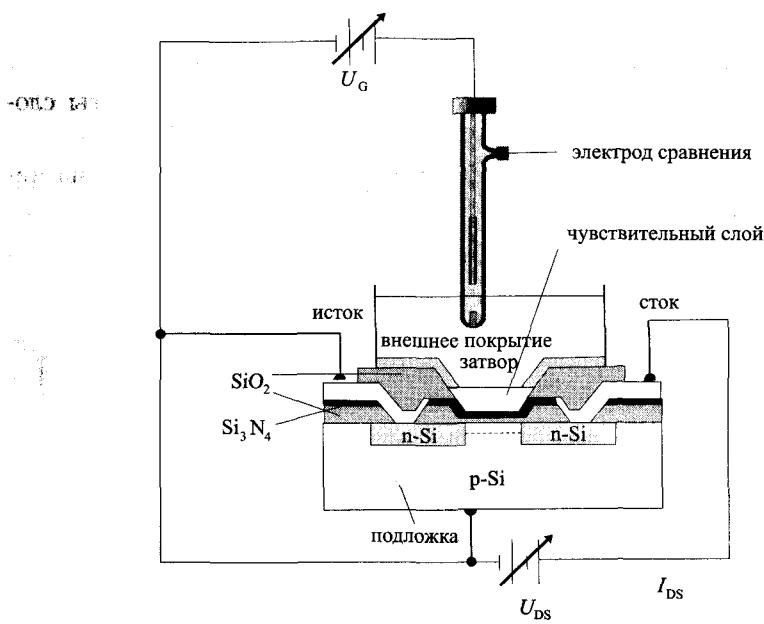
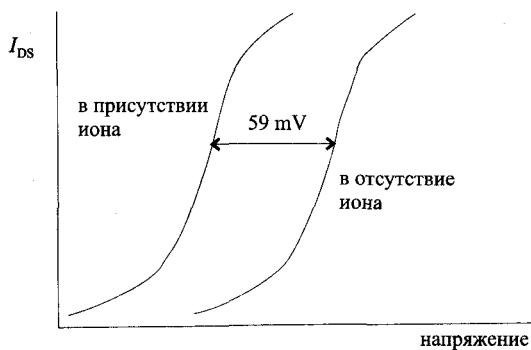


Рис. 7.18. Сенсор на основе ионселективного полевого транзистора (ИСПТ).

Для создания ионселективного электрода на основе полевого транзистора достаточно заменить слой  $\text{SiO}_2$ , отделяющий затвор от подложки, на соответствующую ионселективную мембрану (рис. 7.18). Контакт в этом случае осуществляется посредством обычного электрода сравнения. В присутствии иона, к которому чувствительна мембрана, ее потенциал изменяется. Напряжение  $U_G$ , подаваемое на затвор, складывается с напряжением, возникающим на мембране. Это приводит к параллельному сдвигу вольтамперной характеристики транзистора на величину, равную изменению потенциала мембраны. В идеальном случае для однозарядного иона величина

этого сдвига в соответствии с уравнением Нернста составляет 59 мВ при изменении концентрации иона в 10 раз (рис. 7.19).



**Рис. 7.19.** Вольтамперные характеристики ИСПТ. Сила тока  $I_{DS}$  определяется суммой внешнего напряжения  $U_G$  и потенциала мембраны.

На практике при потенциометрических измерениях с использованием ИСПТ обычно силу тока в цепи исток-сток поддерживают постоянной, измения для этого соответствующим образом напряжение на затворе. Это изменение напряжения линейно связано с логарифмом активности потенциалопределяющего иона в соответствии с уравнением Нернста.

Таблица 7.7. Примеры химически селективных полевых транзисторов.

Тип	Затвор	Определяемые вещества
Газочувствительные	Pd	H <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , CO
ПТ		
Ионселективные	Ta <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , BN	H <sup>+</sup>
	Газопроницаемые мем- бранны + Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub> , CO <sub>2</sub>
	валиномицин	K <sup>+</sup>
Ферментные	гель, полимер с иммоби- лизованным ферментом	пенициллин, ацетилхо- лин
Иммунные	антигены или антитела	альбумин

Впервые ИСПТ были применены для измерения рН. Для этого в качестве чувствительного слоя в принципе возможно использовать даже слой  $Si_3N_4$ , уже имеющийся в стандартных полевых транзисторах, однако в этом случае чувствительность невелика. Теоретическая нернстовская величина наклона градуировочной зависимости достигается при использовании слоя  $Ta_2O_5$ . Другие примеры применения полевых транзисторов для определения различных веществ — ионов, газов, ферментов и антител — приведены в табл. 7.7. Принципиально возможно использование в полевых транзисторах ион-селективных мембран всех типов, применяющихся в обычных ИСЭ.

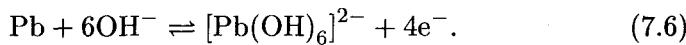
Это открывает возможности к созданию разнообразных микроэлектронных сенсоров.

Принцип действия *ферментных* сенсоров такой же, как и у рассмотренных ранее аналогичных сенсоров на основе обычных ИСЭ. Одним из примеров иммунных методов анализа может служить радиоиммунный анализ (раздел 3.6).

В ходе разработки особо миниатюрных сенсоров на базе полевых транзисторов порой возникает ряд неожиданных проблем. В элементах микроэлектронной техники некоторые позиции очень чувствительны к воздействию окружающей среды, и при изготовлении серийных изделий их герметично изолируют слоем пластмассы или керамики. Для создания сенсоров это покрытие бывает необходимо удалить. Однако в этом случае показания сенсора часто оказываются очень нестабильными, сильно зависящими от атмосферной влажности, колебаний температуры или воздействия различных видов излучения. Причина состоит в том, что при таких малых размерах начинают сказываться факторы, которые при работе с изделиями большего размера пренебрежимо малы. В частности, это могут быть эффекты, связанные с поверхностным напряжением, явлениями диффузии, ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, квантовомеханическими туннельными эффектами.

### Амперометрические сенсоры

Применение вольтамперометрических измерений для создания химических сенсоров нам уже знакомо на примере амперометрического датчика Кларка для определения кислорода (раздел 4.4). В нем используется рабочий электрод — катод — из платины в паре с серебряным анодом. Можно использовать и электроды из других материалов — например, рабочий серебряный электрод в паре со свинцовым анодом. Электролитом в этом случае служит раствор гидроксида калия. На серебряном катоде происходит восстановление кислорода, а на свинцовом аноде — окисление свинца:



Преимущество такого сенсора перед датчиком Кларка в том, что продукт анодной реакции — гидроксокомплекс свинца — растворим в воде и не отравляет электрод. В случае же датчика Кларка продуктом анодной реакции является нерастворимый хлорид серебра, осаждающийся на электроде.

Известны амперометрические сенсоры и для определения других газов. В частности, на предприятиях по хлорированию питьевой воды используют безмембранные сенсоры для определения свободного хлора, а в состав средств защиты шахтеров входит датчик на оксид углерода. При превышении предельно допустимой концентрации он автоматически подает сигнал тревоги. Однако по основным своим характеристикам все эти сенсоры уступают датчику Кларка.

Датчик Кларка в сочетании с ферментными мембранными может использоваться для определения различных субстратов. Мы уже упоминали (раздел 4.4) о возможности определения глюкозы при помощи глюкозооксидазы. Аналогичным образом можно определять галактозу с помощью галактозооксидазы или мочевину с помощью уриказы.

### Кондуктометрические сенсоры

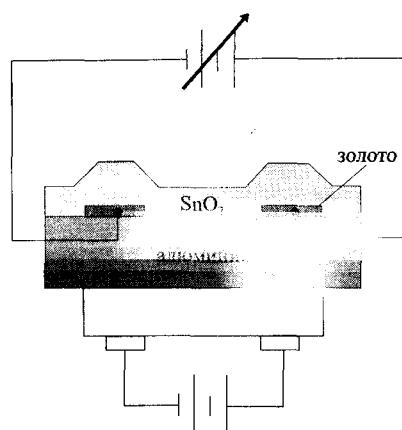


Рис. 7.20. Устройство газового сенсора на основе  $\text{SnO}_2$ .

ствует с ними. При этом электропроводность оксидного слоя изменяется.

Таким образом, подобные сенсоры являются неселективными датчиками для определения газов-восстановителей —  $\text{H}_2$ ,  $\text{PH}_3$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CH}_4$  и других. Они могут использоваться и как датчики на кислород. Такие сенсоры отличаются исключительной простотой устройства.

Явление электронной проводимости используется и в так называемых хемириезисторах. Сенсоры этого типа конструктивно вы-

В основе работы целого ряда газовых сенсоров лежит принцип измерения электропроводности. Наиболее известны сенсоры на основе оксидных материалов с электронной проводимостью (п-типа) —  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . На рис. 7.20 показано устройство сенсора с чувствительным слоем из  $\text{SnO}_2$ . В основе действия подобных сенсоров лежит то обстоятельство, что на поверхности чувствительного слоя всегда адсорбируется кислород. При контакте с газами, обладающими восстановительными свойствами, адсорбированный кислород взаимодействует с ними. При этом электропроводность оксидного слоя изменяется.

полнены в виде двух рядов параллельных стержней. Каждый стержень покрыт тонким слоем органического полупроводника — обычно фталоцианина или его комплекса с каким-либо ионом металла (к числу таких комплексов относятся, в частности, гемин и хлорофилл). Варьируя природу центрального атома, можно создавать сенсоры для определения различных газов —  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$  и других.

## Оптические сенсоры

Развитие оптических сенсоров началось с появлением световодов для передачи излучения видимого диапазона. В настоящее время уже существуют оптоволоконные световоды и, соответственно, оптические сенсоры также для УФ-, ближней и средней ИК-областей спектра. Наряду с оптоволоконными разрабатываются и сенсоры на основе *планарной оптики*.

В основе действия *оптических сенсоров* лежит зависимость той или иной оптической характеристики от концентрации вещества. С технологической точки зрения различают три поколения оптических сенсоров. Оптические сенсоры первого поколения служат, по существу, лишь устройствами для передачи сигнала и измерения величин, характеризующих традиционные, широко используемые в химическом анализе оптические явления — поглощение, испускание, ослабление, преломление света, флуоресценция. Сенсоры второго поколения используют те же явления в сочетании с химическими реакциями. Их уже можно считать системами распознавания химических веществ (хеморецепторами). В основе оптических сенсоров третьего поколения лежат новые принципы действия и оптические явления, не имеющие аналогий в традиционных методах анализа — образование поверхностных волн, интерференция, поляризация света.

### Оптические сенсоры первого поколения

Простейший оптический сенсор представляет собой оптическую измерительную ячейку, соединенную с фотометром посредством *световода* — волоконно-оптического кабеля. Таким способом можно непосредственно измерять интенсивность окраски растворов или их флуоресценцию, например, для оценки загрязненности природных вод органическими веществами.

Рассмотрим сначала некоторые общие принципы, на которых основано использование волоконных кабелей в качестве световодов. Волоконно-оптический кабель изготовлен из стекла, кварца или пластмассы и имеет диаметр от 0,05 мкм до 0,6 см. Свет может пере-



даваться как посредством одного-единственного волокна, так и по целому пучку волокон. Эти волокна могут быть расположены как случайно, так и в определенном порядке, например, при передаче цельного изображения. Передача изображений по световодам широко используется в медицине при исследовании внутренних органов.

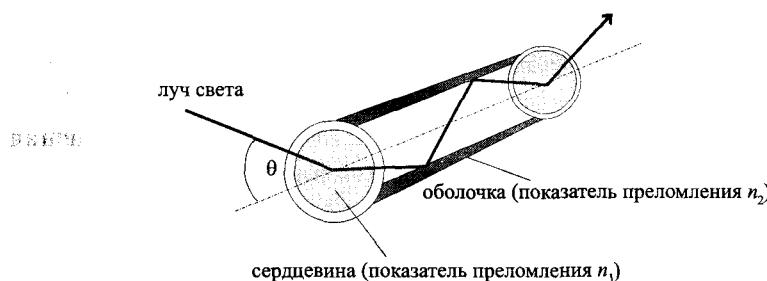


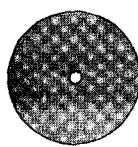
Рис. 7.21. Отражение света от стенок световода.

Ход лучей в волоконном кабеле изображен на рис. 7.21. В зависимости от угла падения луча часть света отражается от границы раздела сердцевины и оболочки, а часть проходит. Для обеспечения полного отражения света вдоль всего световода угол падения  $\theta$  должен составлять определенную величину, называемую предельным углом и зависящую от соотношения показателей преломления сердцевины  $n_1$  и оболочки  $n_2$ . При этом показатель преломления сердцевины должен быть больше, чем оболочки. Часто в качестве материала сердцевины и оболочки используют стекла с показателями преломления 1,6 и 1,5, соответственно. Для работы в средней ИК-области используют другие материалы, например, халькогенидные стекла (As-Se-Te) или поликристаллические галогениды серебра, прозрачные в диапазоне 2–20 мкм. Показатель преломления сердцевины оптического волокна, состоящего из 75% AgBr и 25% AgCl, составляет 2,21. Материалом оболочки служит полимер с показателем преломления 1,5.

С величиной предельного угла и показателями преломления  $n_1$  и  $n_2$  связана важная характеристика оптического волокна, называемая *численной апертурой*  $NA$ :

$$NA = \sin \theta = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}. \quad (7.7)$$

Чем больше численная апертура, тем шире может быть входной конус светового потока.



одномодальное  
оптическое  
волокно

Вдоль световода луч света может распространяться по различным траекториям, называемым модами. Чаще всего используют *многомодальные световоды*. У таких световодов показатель преломления материала сердцевины однородный, а на границе с оболочкой он скачкообразно изменяется. Существуют и *одномодальные* световоды. Они характеризуются очень тонкой сердцевиной и достаточно толстой оболочкой — толщиной по меньшей мере в

10 раз больше диаметра сердцевины. Траектория распространения луча вдоль такого световода близка к линейной. По таким световодам можно передавать только хорошо сфокусированные потоки света, например, генерируемые лазерами. В лабораторной практике одномодальные световоды используют главным образом лишь для интерферометрических измерений.

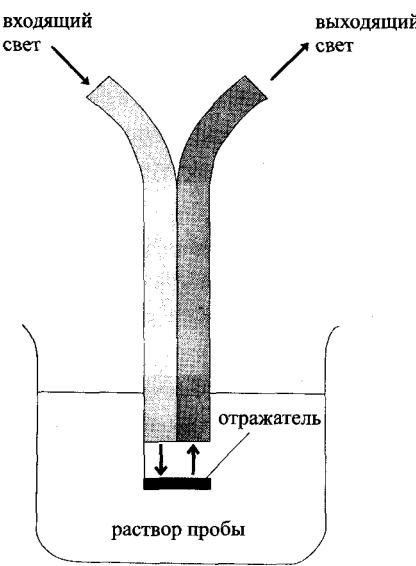


Рис. 7.22. Оптический сенсор первого поколения для измерения оптической плотности раствора.

Световод для соединения с измерительным прибором — спектрометром или фотометром — имеет форму Y-образного кабеля (рис. 7.22). Свет, падающий от источника, посредством оптического кабеля достигает анализируемого раствора и при помощи отражателя (зеркала) попадает в другой кабель и поступает к фотометру. Длина оптического пути в этом случае вдвое больше, чем расстояние от конца кабеля до зеркала.

Волоконный кабель играет лишь роль передатчика света от источника излучения к приемнику. В качестве приемников могут использоваться различные устройства — например, фотодиоды или оптоэлектронные элементы индикации. Источниками света могут служить полупроводниковые светодиоды.

Примеры применения волоконно-оптических сенсоров первого поколения приведены в табл. 7.8. В то время как, например, фото-



метрическое титрование с применением оптоэлектронных сенсоров достаточно легко осуществить на практике, техническая реализация непрерывного слежения за производственным процессом или состоянием природной воды требует применения достаточно сложных устройств. Непосредственный контроль *органических загрязнителей* природных вод можно осуществить путем измерения флуоресценции. При этом оценивается лишь суммарное качество воды без определения отдельных компонентов. Кроме того, следует иметь в виду, что далеко не все органические загрязнители способны флуоресцировать. Можно использовать и метод комбинационного рассеяния света с применением лазерных источников возбуждения. В этом случае возможно определение загрязняющих веществ при их содержаниях порядка нескольких частей на миллиард на удалении до 1000 м.

**Таблица 7.8.** Области применения оптических сенсоров первого поколения.

Определяемое вещество	Оптическая характеристика	Области применения
Ионы меди	поглощение при 930 нм	цветная металлургия
Органические вещества	флуоресценция	контроль природных вод
Гемоглобин	диффузное отражение при 600–750 нм	медицина
Галотан (анестетик)	поглощение в ближней ИК-области	медицина

### Сенсоры с системами распознавания

Многие вещества не обладают свойствами, позволяющими определять их путем непосредственного измерения какой-либо оптической характеристики. В этом случае нужны системы химического распознавания, или хеморецепторы — устройства, изменяющие свои оптические характеристики (например, окраску) в присутствии определяемого вещества. Необходимый для этого реагент химически связывают или каким-либо иным образом иммобилизуют на торце световода (рис. 7.23). Иммобилизацию можно осуществить путем сорбции на ионообменной смоле, при помощи желатина или другого полимерного геля либо просто поместив раствор реагента в небольшой сосуд, отделенный от внешнего раствора мембраной.

Первые оптические сенсоры второго поколения, называемые также *оптродами*, применялись для определения pH. Рассмотрим устрой-

ство такого сенсора. На конце Y-образного кабеля находится иммобилизованный кислотно-основной индикатор, например, феноловый красный в полиакриламидном геле. Изменение окраски реагента в зависимости от pH можно контролировать путем измерения оптической плотности с использованием зеркала, как описано в предыдущем разделе.

Чтобы сенсор был обратим, необходимо, чтобы была обратима реакция, лежащая в основе его действия. Рассмотрим простейший пример равновесия с участием определяемого вещества в растворе (или газовой фазе) A и иммобилизованного реагента  $\bar{R}$ :

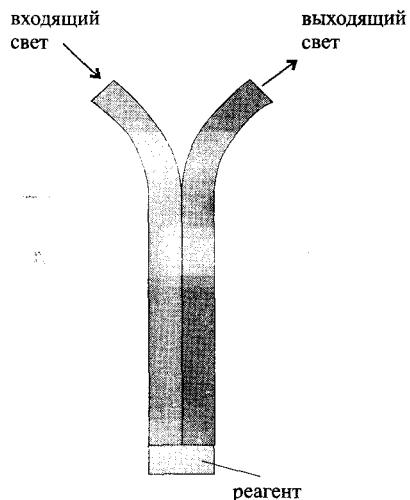


Рис. 7.23. Оптический сенсор второго поколения с иммобилизованным реагентом.

Выражение константы этого равновесия записывается следующим образом:

$$K = \frac{\bar{A}\bar{R}}{[A]\bar{R}}. \quad (7.9)$$

В соответствии с законом Ламберта-Бера величина оптической плотности продукта реакции  $\bar{A}\bar{R}$ , измеряемая сенсором, прямо пропорциональна его концентрации, которая равна

$$\bar{A}\bar{R} = K [A] \bar{R}. \quad (7.10)$$

Примем для простоты, что концентрация вещества в растворе равна общей концентрации определяемого вещества:  $[A] = c_A$ . Концентрация свободной формы иммобилизованного реагента  $\bar{R}$  равна разности его общей концентрации и концентрации продукта реакции:  $\bar{R} = c_R - \bar{A}\bar{R}$ . Подставляя эти соотношения в уравнение (7.10), получаем следующее выражение зависимости  $\bar{A}\bar{R}$  от концентрации определяемого вещества:

$$\bar{A}\bar{R} = \frac{K c_A c_R}{1 + K c_A}. \quad (7.11)$$

Величины  $K$  и  $c_R$  можно считать постоянными. В этом случае график зависимости концентрации продукта реакции в иммобили-

зованным слое и, следовательно, показаний сенсора от концентрации определяемого вещества имеет вид, изображенный на рис. 7.24.

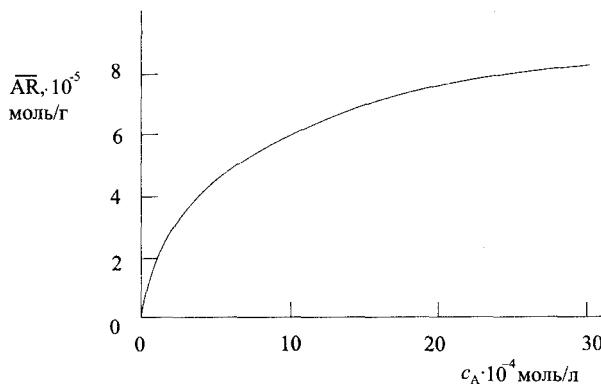


Рис. 7.24. Нелинейная зависимость между показаниями оптического сенсора с иммобилизованным реагентом  $\bar{R}$  и концентрацией определяемого вещества. Для расчета использованы значения  $c_R = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/г,  $K = 1660$  л/моль.

Общий вид градуировочной зависимости, приведенной на рис. 7.24, весьма типичен для оптических сенсоров второго поколения. Ее можно считать линейной лишь при достаточно малых концентрациях определяемого вещества, а именно, при  $Kc_A \ll 1$ , т.е.  $c_A \ll 1/K$ . С увеличением концентрации наблюдается загибание градуировочной зависимости и, наконец, насыщение — достижение предельного значения. При достижении насыщения использование сенсора невозможно, так как оптическая плотность перестает зависеть от концентрации определяемого вещества.

Нелинейный характер градуировочной зависимости сам по себе не является принципиальным препятствием для ее использования, тем более с применением современных компьютерных методов обработки данных. Однако в этом случае точность определения уменьшается. Поэтому, как правило, стараются использовать лишь начальный, приближенно линейный, участок. Его протяженность тем больше, чем меньше константа равновесия реакции. В отличие от традиционных оптических методов, где стараются использовать реакции с высокими значениями констант равновесий, для оптров целесообразно применять реакции с меньшими величинами констант с тем, чтобы расширить диапазон определяемых содержаний.

Одним из способов иммобилизации реагента является его **химическое связывание** на поверхности световода. Ковалентное связывание реагента характеризуется высокой прочностью. При этом



исключается его вымывание. Для осуществления химического связывания необходимо, чтобы как на поверхности световода, так и в молекуле реагента имелись необходимые функциональные группы. Их создают путем химической модификации. В качестве носителя используют стекла, силикагель, полимерные материалы, обычно природного происхождения, — целлюлозу, декстрин, агарозу. Можно использовать и синтетические полимеры, в частности, полиакриламид. Примеры модификации поверхности носителей для химической иммобилизации реагентов приведены в табл. 7.9. Технология химического закрепления реагентов на поверхности достаточно хорошо отработана и используется, в частности, в хроматографии для модификации неподвижных фаз.

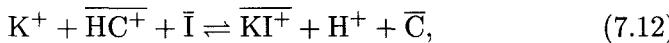
Таблица 7.9. Примеры химической иммобилизации реагентов для оптических сенсоров.

Исходный носитель	Модифицированный носитель (функциональные группы)	Реагент для модификации	Возможно дальнейшее связывание с соединениями
Целлюлоза	аминоэтил-	бромциан, этилендиамин	карбоксилаты, сульфокислоты
	карбоксиэтил-	хлоруксусная кислота	амины
Стекло, силикагель	аминопропил-	γ-аминопропилтриэтиоксисилан	карбоновые кислоты, альдегиды
	винил-	триацетоксивинилсилан	нуклеофилы
Полиакриламид	карбоксиэтил-	сильные щелочи и кислоты	амины, белки

Оптоволоконные сенсоры второго поколения применяют не только для определения pH. Существует множество оптродов для определения различных катионов и анионов (табл. 7.10). В основе их действия наряду с явлениями поглощения (шире — ослабления) света может лежать, например, флуоресценция. Преимущество флуоресцентных сенсоров состоит в их высокой чувствительности. Чувствительность можно дополнительно повысить, используя мощные источники излучения, поскольку интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна интенсивности источника.

Использование принципов, лежащих в основе действия ионселективных электродов, привело к созданию ионселективных оптродов. Одна из возможных идей состоит в использовании мембран (обычно поливинилхлоридных, как и для ионселективных электродов), содер-

жащих наряду с ионофором — веществом, ответственным за комплексообразование с определяемым ионом, — также хромофора, т.е. вещества, ответственного за изменение окраски. Так, на ионселективном оптроде для определения калия существует следующее сложное ионообменное равновесие:



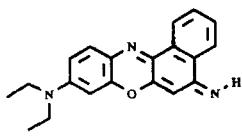
где  $HC^+$ ,  $C$  — протонированная и депротонированная формы хромофора в фазе мембранны,

$I$ ,  $KI^+$  — ионофор и его комплекс с калием в фазе мембранны.

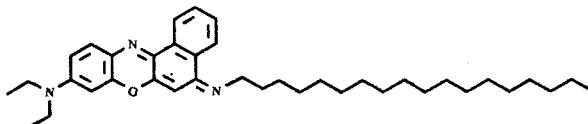
Таблица 7.10. Волоконно-оптические сенсоры (оптроды) с иммобилизованными реагентами.

Определяется	Реагент/носитель	Принцип измерения
pH	конго красный/ацетилцеллюлоза	поглощение
pH	флуоресцеинамин/стекло	флуоресценция
$UO_2^{2+}$	50% раствор фосфата/в сосуде	флуоресценция
$Al^{3+}$	морин/целлюлоза	флуоресценция
$K^+$	валиномицин+нильский голубой/ПВХ	поглощение
$Cl^-$	флуоресцеин/коллоидное серебро	флуоресценция
влажность	$CoCl_2$ /желатин	поглощение
$O_2$	акрифлавин/силикагель	фосфоресценция
$NH_3$	оксазинперхлорат/адсорбция на стекле	поверхностные волны
альбумин	бромкрезоловый зеленый/целлофан	поглощение

В качестве ионофора можно, как и в потенциометрии, использовать валиномицин. Хромофором может служить краситель нильский голубой или запатентованное вещество ETH 5294, синтезированное проф. Симоном в Цюрихе:



нильский голубой



ETH 5294

Достоинством оптродов этого типа является широкий динамический диапазон концентраций, сравнимый с таковым для ионселективных электродов. Для создания оптродов можно использовать широкий ассортимент ионофоров, применяемых в потенциометрии.

### Оптроды третьего поколения

Оптроды третьего поколения основаны на использовании новых оптических явлений. Одно из них носит название *поверхностных световых волн* и проявляется в частичном поглощении света при его полном отражении на границе раздела оптических сред. С этим явлением мы уже сталкивались при обсуждении метода ИК-спектроскопии с нарушенным полным внутренним отражением.

Рассмотрим оптрод третьего поколения, предназначенный для определения аммиака (рис. 7.25; см. также табл. 7.10). Он представляет собой тонкое стеклянное волокно или капилляр, покрытый слоем красителя, изменяющего свою окраску в присутствии аммиака. Если пустить луч света под малым углом к оси оптрода, то он испытает многократное (до 600 раз) полное отражение. При каждом таком отражении часть света поглощается. Измеренная величина общего поглощения зависит от оптических характеристик красителя и, следовательно, от содержания аммиака.



Рис. 7.25. Оптический сенсор, использующий явление поверхностных световых волн.

Ряд других оптических сенсоров упомянут в табл. 7.10.

По сравнению с электрохимическими сенсорами оптические сенсоры обладают рядом **достоинств**.

- Использование оптических сенсоров позволяет в принципе регистрировать весь оптический спектр и, таким образом, получать значительно больше информации.
- Оптические сенсоры не подвержены влиянию электрических помех.
- При использовании оптических сенсоров обычно не требуется применение дополнительных устройств, подобных электроду сравнения.
- Фаза, содержащая реагент, легко может быть заменена. В связи с этим получили распространение одноразовые оптические сенсоры.

Оптические сенсоры имеют и ряд недостатков.

- Они подвержены помехам со стороны дневного света. Эти помехи можно предотвратить, если использовать пульсацию (модуляцию) источника излучения. Очень удобными источниками пульсирующего излучения могут служить светодиоды.
- Срок службы оптических сенсоров может быть невелик из-за вымывания реагента.
- Оптические сенсоры имеют, как правило, узкий динамический диапазон (см. уравнение (7.11)). Исключение составляют ион-селективные оптроды.

## Термические (калориметрические) сенсоры

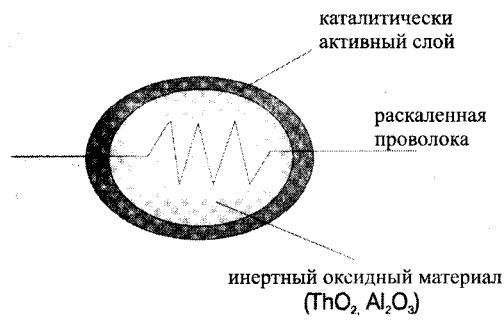


Рис. 7.26. Схема устройства пеллистора с каталитически активным слоем Pt или Pd.

тый каталитически активным слоем Pt или Pd (рис. 7.26). На поверхности такого слоя адсорбируется атмосферный кислород. Если на поверхность каталитически активного слоя попадают молекулы горючих газов, например CO или  $\text{CH}_4$ , то они каталитически окисляются, выделяя тепло и увеличивая температуру чувствительного элемента. Это увеличение температуры, пропорциональное содержанию газа, регистрируют при помощи термосопротивления, включенного в компенсационную электрическую цепь (мостик Уитстона).

Калориметрические сенсоры в форме миниатюрных калориметров (раздел 2.8) применяют и для измерений в растворах. Простейшая конструкция таких сенсоров представляет собой проточный реактор с иммобилизованным реагентом. На выходе из реактора

Действие некоторых газовых сенсоров, называемых *пеллисторами*, основано на измерении теплоты, выделяющейся в результате каталитической реакции. Чувствительный элемент такого сенсора представляет собой королек стеклообразного материала, помещенный на подогреваемую до температуры порядка 550°C платиновую проволоку и покрытый каталитически активным слоем Pt или Pd (рис. 7.26). На поверхности такого слоя адсорбируется атмосферный кислород. Если на поверхность каталитически активного слоя попадают молекулы горючих газов, например CO или  $\text{CH}_4$ , то они каталитически окисляются, выделяя тепло и увеличивая температуру чувствительного элемента. Это увеличение температуры, пропорциональное содержанию газа, регистрируют при помощи термосопротивления, включенного в компенсационную электрическую цепь (мостик Уитстона).

установлен терморезистор для измерения теплоты, выделяющейся в ходе реакции. Хотя устройства такого типа, строго говоря, не подпадают под определение сенсора (см. выше), они имеют с сенсорами (в строгом смысле слова) столь много общего, что их тоже относят к сенсорам. Принцип измерений, лежащий в основе калориметрических сенсоров, сам по себе неселективен, однако это компенсируется высокой селективностью используемых химических реакций, например, взаимодействия фермента с субстратом. При помощи ферментативных калориметрических сенсоров возможно определение мочевины, пенициллина, глюкозы, сахарозы, холестерина, молочной кислоты и других биологически важных соединений.

### Гравиметрические сенсоры

Чувствительным элементом гравиметрического (массочувствительного) сенсора является пьезоэлектрический датчик. В основе действия таких сенсоров лежит изменение массы чувствительного элемента в присутствии определяемого вещества (например, газа) и вызванное этим изменение резонансной частоты. Возможно также использование явления поверхностно-акустических волн.

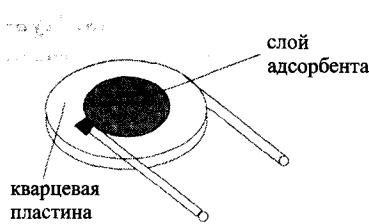


Рис. 7.27. Схема устройства пьезоэлектрического датчика для химических сенсоров.

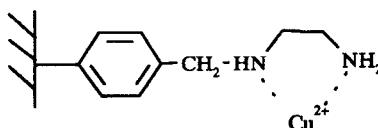
Схематически устройство кварцевого пьезоэлектрического датчика изображено на рис. 7.27. Вибрирующая кварцевая пластина покрыта слоем адсорбента, способного поглощать определяемый газ. В результате вибраций пластины с некоторой частотой вследствие пьезоэлектрического эффекта возникает переменное электрическое поле той же частоты. При адсорбции газа масса пластины изменяется. Соответственно, изменяется частота вибраций и частота переменного поля. Связь между изменением массы пластины и изменением частоты поля характеризует следующее соотношение:

$$\Delta\nu = -2,3 \cdot 10^6 \nu_0^2 \left( \frac{\Delta m}{A} \right), \quad (7.13)$$

где  $A$  — площадь поверхности пластины,  $\nu_0$  — первоначальная резонансная частота вибраций.

Обычно резонансные частоты пьезоэлектрических датчиков составляют порядка 10–15 МГц. При этом возможно надежно зареги-

стрировать изменение частоты электромагнитных колебаний вплоть до 0,01 Гц, что соответствует изменению массы порядка  $10^{-11}$  г. Таким образом, пьезоэлектрический датчик служит высокочувствительными весами. Выбор возможных адсорбентов для определения различных веществ очень широк. Например, фосфорорганические соединения можно определять при помощи комплексов меди с диаминами, химически закрепленных на поверхности полимера:



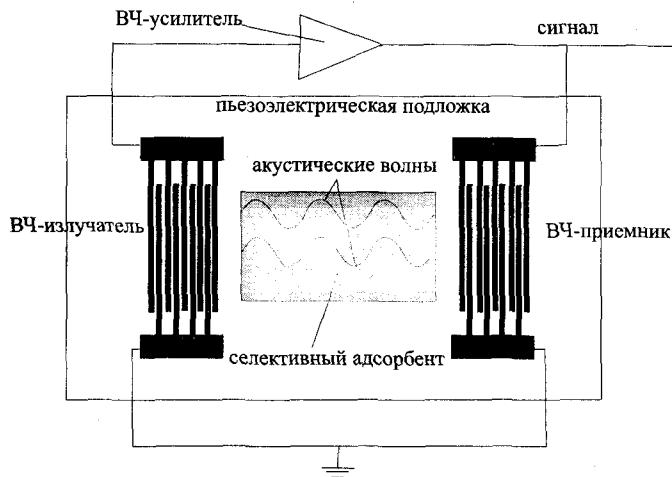
Такой сенсор является обратимым. Он позволяет детектировать дизопропилметилфосфонат при содержаниях до 20 частей на миллиард. Пьезоэлектрические сенсоры можно применять для непрерывного контроля за содержанием вредных газов или задымленностью атмосферы.

Более чувствительны гравиметрические сенсоры, основанные на явлении поверхностных акустических волн. Их резонансная частота существенно выше, чем у кварцевых пьезоэлектрических весов, и составляет около 1 ГГц. Соответственно, нижняя граница измеряемых масс меньше и находится уже в фемтограммовой ( $10^{-15}$  г) области. Схема резонатора на поверхностных акустических волнах изображена на рис. 7.28. Между двумя парами электродов — излучателем и приемником высокочастотного электромагнитного излучения — расположена кварцевая пьезоэлектрическая пластина (подложка) с нанесенным на нее слоем адсорбента. При облучении пластины импульсом электромагнитного излучения с резонансной частотой возникает обратный пьезоэлектрический эффект — механические колебания пластины, распространяющиеся в ее приповерхностном слое (поверхностные акустические, или релеевские, волны). Как и для кварцевых пьезоэлектрических весов, резонансная частота зависит от массы пластины. В результате адсорбции определяемого вещества на слое адсорбента масса пластины изменяется, что можно зарегистрировать по изменению резонансной частоты колебаний.

### Многоканальные сенсоры

Все рассмотренные типы сенсоров обладают, как правило, достаточно низкой селективностью. Взаимные *мешающие влияния* компонентов — вполне обычное явление для большинства химических сенсоров, использующих лишь один канал информации (длина волны,

потенциал, сила тока, резонансная частота). Селективность можно повысить, если осуществлять одновременную регистрацию сигналов по нескольким информационным каналам.



**Рис. 7.28.** Газовый сенсор на основе явления поверхностных акустических волн. Использование селективного адсорбента на основе комплекса  $\text{PtCl}_2$  с этиленом и пиридином позволяет определять до 5 частей паров стирола на миллион.

Простейшим способом создания *многоканальных* сенсоров является объединение отдельных сенсоров в массив. Например, можно объединить несколько различных пьезоэлектрических датчиков и использовать их как единое целое. Массив сенсоров на основе полевых транзисторов с чувствительными слоями разного состава можно включить в одну общую электрическую цепь. Об использовании массивов оптических сенсоров (в форме диодной линейки) для одновременной регистрации излучения в широком спектральном диапазоне мы уже неоднократно упоминали ранее.

Для обработки информации, поступающей от многоканальных сенсоров, применяют методы многокомпонентного анализа, описанные в разделе 6.3.

До сих пор основным направлением развития сенсорной техники явилось создание сенсоров, чувствительных к индивидуальным химическим соединениям. При этом, как правило, старались просто реализовать в сенсорном варианте имеющиеся наработки в области традиционных лабораторных методов анализа. При таком подходе, например, для оценки качества вина определяют содержание множества его отдельных компонентов, а затем из полученных данных

выводят суммарный результирующий показатель. Однако, вероятно, было бы более целесообразно поступить по-другому: попытаться создать некий «вкусовой сенсор», действующий подобно системе восприятия вкуса у человека и оценивающий суммарное качество вина непосредственно. Аналогичные проблемы возникают и при анализе объектов окружающей среды, когда требуется, например, оценить суммарную степень загрязненности вод тяжелыми металлами или органическими веществами. Создание интегральных сенсоров такого рода сейчас еще только начинается. Для их массового использования необходимо будет создать соответствующую нормативную базу, что также представляет собой далеко не простую задачу.

### 7.3. Автоматизированный контроль производственных процессов

Аналитический контроль производственных процессов предполагает постоянное слежение за изменением различных физических и химических параметров с течением времени — в потоке жидкости, газа или сыпучего материала, в ходе химической реакции. Необходим бывает и непосредственный анализ твердых образцов, например, для контроля качества отливок в металлургии. Как правило, химические компоненты объектов производственного анализа бывают известны заранее. Поэтому основное содержание производственного анализа составляет *количественный анализ*. Задачи качественного анализа довольно ограничены и сводятся главным образом к установлению самого факта появления в анализируемом объекте какого-либо нового, неизвестного вещества.

В данной книге мы уже рассмотрели все основные методы химического анализа. Поэтому у читателя может возникнуть вопрос: зачем же отдельно обсуждать использование этих методов применительно к производству? Однако дело в том, что условия промышленного производства предъявляют к методам анализа целый ряд новых, дополнительных требований. Важнейшие из них состоят в следующем.

- Методы производственного анализа должны быть достаточно *экспрессными*, т.е. выполняться за короткое время.
- Для выполнения анализа следует использовать значительно более *простые* по сравнению с аналитической лабораторией методики, а также *простое и компактное* оборудование.

- Показатели *точности* результатов должны быть весьма высокими — особенно в тех случаях, когда речь идет об определении достаточно дорогих продуктов (в металлургии, полимерной промышленности, тонком органическом синтезе).
- Используемая аппаратура должна обладать повышенной *устойчивостью в эксплуатации* по отношению к воздействию таких типичных производственных факторов, как вибрация, запыленность, электрические и магнитные поля.
- Выполнение методик анализа должно быть осуществимо непосредственно силами *производственного персонала*, который, как правило, в области аналитической химии обладает *меньшей квалификацией*, чем специалисты.
- Особые требования предъявляются к *пробоотбору и пробоподготовке*. Чаще всего лабораторные приемы, применяемые для этих целей, перенести в производственные условия оказывается невозможно. Объекты анализа могут иметь весьма высокую температуру, находиться под высоким давлением, представлять собой пересыщенные растворы, суспензии с обилием зернистых или волокнистых частиц, химически агрессивные среды или радиоактивные материалы.

Этот перечень можно продолжать и далее. В производственном анализе применяют весь методический арсенал аналитической химии, начиная от методик, выполняемых непосредственно на месте производства, и кончая теми, которые выполняются в специализированных лабораториях.

### Способы осуществления производственного анализа

Существует множество способов организации и выполнения производственных анализов. Среди них способы, которые условно можно назвать «в лаборатории», «на месте», «на линии», «в потоке», а также «бесконтактный».

Способ анализа «в лаборатории» с организационной точки зрения ничем принципиально не отличается от уже известной нам процедуры выполнения лабораторных анализов. Пробу отбирают из производственного потока, и отсылают в централизованную лабораторию, где ее и анализируют любыми доступными методами. Такой

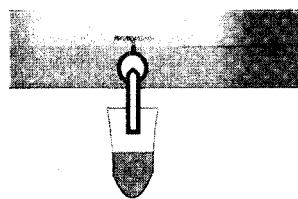
способ обычно применяют тогда, когда необходимы методы, требующие сложного дорогостоящего оборудования — хромато-масс-спектрометрия, атомно-эмиссионная спектроскопия с ИСП. В этом случае способ анализа «в лаборатории» выгоден экономически, поскольку дорогостоящее оборудование постоянно загружено. Высокая квалификация специалистов, производящих анализ, методическая корректность выполняемых операций и использование оборудования, проверенного метрологическими службами, гарантируют достоверность получаемых результатов. Недостатком же такого способа является значительная длительность анализа. Выполнение анализа можно ускорить, если для транспортировки проб использовать пневматическую почту, однако это сопряжено с дополнительными затратами. Анализы в лабораторных условиях, как правило, производят лишь при запуске нового производства, отработке технологического регламента и в ходе производственных исследований.

Способ анализа «на месте» существенно приближен к условиям производства.

В этом случае также отбирают пробу исследуемого материала, однако анализ выполняют уже непосредственно в производственном помещении при помощи достаточно простого оборудования, например, фотометров. Достоинствами такой организации являются сокращение времени анализа, увеличение возможностей для контроля за ходом производственного процесса и использование более простой и дешевой аппаратуры. Однако на практике реализовать такой способ анализа не всегда возможно.

Способ «на линии» предполагает уже непосредственный анализ технологического продукта. Отбор, подготовка и транспортировка пробы к измерительному прибору осуществляются автоматически. Набор параметров, измеряемых способом «на линии», не ограничивается лишь химической (качественной и количественной) информацией, но может включать и разнообразные физические величины, а также суммарные, обобщенные характеристики, например, октановое число для бензина. Анализ «на линии» можно выполнять как дискретно, так и непрерывно.

**Дискретный анализ «на линии».** Некоторую часть вещества автоматически отбирают из технологического потока через определенные промежутки времени и вводят в измерительный прибор, на-



«в лаборатории»/«на месте»

пример, посредством инъекции. Среди используемых методов анализа преобладает газовая хроматография и проточно-инжекционный анализ. Специфические требования, предъявляемые к газовой

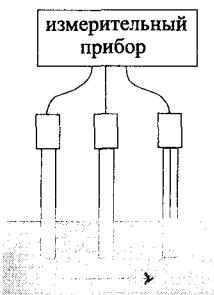
хроматографии на производстве, мы обсудим ниже. Проточно-инжекционный анализ легко поддается автоматизации при помощи различных средств, рассмотренных в разделе 7.1. В проточно-инжекционном варианте можно реализовать множество традиционных методик анализа растворов химическими и физико-химическими методами. Время выполнения анализа достаточно мало, а производительность высока. Точностные показатели результатов анализа, как правило, вполне достаточны для требований производства. Если методика проточно-инжекционного анализа требует дополнительных операций — экстракции, хроматографического разделения, диализа — то их также можно осуществить в автоматическом режиме в потоке. Дискретный анализ «на линии» в принципе позволяет полностью автоматизировать аналитический процесс и исключить вмешательство оператора.

**Непрерывный анализ «на линии».** В этом случае некоторая часть вещества из производственного потока протекает через измерительную ячейку непрерывно. Из методов анализа чаще всего применяют спектроскопические. Первоначально применяли бездисперсионный вариант ИК-спектроскопии с использованием двух измерительных ячеек и микрофонного детектора (см. ниже). Прогресс в аналитическом приборостроении позволил вскоре применять и ИК-спектрометры с фурье-преобразованием, а также технику ИК-спектроскопии с нарушенным полным внутренним отражением (раздел 3.3.1). Для измерений в УФ-видимой области применяют автоматические спектрометры, регистрирующие спектры без использования механических операций — на основе диодных линеек и других многоканальных детекторов.

Оба способа осуществления анализа «на линии» имеют один и тот же недостаток: анализу подвергается лишь некоторая отдельная часть технологического потока. Однако возможен ана-



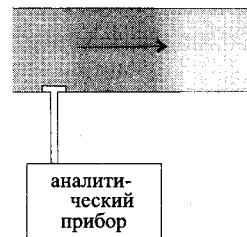
«на линии»



«в потоке»

лиз и непосредственно «в потоке». Для этого в производственный поток вводят специальные зонды, например, изготовленные на основе химических сенсоров, и непрерывно или периодически регистрируют их показания. Осуществлению анализа «в потоке» способствует большое разнообразие типов химических сенсоров и широкий круг решаемых с их помощью задач (раздел 7.2). К сожалению, многие из разработанных на настоящий момент химических сенсоров не удовлетворяют всем требованиям производственного анализа. Поэтому часто приходится ограничиваться измерением лишь некоторых, наиболее простых, но вместе с тем часто и наиболее важных, параметров (например, на биотехнологических производствах — определением pH, содержания биомассы и растворенного кислорода). Серьезную проблему представляет собой «старение» сенсоров, ухудшение их характеристик с течением времени. Однако развитие аналитического приборостроения идет быстрыми темпами, и нет сомнения, что в будущем станет доступно множество различных сенсоров на базе новейших достижений микроэлектроники и микромеханики, позволяющих не только всесторонне контролировать технологические процессы, но и управлять ими.

«Бесконтактный» способ осуществления производственного анализа предполагает отсутствие непосредственного физического соприкосновения зонда или сенсора с анализируемым объектом. Как и в случае анализа «в потоке», здесь не требуется пробоотбор. Однако в этом случае к тому же отпадает и проблема загрязнения сенсора, отравления его компонентами технологического потока. Примерами «бесконтактного» анализа могут служить измерения в ближней ИК-области, измерения интенсивности испускания ИК-излучения через окошко в производственном резервуаре, анализ методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии, а также ультразвуковые исследования для получения информации нехимического характера. Этот неразрушающий способ анализа часто осуществляется дистанционно.



«бесконтактный анализ»

### Анализ на основе неселективных характеристик

Многие задачи производства могут быть решены даже с помощью весьма простых принципов измерения. Например, для контроля состава бинарных (двухкомпонентных) систем, в частности, опреде-

ления содержания воды в органических жидкостях, вполне достаточно измерения простых физических параметров: плотности, вязкости, электропроводности, электрической емкости или каких-либо оптических характеристик.

### Определение воды посредством измерения емкости

Диэлектрическая проницаемость воды, равная 80, сильно отличается от величин диэлектрической проницаемости большинства органических веществ (как правило, в пределах 1–10). Это открывает возможность определения содержания воды в органических средах путем простого измерения электрической емкости. Таким методом можно, например, измерять влажность бумаги — один из очень важных показателей ее качества — с высокой скоростью и без разрушения образца.

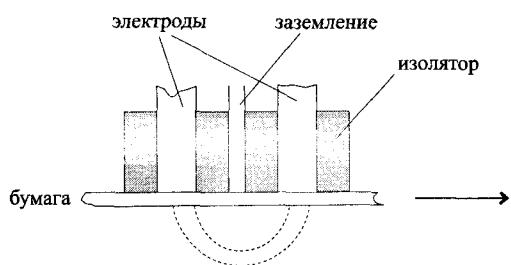


Рис. 7.29. Определение влажности бумаги путем измерения емкости конденсатора.

Соответствующее измерительное устройство схематически изображено на рис. 7.29. Бумажная лента движется со скоростью около 1000 м в минуту, соприкасаясь с двумя электродами, разделенными слоем изолятора. Электроды образуют конденсатор, емкость которого зависит от диэлектрической проницаемости

мости бумаги. Последняя, в свою очередь, определяется содержанием влаги в бумаге. Путем измерения емкости конденсатора можно непрерывно контролировать влажность бумаги. При расчетах обычно используют величину диэлектрической проницаемости сухой бумаги, равную 3.

### Определение ионных веществ в жидкостях путем измерения электропроводности

Для определения загрязнений ионного характера в жидкостях применяют метод измерения электропроводности. Таким методом оценивают, в частности, качество воды, предназначенный для бойлерных установок, систем охлаждения, производства бумаги. Основы метода измерения электропроводности (кондуктометрии) нам уже известны из раздела 4.2. В промышленности для измерения элек-

тропроводности используют погружные или проточные кондуктометрические ячейки, которые, как и в лаборатории, калибруют по растворам хлорида калия с известной электропроводностью. Точное измерение электропроводности возможно лишь в том случае, если сопротивление, вызванное поляризацией электродов, пренебрежимо мало. Для предотвращения поляризации электродов электропроводность обычно измеряют, используя переменное напряжение. Частоту подбирают так, чтобы достичь компромисса между поляризационным сопротивлением (убывает с увеличением частоты) и гидродинамическим сопротивлением (убывает с уменьшением частоты). Чаще всего используют обычную сетевую частоту 50 Гц.

При исследовании агрессивных сред, например, в ходе контроля сернокислотного производства, необходимо избежать прямого контакта электродов с раствором. В этих случаях поток жидкости пропускают через электрически изолированную трубку, встроенную в трансформаторную систему. Такое устройство позволяет измерить электропроводность без ущерба для измерительной ячейки.

### Групповой анализ методами спектроскопии в УФ- и ближней ИК-области

В ходе контроля производственных процессов далеко не всегда необходимо — если вообще возможно — постоянно определять все отдельные компоненты, содержащиеся в технологическом потоке. Часто вполне достаточно определять суммарное содержание целых групп близких по природе веществ (например, в нефтеперерабатывающей промышленности — содержания моно-, ди-, три- и полициклических ароматических соединений) или обобщающие параметры такие, как октановое число бензина. Вид химического анализа, предназначенный для решения подобных задач, называется *групповым*.

Для суммарного определения групп органических соединений, например, ароматических соединений, диолефинов или кетонов, в промышленности часто применяют УФ-спектроскопию непосредственно в производственном потоке. Все возрастающую роль начинает играть и ИК-спектроскопия в ближней области, в частности, для определения ароматических и непредельных соединений, а также октанового числа бензина.

Традиционный способ измерения октанового числа при помощи автомобильного двигателя требует расхода около половины литра бензина. Этот метод достаточно дорогостоящий, так как сопряжен с большим расходом бензина и износом двигателя, выхлопные газы загрязняют окружающую среду, а работающий двига-

тель производит шум. Кроме того, для достижения нужной точности определения, зависящей от требований заказчика, необходимо еще выполнить градуировку, используя большее или меньшее число стандартных образцов бензина. Прямое спектроскопическое определение экологически безопасно, не требует расхода бензина и может быть выполнено в режиме «на линии». На рис. 7.30 приведены ИК-спектры в ближней области трех сортов бензина. Наблюдаемые полосы обусловлены комбинационными колебаниями и обертонами основных частот. Несмотря на то, что визуально спектры различаются достаточно мало, воспроизводимость результатов достаточна для определения октанового числа с погрешностью не большей, чем для стандартного метода. Для реализации спектроскопического метода необходимо наличие соответствующего спектрофотометра и программного обеспечения для анализа многокомпонентных смесей (раздел 6.3). Определение можно выполнять и «бесконтактным» способом в производственном потоке с применением световодов.

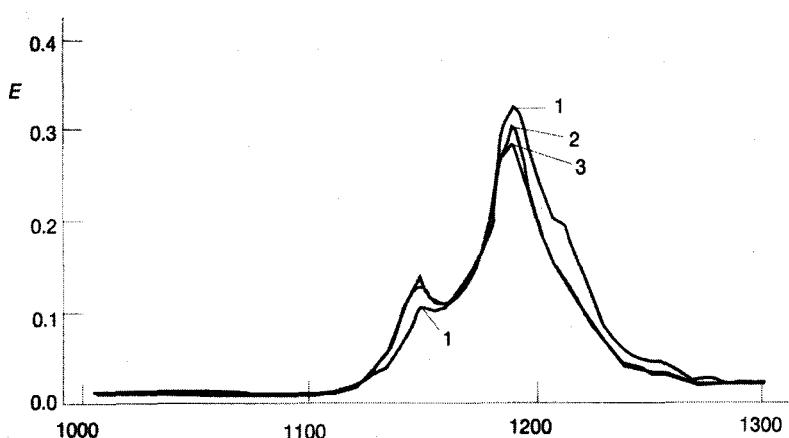


Рис. 7.30. ИК-спектры в ближней области для сортов бензина с октановыми числами 95,5 (1), 97,5 (2) и 96,7 (3)

Для производственного спектроскопического анализа далеко не всегда требуются спектрофотометры, позволяющие работать во всем спектральном диапазоне (УФ, видимом или ближнем ИК). Часто достаточно измерений всего лишь при одной или двух длинах волн, что можно обеспечить применением простых фотометров со светофильтрами. Измерения при двух длинах волн позволяют компенсировать колебания рабочих параметров измерительного прибора, а также контролировать чистоту продукта по величине отношения оптических плотностей. При помощи двухволновых измерений мож-

но легко определять примеси ароматических углеводородов в нефтепродуктах, а также фенолы и некоторые неорганические ионы в водных растворах.

### Производственная рефрактометрия

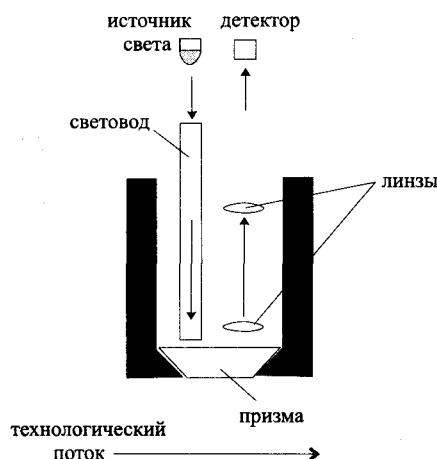


Рис. 7.31. Устройство промышленного зонда-рефрактометра.

Измерение показателя преломления служит одним из универсальных методов детектирования в жидкостной хроматографии (раздел 5.3). Этот измерительный принцип можно легко перенести в условия производства. В промышленности часто используют дифференциальные рефрактометры Эббингхауса, включающие две полые призмы. Через одну из них непрерывно протекает производственный раствор, вторая заполнена раствором сравнения. При таком способе измерения возникают помехи в случае анализа мутных, окрашенных, а

также содержащих пузырьки газа или взвешенные частицы растворов. Эти трудности можно частично преодолеть, если для анализа непрозрачных растворов вместо видимого света использовать излучение в ближней ИК-области.

В последнее время разработана более устойчивая к помехам конструкция рефрактометра (рис. 7.31). В ней используют призму, для которой угол между торцевой и боковой плоскостями равен критическому. Такой рефрактометр можно выполнить в виде зонда-датчика и непосредственно вводить его в технологический раствор.

Промышленные рефрактометры часто используют на химических и фармацевтических производствах. Они позволяют регистрировать изменения показателя преломления до  $10^{-4}$  единиц и очень удобны для контроля процессов ректификации и множества других, включая определение содержания экстракта в пивном сусле.

### Инфракрасные анализаторы

Простейшие бездисперсионные ИК-анализаторы применяются главным образом для анализа газов. Как следует из названия, здесь ис-

пользуют полихроматический поток излучения. Приемниками излучения служат главным образом пневматические детекторы. Принципиальная схема ИК-анализатора этого типа приведена на рис. 7.32.

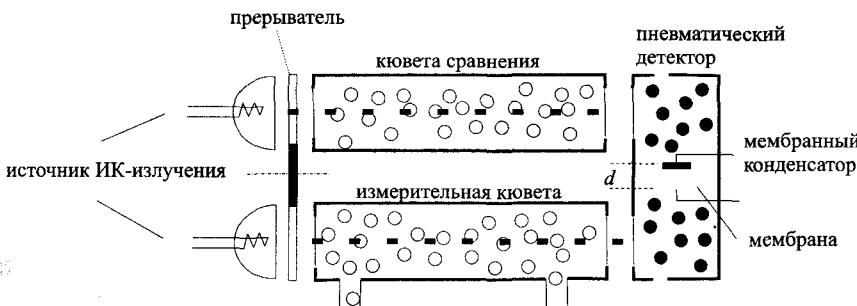


Рис. 7.32. Устройство бездисперсионного инфракрасного газоанализатора.

Две идентичные газовые кюветы — измерительную и кювету сравнения — облучают пульсирующими потоками ИК-излучения равной интенсивности. Пульсацию потоков осуществляют при помощи механического прерывателя с врачающимися лопастями. Кювету сравнения заполняют газом, не поглощающим в ИК-области, — обычно азотом. Пневматический детектор состоит из двух камер, разделенных мембраной. Мембрана одновременно является одним из электродов конденсатора. Камеры заполняют чистым определяемым газом, например, СО. Пульсирующее излучение поглощается газом, находящимся в камерах. Это приводит к увеличению температуры и, соответственно, периодическим колебаниям мембраны. Если интенсивности световых потоков, падающих на обе камеры, не одинаковы, мембрана смещается относительно нейтрального положения. Это приводит к изменению емкости конденсатора, пропорциональному величине поглощения.

Поскольку используется полихроматическое ИК-излучение, возможны помехи со стороны других газов, поглощающих в ИК-области. Однако, если природа мешающего компонента известна, помехи удается устраниить. Для этого на пути каждого светового потока между кюветой и детектором ставят по одной дополнительной кювете, заполненной мешающим компонентом. Они играют роль светофильтров, отсекая излучение тех длин волн, при которых поглощает мешающий компонент. Если этот способ не помогает, необходима хотя бы частичная монохроматизация исходного излучения.

Примеры применения бездисперсионных ИК-анализаторов приведены в табл. 7.11. В зависимости от диапазона определяемых кон-

центраций длина оптического пути газовых кювет может составлять от 0,75 до 20 м.

Таблица 7.11. Применение бездисперсионных ИК-анализаторов для определения газов.

Определяемый газ	Длина волны максимума поглощения, мкм	Определяемые концентрации (%)	Объект анализа, область применения
CO	4,65	$1,2 \cdot 10^{-4}$ — 8,3	топочные, выхлопные газы
CO <sub>2</sub>	4,25	$8 \cdot 10^{-6}$ — 0,75	испытания средств пожаротушения
SO <sub>2</sub>	7,4	$1 \cdot 10^{-5}$ — 0,3	атмосферный воздух (экологический мониторинг)
NH <sub>3</sub>	10,75	$2,2 \cdot 10^{-4}$ — 2,1	то же

Дисперсионные ИК-анализаторы необходимо применять в тех случаях, когда селективность бездисперсионных анализаторов (в том числе с применением светофильтров) оказывается недостаточной, при анализе жидких сред, а также при измерениях в области менее  $1000 \text{ см}^{-1}$ . Обычно измерения с использованием дисперсионных ИК-анализаторов проводят при двух длинах волн, используя одну длину волны непосредственно для измерения, а вторую — для компенсации погрешностей вследствие колебаний параметров прибора.

В последнее время все более широкое применение в производственном анализе находят ИК-спектрометры с фурье-преобразованием. Они позволяют непрерывно анализировать в реальном времени газы, жидкости и твердые тела. С их помощью можно не только определять состав и содержание вещества, но и контролировать степень полимеризации, толщину пленок и покрытий, обнаруживать примеси.

Для производственного контроля состава твердых тел все шире используют ИК-спектроскопию в ближней области. Как правило, измерения производят в отраженном свете (рис. 3.86). При помощи ИК-спектроскопии в ближней области можно определять не только обобщенные параметры такие, как октановое число (см. выше), но и отдельные компоненты. Этим методом можно определять влажность и содержание белка в зерне, оценивать параметры качества полупродуктов в фармацевтической или молочного порошка — в пищевой промышленности.

## Кислородные анализаторы

Определение содержания кислорода имеет большое значение для контроля процессов горения, состава отходящих газов, в металлургии. Важно также уметь определять содержание растворенного кислорода в различных жидкостях. В промышленности кислород определяют как физическими (измерение магнитной восприимчивости, теплопроводности), так и химическими методами — при помощи потенциометрии, амперометрии и калориметрии (с использованием процессов каталитического окисления).

Ряд уже упоминавшихся методов определения кислорода применяют и на производстве. К ним относятся методы с использованием твердых электролитов (кондуктометрические и потенциометрические) и амперометрическое определение кислорода в растворах при помощи датчика Кларка. Специфика кислородных датчиков, применяемых в промышленности, касается главным образом лишь конструктивных особенностей, которые изменяются от производителя к производителю.

## Производственная хроматография

Процессы *производственной хроматографии* отличаются от лабораторных с точки зрения одной важной детали: анализируемую пробу необходимо отобрать непосредственно из производственного потока — как правило, при высокой температуре. Для отбора проб используют высокоточные дозирующие вентили. Ввод пробы непосредственно в хроматограф осуществляют, как обычно, при помощи шприца через прокладку (рис. 5.2). При анализе жидкостей часто бывает необходим предварительный сброс паров. Хроматографическая аппаратура, используемая на производстве, должна быть простой и надежной в эксплуатации. Обычно применяют лишь достаточно ограниченный круг неподвижных фаз. Сложные варианты хроматографических разделений — градиентные, с использованием дериватизации — как правило, не применяют. Время хроматографического разделения должно быть как можно меньше. Очень часто ограничиваются неполным разделением пиков на колонке, предпочтая разделять их при помощи математических методов. Часто анализ одной и той же пробы проводят параллельно на нескольких колонках с неподвижными фазами разной селективности.

Для увеличения селективности используют и отделение мешающих компонентов при помощи предколонки, играющей роль фильтра. Схема промышленного хроматографа с предколонкой изобра-

жена на рис. 7.33. Поскольку задача предколонки состоит в как можно более полном отделении компонентов матрицы, ее необходимо периодически регенерировать. Для этого время от времени через предколонку пускают поток газа-носителя в обратном направлении для десорбции накопившихся веществ.

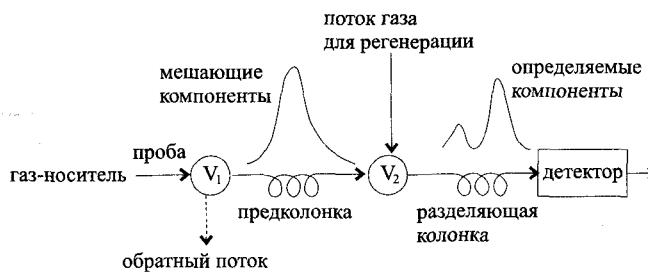


Рис. 7.33. Схема промышленного хроматографа с предколонкой.

В производственную практику постепенно начинает внедряться и высокоэффективная жидкостная хроматография. Хотя в случае ВЭЖХ при переходе от лабораторных к производственным условиям возникает гораздо больше проблем, чем в случае газовой хроматографии, во многих сферах, например, в пищевой или фармацевтической промышленности, метод ВЭЖХ оказывается поистине незаменим. В сочетании с методом ультрафильтрации для удаления высокомолекулярных компонентов ВЭЖХ находит все возрастающее применение и в области биотехнологии.

## 7.4. Литература

- H.Bartels, Techniken der Automatisierung chemischer Analysenverfahren, in *Analytiker-Taschenbuch*, Bd. 2, S. 47/63, Akademie-Verlag, Berlin, 1981.
- J.Ruzicka, E.H.Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2 ed., Wiley, New York, 1988.
- K.Doerffel, H.Müller, M.Uhlmann, *Prozeßanalytik*, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1986.
- R.Nießner, *Chemische Sensoren: Prinzipien und Anwendungen*, in *Analytiker-Taschenbuch*, Bd.7, S.55, Akademie-Verlag, Berlin, 1987.

# ГЛАВА 8

## СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

### 8.1. Анализ объектов окружающей среды

Окружающая среда включает в себя гидросферу, атмосферу, литосферу и биосферу. Соответственно, для исследования и контроля состояния окружающей среды необходимы методы анализа воды, воздуха, почв и живых организмов. Разумеется, в ходе анализа таких объектов постоянно приходится определять содержание множества индивидуальных химических компонентов. К числу повседневных задач химии окружающей среды относятся определение pH, содержания фосфатов, сульфатов, нитратов, ионов аммония, щелочных и тяжелых металлов в водах и почвах, определение газов в атмосфере —  $\text{SO}_2$ ,  $\text{CO}$ , оксидов азота, озона, галогенов, определение множества органических компонентов — полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), диоксинов и других.

Решение подобного рода задач мы постоянно рассматривали в нашей книге и ранее. Однако в аналитической химии окружающей среды существует и ряд своих специфических проблем. Перечислим некоторые из них.

- Разработка экспрессных тест-методов определения загрязнителей *in situ*. Одним из средств решения этой задачи служат индикаторные трубки.
- Определение обобщенных показателей состояния окружающей среды таких, как химическое потребление кислорода (ХПК), содержание общего органического углерода (ООУ), суммы фенолов (фенольный индекс) или поверхностно-активных веществ в водах, характеристики кислотности почв.
- Оценка значений групповых параметров, характеризующих загрязнители с точки зрения как их состава, так и поведения



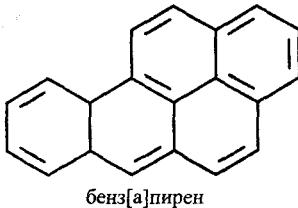
в окружающей среде, например, содержания адсорбируемых органических галогенов (АОХ).

- Специфические проблемы, связанные с *пробоотбором*, определением *следовых содержаний* и разработкой *стандартизованных процедур* анализа.
- Изучение пространственного и фазового распределения элементов и соединений, их накопления в отдельных частях и органах (*комpartmentах*) растительных и животных организмов.
- Изучение распределения элементов по отдельным *химическим формам*, которые могут обладать разной токсичностью, например, Cr(III) и Cr(VI), свободные и связанные в комплексы ионы Cu(II) в морской воде (последние поглощаются организмами рыб в значительно меньшей степени).
- Исследование *мелкодисперсных объектов*, например, частиц пыли или дыма в атмосфере.
- *Дистанционный анализ*, например, для определения содержания озона в верхних слоях атмосферы.

## Определение индивидуальных веществ

В качестве примера важной задачи аналитической химии окружающей среды, связанной с определением индивидуальных химических компонентов, рассмотрим определение отдельных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Существует свыше ста различных полициклических ароматических структур, многие из которых найдены в окружающей среде. В настоящее время американским Агентством по охране окружающей среды (EPA) установлены нормативы на 16 различных ПАУ (табл. 8.1). Основным из них считается бенз[а]пирен. Именно его содержание используют для оценки степени загрязнения ПАУ из различных источников — от пожаров до табачного дыма (табл. 8.2).

Идентификация и определение отдельных ПАУ представляет немалые трудности ввиду наличия в водах, почве и воздухе множества сопутствующих веществ. Как правило, в ходе анализа объек-



тов окружающей среды компоненты пробы сначала разделяют на отдельные фракции, а затем уже нужную фракцию (которая по-прежнему представляет собой весьма сложную смесь) анализируют с помощью высокоэффективной хроматографии.

**Таблица 8.1.** ПАУ, содержание которых нормируется Агентством по охране окружающей среды (США).

1. Нафталин	9. Бенз[а]антрацен
2. Аценафтилен	10. Хризен
3. Аценафтен	11. Бенз[б]флуорантен
4. Флуорен	12. Бенз[к]флуорантен
5. Фенантрен	13. Бенз[а]пирен
6. Антрацен	14. Инденол[1,2,3-с,д]пирен
7. Флуорантен	15. Дибенз[а,х]антрацен
8. Пирен	19. Бенз[г,х,и]перилен

**Таблица 8.2.** Источники выбросов полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в окружающую среду.

Источник	Суммарные выбросы за 1981 г. (т)
Пожары	2,6
Электроэнергетика:	
– сжигание нефтепродуктов	0,02
– сжигание угля	0,001
Производство кокса	5,6
Транспорт:	
– бензиновые, газовые двигатели	2,2
– дизельные двигатели	0,14
Табачный дым	0,015

Рассмотрим схему определения ПАУ в конденсате выхлопных газов дизельных двигателей (рис. 8.1). Она включает в себя несколько процедур экстракционного и хроматографического разделения и завершается хроматографическим определением. Частицы, выходящие с выхлопными газами, собирают на фильтре из стекловолокна и экстрагируют толуолом. Затем толуольный экстракт разделяют на водорастворимую и жирорастворимую (гидрофобную) фракции. Раствор гидрофобной фракции в циклогексане разделяют хроматографическим методом на колонке с гелем Сефадекс LH-20 еще на три фракции — неполярную, не содержащую ПАУ, неполярную,

содержащую ПАУ, и полярную. Фракцию, содержащую ПАУ, разделяют далее на колонке с силикагелем еще на две. Одна из них содержит углеводороды с 4–7 кольцами, другая — нитросоединения.

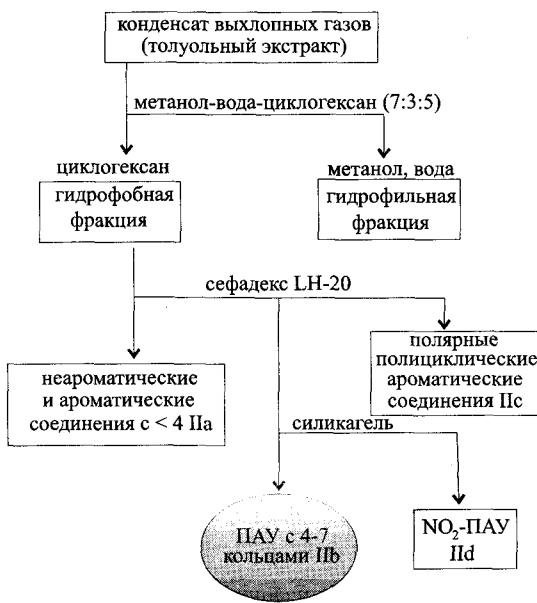


Рис. 8.1. Схема выделения канцерогенной фракции ПАУ (Пб).

дел 5.5), контролируя ионный ток соответствующего характеристического пика.

### Экспресс-тесты и измерение долговременных экспозиций

Лабораторный анализ объектов окружающей среды — задача для высококвалифицированных специалистов. В то же время часто бывает необходимо быстро зарегистрировать аварийный выброс загрязнителя или оценить качество воды непосредственно на месте, причем силами работников, не обладающих высокой квалификацией в области аналитической химии.

Такие задачи решаются при помощи специальных, полностью оборудованных комплектов для выполнения полевых химических анализов, включающих, в частности, дозиметры и индикаторные трубы.

Разнообразные комплекты для выполнения *полевых анализов* выпускаются фирмой Merck. Большинство из них основано на обычных принципах химических методов анализа, реализуемых, как правило, в «безреактивном» варианте (раздел 7.1). Примерами могут служить

Наконец, углеводородную фракцию ПАУ, называемую также канцерогенной (фракция Пб, рис. 8.1), анализируют методом капиллярной газовой хроматографии. Полученная хроматограмма (рис. 8.2) весьма сложна, идентификация компонентов представляет собой непростую задачу. Очень удобным методом идентификации является масс-спектрометрия. Для селективного детектирования интересующего компонента можно использовать способ селективного мониторинга ионов (раз-

индикаторные (тестовые) бумаги для определения pH. В настоящее время такие бумаги, пропитанные растворами соответствующих реагентов, выпускают и для определения различных ионов — аммония, металлов (Al, Pb, Cd, Cr, Fe, Ni, Cu, Mn). Существуют индикаторные бумаги для определения суммы кальция и магния (жесткости воды), анионов (фторидов, хлоридов, цианидов, нитратов, фосфатов, силикатов, сульфатов), химического потребления кислорода, а также для проведения микробиологических тестов с использованием сухих питательных сред. Оценка интенсивности окраски индикаторных бумаг осуществляется визуально путем сравнения с прилагаемой колориметрической шкалой или при помощи миниатюрных фотометров в отраженном свете. В полевые комплекты входят и все дополнительные реактивы, если требуется их использование.

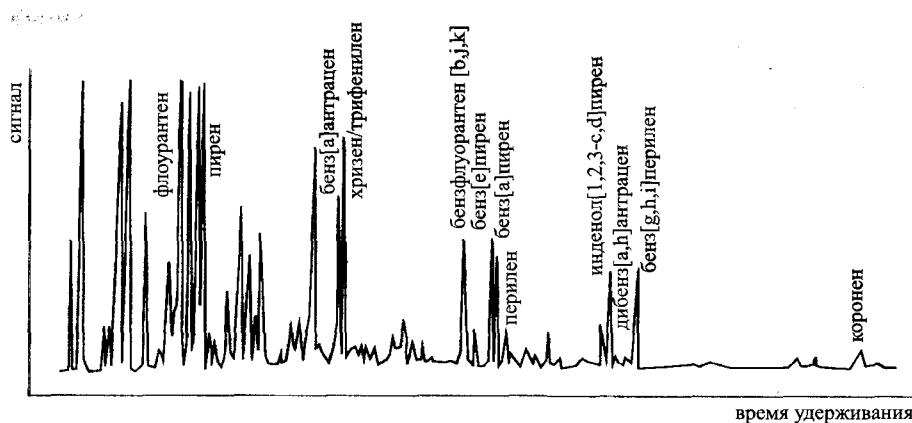


Рис. 8.2. Капиллярная газовая хроматограмма канцерогенной фракции ПАУ выхлопных газов дизельного двигателя.

В качестве полевых анализаторов воздуха применяют индикаторные трубы Дрегера. Их обычно заполняют порошком силикагеля, на котором адсорбирован соответствующий реагент. Трубы хранят в запаянном виде, их вскрывают лишь непосредственно перед анализом. С помощью ручного насоса через трубку прокачивают определенный объем воздуха. При этом в результате реакции с определяемым веществом слой силикагеля окрашивается. Чем больше концентрация вещества, тем больше длина окрашенной зоны. Значение концентрации оценивают при помощи прилагаемой измерительной шкалы.

Существуют индикаторные трубы для определения неорганических газов — HCN, CO, NH<sub>3</sub>, оксидов азота, паров сильных кислот (HCl, HNO<sub>3</sub>). В качестве примера определения паров органических

веществ назовем комплект для одновременного детектирования ацетона, спиртов, толуола, гексана и перхлорэтилена.

## Определение суммарных и групповых параметров

**Суммарные параметры** используют как обобщенные показатели загрязненности окружающей среды, например, воды органическими веществами или воздуха взвешенными частицами.

Рассмотрим систему таких показателей на примере оценки загрязненности вод органическими веществами. Эти показатели можно свести к двум основным группам — характеристики содержания углерода в различных формах и характеристики окисляемости. Содержание углерода характеризуют в виде содержания общего неорганического углерода (ОНУ) и общего органического углерода (ООУ). В свою очередь, общий органический углерод подразделяют на растворенный органический углерод (РОУ) и взвешенный органический углерод (ВОУ).

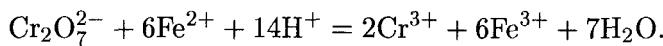
Для определения содержания органического углерода пробу воды фильтруют и определяют органический углерод раздельно в фильтрате и осадке. Предварительно весь неорганический углерод, который может находиться в форме растворенного  $\text{CO}_2$  или карбонатов, удаляют кипячением с фосфорной кислотой и при необходимости также определяют. Для суспензий или твердых проб может потребоваться дополнительное высокотемпературное воздействие.

В основе определения органического углерода лежит термическое или химическое окисление органического вещества пробы до  $\text{CO}_2$ , который затем определяют непосредственно или после восстановления до метана. Существует много способов полного окисления органических веществ до  $\text{CO}_2$ . Один из наиболее распространенных, применяемый как для твердых, так и для жидких проб, — окисление при помощи персульфата калия с дополнительным УФ-облучением.

Определение  $\text{CO}_2$  проще всего осуществить при помощи бездисперсионного ИК-анализатора. Возможно также использование кислотно-основного титрования в неводных средах, кулонометрии,  $\text{CO}_2$ -селективных электродов или катарометрическое определение после восстановления до метана.

Окисляемость воды характеризуют величинами, называемыми химическим потреблением кислорода (ХПК) и биохимическим потреблением кислорода (БПК). Определение ХПК основано на окислении органических веществ до  $\text{CO}_2$  бихроматом калия. Для этого пробу воды кипятят с раствором  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в серной кислоте и оттитровывают непрореагировавший избыток бихромата калия стан-

дартным раствором Fe(II) с индикатором ферроином (раздел 2.5):



Величина ХПК численно равна массе кислорода (мг), эквивалентной количеству  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , пошедшего на полное окисление 1 л пробы воды. Она зависит как от содержания органических веществ в воде, так и от их природы.

Величина БПК равна массе кислорода (мг), необходимой для микробиологического окисления при  $20^\circ\text{C}$  органических веществ, содержащихся в 1 л пробы воды. При величине БПК указывают также длительность микробиологического окисления в сутках. Так, обозначение  $\text{БПК}_{20}$  означает биохимическое потребление кислорода за 20 суток. Обычно в течение этого срока разлагается около 70% органических веществ, содержащихся в водах.

Чем меньше численные значения любых из упомянутых параметров, тем выше качество воды. Для сточных вод станций биологической очистки установлены следующие нормативы:  $\text{БПК}_{20} < 50 \text{ мг/л}$ ,  $\text{ХПК} < 150 \text{ мг/л}$ ,  $\text{ООУ} < 50 \text{ мг/л}$ .

Примером **групповых параметров** оценки качества вод могут служить показатели содержания галогенпроизводных, образующихся, в частности, в процессе хлорирования питьевой воды. При этом хлорированию подвергаются и растворенные в воде органические вещества. Различают содержание адсорбируемых, экстрагируемых и летучих органических галогенов. Содержание адсорбируемой фракции определяют при помощи адсорбции на активированном угле из пробы воды, подкисленной азотной кислотой. Затем адсорбент сжигают в токе кислорода при  $1000^\circ\text{C}$ , газообразные продукты сгорания пропускают через серную кислоту, поглощают водой и определяют галогенид-ионы кулонометрическим титрованием электрогенерированными ионами  $\text{Ag}^+$  с потенциометрической индикацией при помощи серебряного электрода (раздел 4.5). Эта методика является стандартной (германский стандарт DIN 38409, часть 14).

Содержание экстрагируемой фракции определяют при помощи экстракции 1,1,2-трихлортрифторметаном. Экстрагент испаряют, остаток сжигают и определяют галогениды титриметрическим методом.

### Изучение пространственного и химического распределения веществ

Данные по *общему* (среднему) содержанию тех или иных компонентов во многих случаях не представляют для аналитической хи-



мии окружающей среды особого интереса. Для многих металлов по- движность в окружающей среде, усвоемость живыми организмами и токсические свойства очень сильно зависят от того, в какой химической форме находится элемент. Отметим, что во многих случаях химическая форма элемента более-менее однозначно определяется его физическим состоянием и средой нахождения: в растворе, в виде взвешенных, аэрозольных частиц или макроскопической твердой фазы. Часто бывает важно установить, в какой степени окисления находится элемент, в свободном (в виде аквакомплексов) или связанном состоянии, и если в связанном, то с какими лигандами и какова устойчивость этих комплексов. Также бывает важно выяснить распределение вещества по физическим формам (фазам).

Для решения всех подобных задач необходимо тщательно про- думать общую схему анализа, позволяющую как можно полнее раз- делить определяемый компонент на фракции с точки зрения как физической, так и химической формы существования. После этого анализ отдельных фракций можно выполнить на основе обычных аналитических подходов. В настоящее время также интенсивно раз- работываются специальные методы, позволяющие непосредственно определять отдельные химические формы.

Характер проблем, возникающих при изучении распределения вещества по формам и средам существования, мы рассмотрим по- подробнее на примере распределения свинца в организме человека. Важно выяснить, в каких именно органах преимущественно накап- ливается свинец. Определение свинца в биологических жидкостях (кровь, моча) или, например, в молочных зубах не вызывает прин- ципиальных проблем. В то же время определение свинца в костях — где, как предполагают, он главным образом и накапливается — со- ставляет, очевидно, далеко не простую задачу (как отобрать про- бу?). Масштабы накопления свинца в костях можно оценить косвен- но на основании примерной схемы суточного материального баланса по свинцу для среднестатистического горожанина, в которой учте- ны различные источники поступления свинца в организм (рис. 8.3).

В настоящее время в качестве предельно допустимой концентра- ции свинца в крови принята величина 25 мкг на 100 мл. Для детей эта величина должна быть меньше. Разумеется, все числа, приве- денные на рис. 8.3 — ориентировочные, оцененные из данных обыч- ных методов анализа, включающих химическое разложение проб и атомно-абсорбционное определение.

Что касается распределения свинца по химическим формам су- ществования, то здесь наблюдается большое разнообразие как неор-

ганических, так и органических форм. Например, в дождевой воде найдены как свободные ионы  $\text{Pb}^{2+}$ , так и множество алкилпроизводных. Для их раздельного определения можно использовать ВЭЖХ в сочетании с атомно-спектроскопическим детектированием.

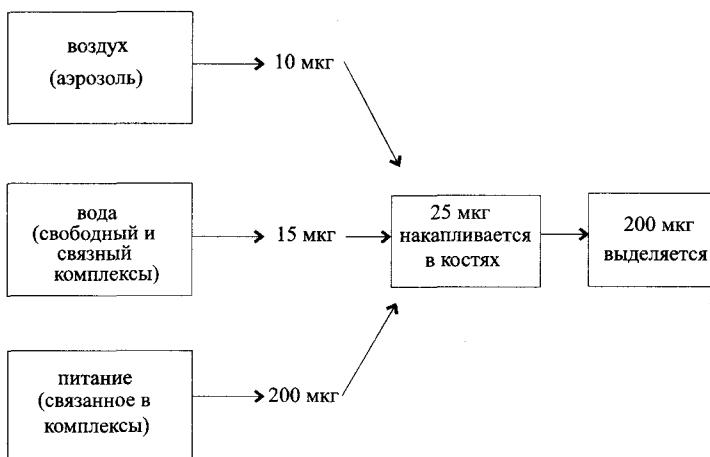


Рис. 8.3. Суточный материальный баланс по свинцу для среднестатистического горожанина.

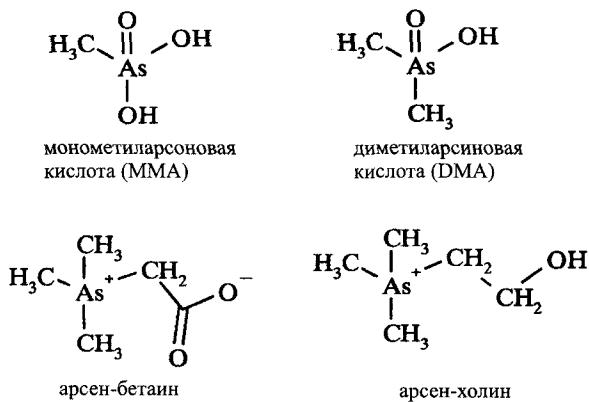


Рис. 8.4. Некоторые формы существования мышьяка в окружающей среде.

Этот же подход используют и для определения форм существования других элементов. Так, мышьяк в окружающей среде может находиться в виде неорганических ионов  $\text{As(III)}$  и  $\text{As(V)}$ , монометиларсоновой (MMA) и диметиларсиновой (DMA) кислот, арсен-бетаина и арсен-холина (рис. 8.4). На рис. 8.5 приведена хроматограмма природной смеси различных форм мышьяка. Она получена

при помощи ВЭЖХ с атомно-эмиссионным детектированием с ИСП и применением техники генерирования гидрида мышьяка (арсина).

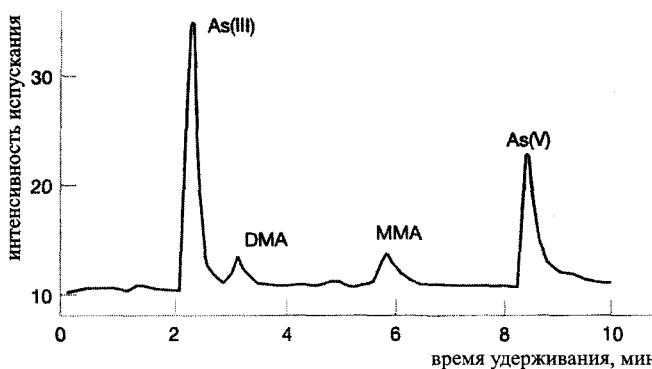


Рис. 8.5. Определение отдельных форм мышьяка в дождевой воде при помощи ВЭЖХ с АЭС-ИСП детектированием и гидридной генерацией.

Хроматографическим методом можно определить лишь те формы существования элементов, которые *устойчивы* в условиях хроматографического процесса. *Лабильные* комплексы можно определить электрохимическими методами, если они *электроактивны*.

## 8.2. Анализ материалов

### Основные положения

До сих пор мы рассматривали лишь анализ гомогенных или гомогенизованных проб. Этот способ анализа называется *валовым*. В то же время при исследовании твердых тел наряду с определением интегральных характеристик состава часто представляет интерес и решение других задач. Вот некоторые из них.

- Определение химического и структурного состава отдельных *микроскопических областей* материала.
- Определение *фазового состояния* элемента и природы его *химических связей*, например, находится ли кремний в виде нитрида (SiN) или карбида (SiC).
- Выяснение характера *распределения* элемента по поверхности или в объеме образца материала (рис. 8.6).
- Изучение *морфологии* поверхности материала, ее рельефа (рис. 8.7).

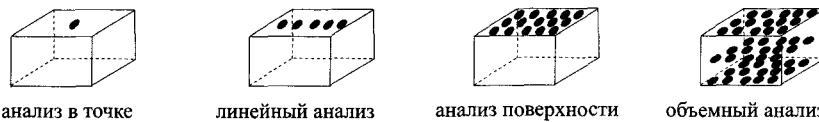


Рис. 8.6. Виды распределительного анализа твердых материалов.

Для решения этих задач, связанных с пространственным распределением элементов, необходимы специальные методы распределительного анализа — локального и анализа поверхности. Некоторые из них, а именно, методы электронной и ионной спектроскопии (масс-спектрометрия вторичных ионов, фотоэлектронная и оже-электронная спектроскопия), позволяют одновременно отвечать и на вопросы о химическом состоянии элементов.



Рис. 8.7. Особенности структуры поверхности твердых тел.

Важными характеристиками распределительных методов анализа являются геометрическое разрешение и глубина отбора аналитической информации.

Под **геометрическим разрешением** понимают отношение длины  $L$ , площади поверхности  $F$  или объема  $V$  образца к соответствующим размерам  $\Delta L$ ,  $\Delta F$ ,  $\Delta V$  элементов образца, которые могут быть раздельно проанализированы при помощи данного метода.

$$\text{Линейное (латеральное) разрешение: } A_L = \frac{L}{\Delta L}. \quad (8.1)$$

$$\text{Поверхностное разрешение: } A_F = \frac{F}{\Delta F}. \quad (8.2)$$

$$\text{Объемное разрешение: } A_V = \frac{V}{\Delta V}. \quad (8.3)$$

*Глубина отбора аналитической информации* является мерой разрешения по глубине и характеризует толщину слоя образца, формирующего аналитический сигнал. Для выполнения анализа поверхности необходимы методы, характеризующиеся высоким разрешением по глубине (малой глубиной отбора аналитической информации). Рис. 8.8 иллюстрирует два метода анализа, различающиеся глуби-

ной отбора информации. Метод, обладающий малой глубиной отбора  $z_1$ , позволяет различить два образца I и II, а методом с большей глубиной отбора  $z_2$  это сделать невозможно.

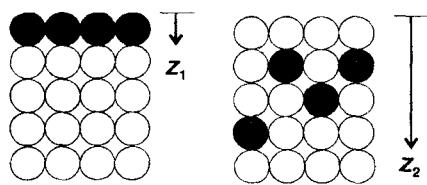


Рис. 8.8. Анализ образцов I и II двумя методами с глубинами отбора информации  $z_1$  и  $z_2$ .

спектрометрия вторичных ионов. Для этого метода величина объемного разрешения при объеме образца  $V = 0,1 \text{ см}^3$  составляет порядка  $10^{11} — 10^{13}$ .

В табл. 8.3 приведены величины поверхностного разрешения, глубины отбора аналитической информации, а также пределы обнаружения для различных методов распределительного элементного анализа. Анализ поверхности в строгом смысле слова, т.е. нескольких атомных монослоев, возможен лишь с помощью отдельных методов таких, как масс-

Таблица 8.3. Характеристики методов распределительного элементного анализа.

Метод	Латеральное разрешение $A_L$	Глубина отбора аналитической информации монослоев	Предел обнаружения, г
Масс-спектрометрия твердых тел	$10^4 — 10^6$	10	$10^{-12}$
Лазерный микроанализ	$10^4 — 10^6$	10	$10^{-12}$
Электронно-эзондовый микроанализ	$10^6 — 10^8$	1	$10^{-16}$
Масс-спектрометрия вторичных ионов	$10^6 — 10^8$	1 — 5	0,0005
Оже-электронная спектроскопия	$10^6 — 10^8$	10	0,005

Высокое пространственное разрешение указанных методов основано на использовании локального пробоотбора при помощи лазеров, электронных и ионных микрозондов. Применение ионного травления — послойного удаления материала анализируемого образца

под действием потока высокоэнергетических частиц — позволяет получать профили распределения элементов по глубине. Послойное травление можно осуществить также химическим или электрохимическим путем.

## Методы распределительного анализа материалов

### Лазерный микроанализ

Нам уже известно о применении лазеров в качестве источников света в спектроскопических методах анализа. Однако лазер может использоваться и для пробоотбора путем испарения микроскопических объемов пробы. Одновременно лазер может частично возбуждать атомы в образующемся атомном паре. Лазерный микроанализатор включает в себя твердотельный лазер, микроскоп для наблюдения за поверхностью образца и направления лазерного луча в нужную точку и спектрометр для анализа образующегося атомного пара (рис. 8.9).

При облучении лазерным лучом поверхности непрозрачного тела на ней образуется кратер диаметром 10–200 мкм и глубиной 10–100 мкм. Масса испарившегося вещества составляет  $10^{-9}$  —  $10^{-6}$  г. Применение точной фокусировки и наведения лазерного луча позволяет осуществить качественный и количественный локальный и распределительный анализ приповерхностного слоя материала.

*Методами детектирования* могут служить атомно-абсорбционная спектроскопия, атомно-эмиссионная спектроскопия (в частности, с индуктивно связанный плазмой) или масс-спектрометрия. Лазерный луч может одновременно служить источником излучения для регистрации поглощения света свободными

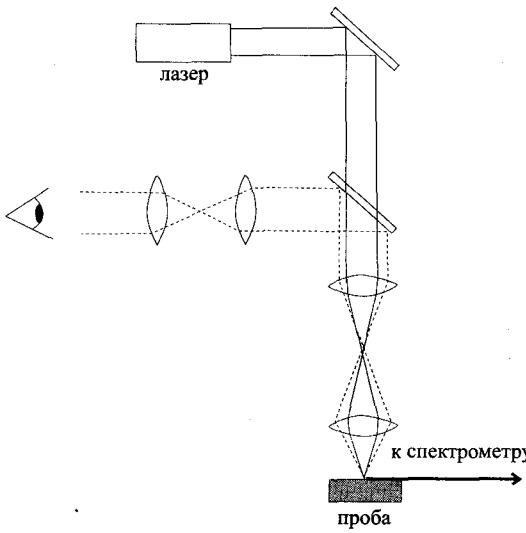


Рис. 8.9. Устройство лазерного микроанализатора.

атомами (лазерная атомно-абсорбционная спектроскопия) или возбуждения их флуоресценции (лазерно-индукционная атомная флуоресценция). Возможно и детектирование ионов при помощи масс-спектрометрии. Для увеличения степени ионизации атомов также можно использовать лазер или электрическое поле (лазерная спектроскопия с полевой ионизацией).

### Электронно-лучевой зонд

Методы анализа твердых тел с использованием сфокусированных пучков электронов называются электронно-зондовым микроанализом. При взаимодействии пучка электронов с анализируемым образцом возникает множество разнообразных явлений, схематически изображенных на рис. 8.10.

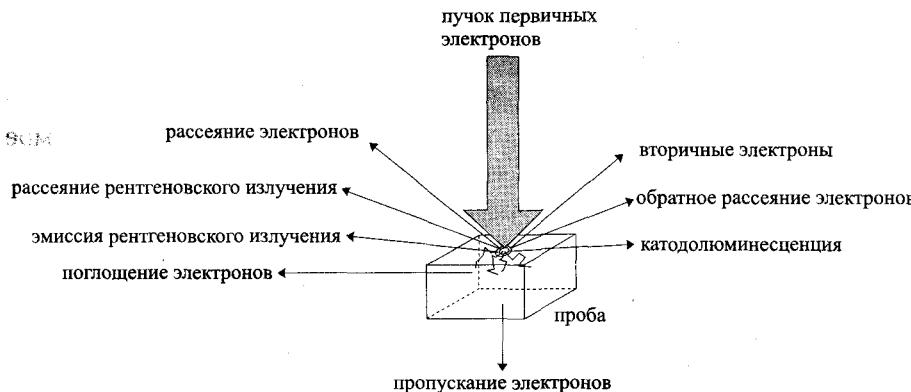


Рис. 8.10. Взаимодействие пучка электронов с анализируемым твердым образцом.

Среди электронов, испускаемых с поверхности образца, примерно половину составляют первичные электроны, претерпевшие обратное рассеяние, а другую половину — вторичные электроны, испускаемые атомами образца. Как те, так и другие можно использовать в аналитической химии. В химическом анализе используют и рентгеновское излучение, испускаемое атомами образца. Механизм его возникновения аналогичен описанному в разделе 3.2.3 применительно к рентгенофлуоресцентному анализу. Единственное отличие состоит в том, что в данном случае источником возбуждения атомов служит не рентгеновское излучение, а поток высокоэнергетических электронов.

Фокусировку пучка первичных электронов осуществляют при помощи электромагнитного поля. Используя хорошо сфокусирован-

ные пучки, можно проводить анализ отдельных участков поверхности площадью порядка  $1 \text{ мкм}^2$  и тем самым осуществлять локальный анализ с высоким линейным, поверхностным, а в сочетании с техникой травления — и объемным разрешением.

### Ионный зонд

Подобно пучкам электронов можно использовать в химическом анализе и пучки ионов. При взаимодействии ионного пучка с поверхностью анализируемого материала происходит распыление вещества. При этом образуются вторичные ионы, которые регистрируют при помощи масс-спектрометрии. Этот метод анализа называется *масс-спектрометрией вторичных ионов* (МСВИ).

Генерирование первичных ионов осуществляют под действием электрического разряда или термическим способом (ионы щелочных металлов, например,  $\text{Cs}^+$ ). Ионы ускоряют в электрическом поле при помощи экстрагирующего электрода и фокусируют системой электромагнитных линз. При взаимодействии пучка ионов с поверхностью образца происходит их рассеяние (так называемое обратное резерфордовское рассеяние ионов) и частичное испарение исследуемого материала с образованием нейтральных и ионизированных (в том числе многократно) атомов и атомных групп (кластеров). Анализ полученной смеси вторичных ионов осуществляют масс-спектрометрическим методом, обычно с применением двойной фокусировки (рис. 3.113). На рис. 8.11 показан пример масс-спектра вторичных ионов поверхности кремниевой подложки, покрытой слоем германия. В качестве первичных ионов использованы ионы  $\text{O}_2^+$ . Основными одноатомными ионами в спектре являются  $\text{Ge}^+$ ,  $\text{Si}^+$ ,  $\text{O}^+$  и  $\text{H}^+$ . Ионы  $\text{O}^+$  образуются главным образом в результате внедрения ионов  $\text{O}_2^+$  в поверхностный слой образца, а ионы  $\text{H}^+$  — из адсорбированной атмосферной влаги. В спектре наблюдаются и многозарядные ионы такие, как  $\text{Si}^{2+}$  или  $\text{Si}_2\text{O}^+$ , а также сложные кластеры типа  $\text{GeSiO}$ .

Анализ методом МСВИ можно проводить в статическом и динамическом режимах.

МСВИ в *статическом* режиме является практически неразрушающим методом анализа. В этом случае скорость травления (послойного удаления атомов с поверхности под действием пучка ионов) составляет лишь около  $0,1 \text{ нм в час}$ . Учитывая, что в методе МСВИ разрешение по глубине составляет 1–5 атомных слоев, можно говорить о том, что в этом случае осуществляется анализ поверхности в строгом смысле слова.

Динамический режим МСВИ используют для изучения профилей распределения элементов по глубине образца и объемного (трехмерного) распределительного анализа. Здесь скорость травления достигает 1 мкм в час. За счет непрерывного удаления материала образца становится возможным проводить его послойный анализ.

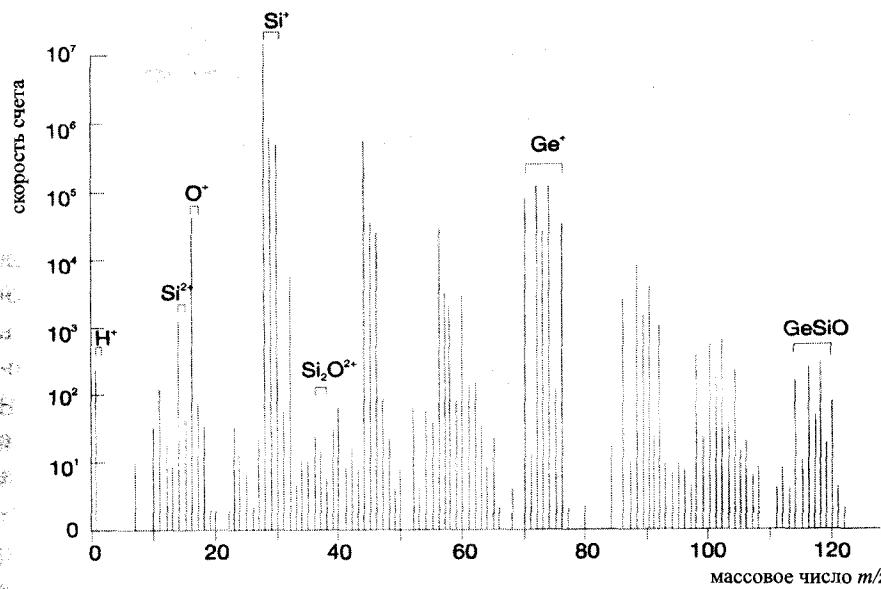


Рис. 8.11. Масс-спектр вторичных ионов кремниевой подложки, покрытой германием.

В результате взаимодействия пучка ионов с поверхностным слоем образца в больших количествах образуются нейтральные частицы, непосредственно не регистрируемые масс-спектрометром. Однако их можно зарегистрировать (и тем самым увеличить чувствительность метода) при использовании дополнительных источников ионизации. На этом принципе основаны современные варианты МСВИ — масс-спектрометрия в тлеющем разряде и масс-спектрометрия распыленных нейтральных частиц.

### Методы электронной спектроскопии поверхности

В основе методов электронной спектроскопии лежит измерение энергии вторичных электронов, испускаемых атомами вещества при взаимодействии с потоком высокогенеретических фотонов или электронов. Для аналитической химии поверхности твердого тела представляют интерес методы фотоэлектронной спектроскопии (иначе — электронной спектроскопии для химического анализа, ЭСХА)

и оже-электронной спектроскопии. Теоретические основы процессов испускания фотоэлектронов рассмотрены в разделе 3.2.3, посвященном рентгеновской спектроскопии.

В основе **фотоэлектронной спектроскопии**, за развитие которой К.Зигбан в 1981 г. получил Нобелевскую премию, лежит процесс ионизации атома A фотоном  $h\nu$ :



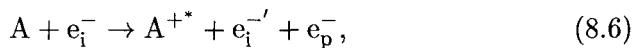
и регистрация энергий испускаемых фотоэлектронов  $e^{-}$ . Кинетическая энергия фотоэлектрона  $E_{kin}$  определяется его энергией связи  $E_B$  и энергией возбуждающего излучения  $h\nu$  (см. уравнение (3.39)). Для отрыва электрона требуется, чтобы энергия фотонов превышала некоторое минимально необходимое значение. Вместо фотонов можно использовать пучки электронов или синхротронное излучение достаточно высокой энергии. Если для возбуждения применять рентгеновское излучение (в этом случае метод называется рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией, РФЭС), например, излучение линии  $CuK_{\alpha}$  или  $CrK_{\alpha}$ , то фотоэлектроны эмитируются с внутреннего уровня. При использовании излучения УФ-диапазона (УФ-фотоэлектронная спектроскопия) происходит эмиссия валентных электронов.

С учетом работы выхода электрона  $w$  можно записать следующее выражение для энергии связи фотоэлектрона:

$$E_B = h\nu - E_{kin} - w. \quad (8.5)$$

При обсуждении методов рентгеновской спектроскопии мы упоминали и об *оже-эффекте* как явлении, сопутствующем главному процессу, лежащему в основе этих методов, — испусканию кванта рентгеновского излучения. Напомним, что оже-электрон испускается под действием избытка энергии, существующем в возбужденном ионизированном атоме. Схематично различные процессы, происходящие при ионизации атома первичным электроном и его последующей релаксации, можно представить следующим образом.

*Ионизация под действием пучка электронов (или рентгеновского излучения):*



где  $e_i^{-}$ ,  $e_i^{-'}$  — первичный электрон до и после ионизации;  
 $e_p^{-}$  — вторичный электрон.

Оже-эффект:



$e_A^-$  — оже-электрон.

Рентгеновская эмиссия:



В отличие от фотоэлектрона, для оже-электрона кинетическая энергия не зависит от энергии возбуждающего первичного электрона (или рентгеновского кванта). Она определяется лишь расположением уровней электронов, участвующих в процессе ( $KLL$ ,  $LMM$ ,  $MNN$  и т.д. — см. рис. 3.38). Поэтому для регистрации оже-электронов можно использовать *полихроматическое рентгеновское излучение* или пучок электронов различных энергий.

### Аппаратура для электронной спектроскопии

В принципиальном плане устройство электронного спектрометра напоминает устройство оптического спектрометра. Электронный спектрометр включает в себя источник возбуждающих частиц, держатель пробы, электронный энергоанализатор (играющий ту же роль, что и монохроматор), детектор и устройство регистрации и отображения сигнала. Схематически устройство электронного спектрометра представлено на рис. 8.12.

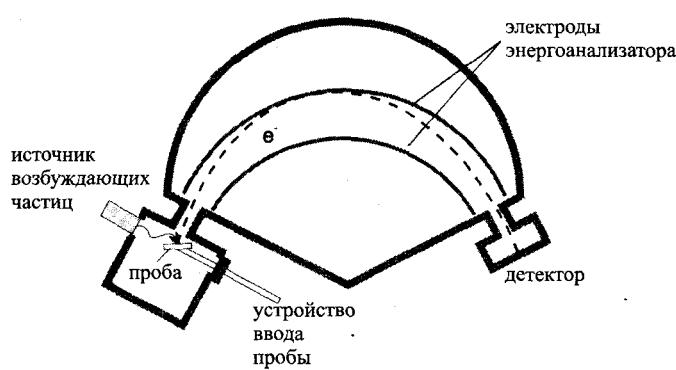


Рис. 8.12. Устройство спектрометра для ЭСХА и оже-спектроскопии.

В качестве *источника* возбуждающих частиц в ЭСХА используют рентгеновскую трубку с анодом из чистого металла, например, Mg или Al.  $K_\alpha$ -линии обоих этих элементов имеют малую ширину (порядка 0,8 эВ), излучение достаточно монохроматично, что

позволяет достичь высокой разрешающей способности. Для оже-электронной спектроскопии чаще применяют электронные пучки — катодные лучи, возникающие под действием тлеющего разряда. Этот пучок электронов с энергиями от 1 до 10 кэВ фокусируют на участок поверхности пробы диаметром 5–500 мкм, что обеспечивает высокое пространственное разрешение. Источники электронов с очень узкой, порядка 5 мкм, фокусировкой называют оже-микрозондами. Их можно использовать для локального анализа.

Действие энергоанализаторов основано на использовании электрических или магнитных полей. Путем изменения напряженности поля можно сфокусировать на детекторе электроны с различными кинетическими энергиями. Энергетический анализ электронов проводят в условиях сверхвысокого вакуума (порядка  $10^{-7}$  Па). Детектирование в настоящее время осуществляют главным образом при помощи многоканальных детекторов электронов, аналогичных многоканальным фотоприемникам в оптической спектроскопии.

### Практическое применение

**ЭСХА** — электронная спектроскопия для химического анализа. При помощи фотоэлектронной спектроскопии можно изучать атомы всех элементов, кроме водорода и гелия. Наложение спектральных линий различных элементов наблюдается редко. Фотоэлектронный спектр может содержать отдельные оже-пики. Их легко обнаружить, изменяя энергию возбуждающих частиц, поскольку энергия оже-электронов, в отличие от энергии фотоэлектронов, не зависит от энергии возбуждения.

На рис. 8.13 приведен типичный пример фотоэлектронного спектра — спектр образца дифтортиофосфата тетрапропиламмония — в виде зависимости показаний детектора (скорости счета) от энергии связи электрона  $E_B$  (см. уравнение (8.5)). Энергия связи электрона в атоме зависит от его *степени окисления*, поэтому различным степеням окисления одного и того же элемента соответствуют разные пики. Как правило, чем выше степень окисления, тем сильнее притяжение электрона к ядру, тем выше энергия связи. Примерные величины изменений энергии связей элементов (химические сдвиги) для различных степеней окисления приведены в табл. 8.4.

Помимо определения степени окисления, ЭСХА позволяет получать ценную информацию и о *структуре* молекул. На рис. 8.14 приведен спектр C(1s)-электронов этилтрифторацетата. Отнесение отдельных пиков к соответствующим атомам углерода можно легко осуществить на основе общих представлений об электронных

эффектах в органической химии. Так, наименьшей кинетической энергией и, соответственно, наибольшей энергией связи обладает 1s-электрон атома углерода трифторметильной группы. Причина состоит в сильном индуктивном эффекте трех электроотрицательных атомов фтора, приводящем к повышению положительного заряда на атоме углерода.

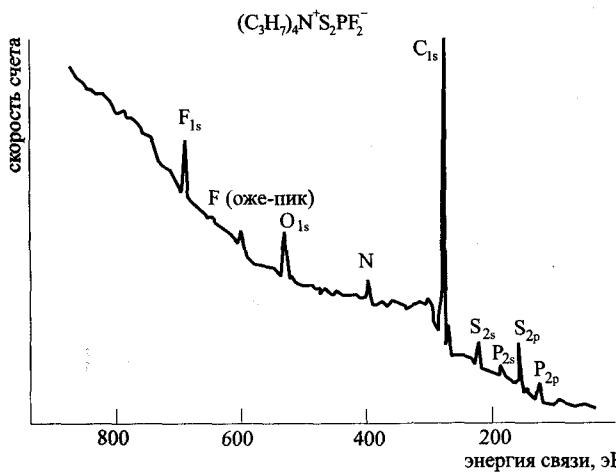


Рис. 8.13. Фотоэлектронный спектр дифтортиофосфата тетрапропиламмония. Источник возбуждения — рентгеновское излучение.

Таблица 8.4. Химические сдвиги в ЭСХА-спектрах некоторых элементов для различных степеней окисления. За условный нуль для разных элементов приняты разные степени окисления.

Элемент	Относительная энергия связи, эВ									
	Степень окисления									
	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7
N(1s)	0,0			4,5		5,1		8,0		
S(1s)	-2,0		0,0				4,5		5,8	
Cl(2p)		0,0				3,8		7,1		9,5
Cu(1s)			0,0	0,7	4,4					
I(4s)		0,0						5,3		6,5
Eu(3d)				0,0	9,6					

Глубина отбора аналитической информации в методе фотоэлектронной спектроскопии составляет от 10 до 50 Å. С его помощью исследуют состав различных твердых тел — оксидных пленок на поверхностях металлов и сплавов, каталитические центры, обнаруживающие примеси на поверхности полупроводниковых материалов.

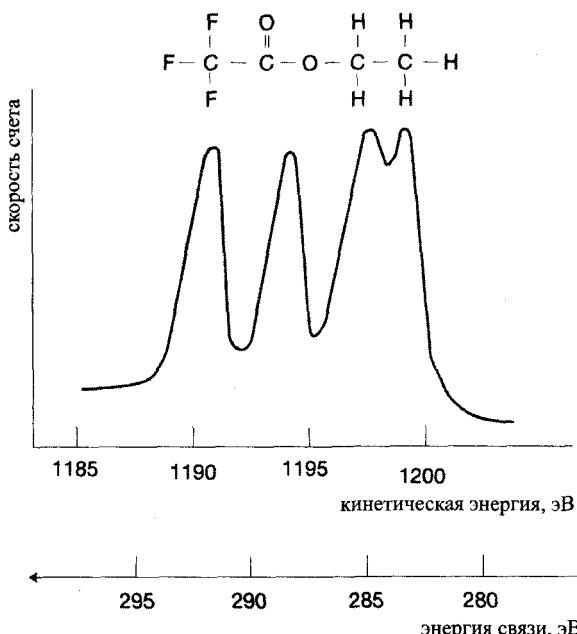


Рис. 8.14. Фотоэлектронный спектр C(1s)-электронов этилтрифтормата. Источник возбуждения — рентгеновское излучение.

**Оже-электронная спектроскопия.** Методом оже-электронной спектроскопии выполняют как качественный, так и количественный анализ. Возможно определять все элементы, кроме водорода и гелия. Использование электронной пушки позволяет анализировать поверхность, а сфокусированных электронных пучков — осуществлять локальный анализ. Сочетание с техникой ионного травления (обычно посредством ионов  $\text{Ag}^+$ ) позволяет проводить послойный анализ материалов. Глубина отбора аналитической информации меньше, чем для фотоэлектронной спектроскопии, и составляет от 3 до 30  $\text{\AA}$ . Здесь уже можно говорить об анализе поверхности в достаточно строгом смысле слова.

Дополнительными преимуществами оже-электронной спектроскопии по сравнению с ЭСХА являются более высокая чувствительность по отношению к легким элементам и очень малые матричные эффекты.

На рис. 8.15 (а) приведен пример использования метода оже-электронной спектроскопии для исследования поверхности. Образец представляет собой кремниевую подложку, покрытую слоем Ni-Cr толщиной около 150  $\text{\AA}$ . Оже-электронный спектр представлен как за-

вистимость производной скорости счета  $dN(E)/dE$  от энергии оже-электронов  $E$ .

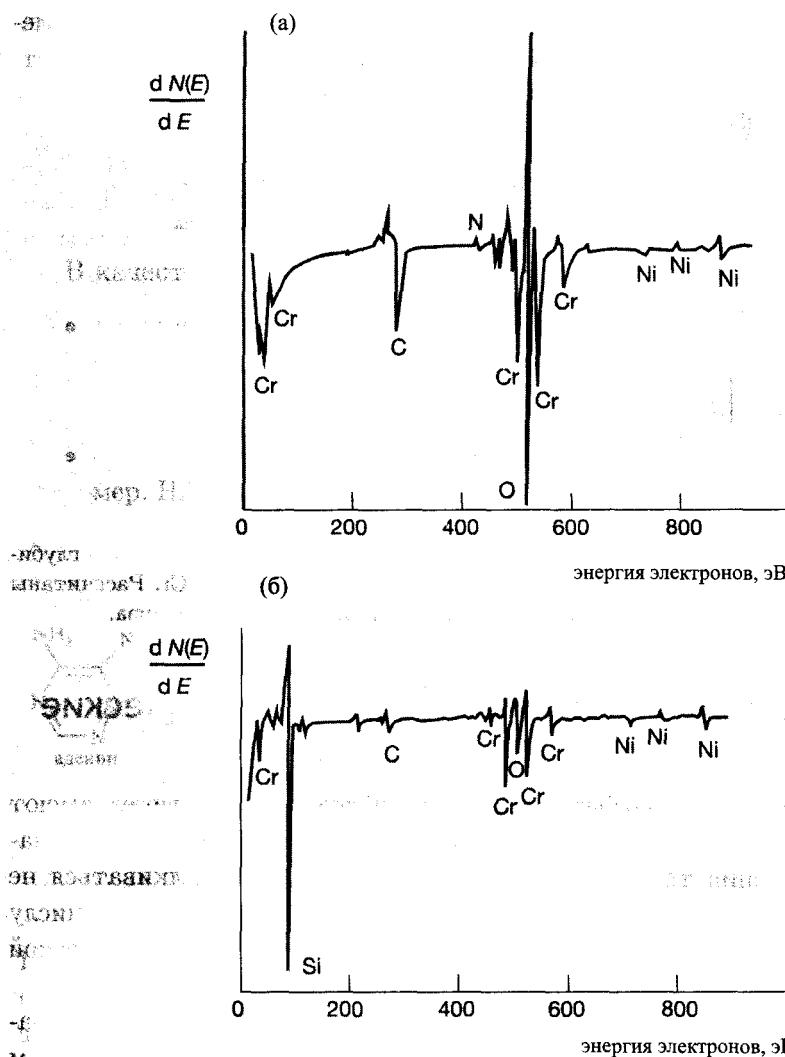


Рис. 8.15. Оже-электронный спектр кремниевой подложки, покрытой слоем никеля и хрома. (а) — Спектр поверхности. (б) — Спектр после стравливания слоя толщиной около 200 Å.

Наряду с линиями основных элементов покрытия Ni и Cr отчетливо заметны линии кислорода. На рис. 8.15 (б) приведен спектр того же образца, покрытие с которого удалено посредством ионного травления. Сигналы Ni и Cr теперь значительно слабее. Наблюдается интенсивный пик элемента подложки — кремния. Использование

оже-электронной спектроскопии в сочетании с ионным травлением позволяет получать профили распределения элементов по глубине (рис. 8.16). Для этого сначала строят зависимости интенсивностей пиков от времени травления, а затем по известной скорости травления пересчитывают значения времени в значения глубины.

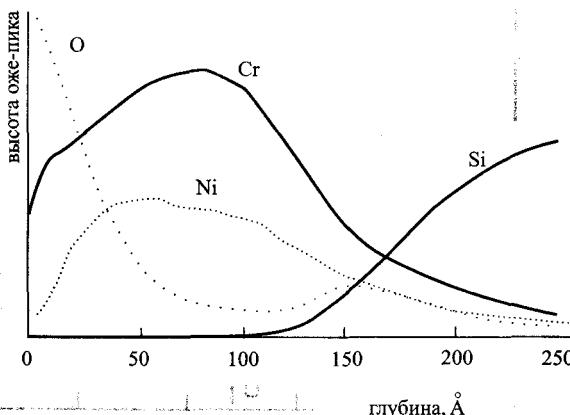


Рис. 8.16. Концентрационные профили распределения элементов по глубине кремниевой подложки, покрытой слоем Ni и Cr. Рассчитаны по данным оже-электронного микрозондового анализа.

### 8.3. Ферментативные и иммунохимические методы

Методы определения ферментов, их субстратов и антител имеют ряд особенностей, которые мы обсудим в этом разделе. С задачами определения такого рода веществ приходится сталкиваться не только в исследовательских лабораториях. Они относятся к числу повседневных задач медицинской диагностики, фармацевтической и микробиологической промышленности.

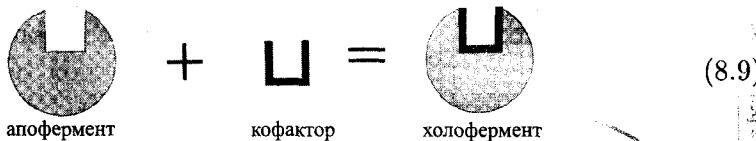
С биохимическими методами анализа мы уже встречались и ранее в частности, при обсуждении проблем, связанных с анализом объектов окружающей среды. Основное достоинство биохимических методов — высокая селективность, обусловленная специфичностью ферментативных и иммунных процессов.

#### Ферментативные методы анализа

##### Ферменты в аналитической химии

Ферменты — это белковые биологические катализаторы с относительными молекулярными массами от 10 000 до 2 000 000 дальтон.

Они состоят из аминокислотных цепей, в которых остатки аминокислот связаны пептидными связями. Многие ферменты проявляют свое действие, только будучи связаны с кофактором. Чтобы различить действующий фермент и его белковую часть, используют термины «холофермент» и «апофермент», соответственно.



В качестве кофакторов могут выступать:

- ионы металлов —  $Zn^{2+}$  в алкогольдегидрогеназе и карбоксипептидазе,  $Mn^{2+}$  в фосфортрансферазе, ионы железа в цитохромах;
- органические молекулы — коферменты (коэнзимы), например,  $NAD^+$  (рис. 8.17), переносчик гидроксильных групп и электронов, или коэнзим А, переносчик ацильных групп.

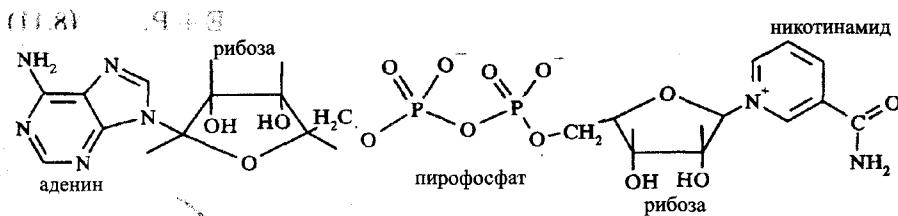


Рис. 8.17. Структурная формула кофермента никотинамидадениндинфосфата ( $NAD^+$ ).

### Кинетика ферментативных реакций

В организме ферменты выполняют роль катализаторов биохимических реакций. В присутствии фермента энергия активации значительно снижается, и скорость реакции возрастает во много раз.

В аналитической химии катализитические реакции применяются в кинетических методах анализа (раздел 2.7). Весь математический аппарат формальной кинетики, используемый в этих методах, может быть применен и к ферментативным реакциям. Одна из особенностей ферментативных реакций — явление *насыщения по субстрату*, т.е. наблюдаемое при некоторых условиях отсутствие зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Формально реакция при этом имеет нулевой порядок. Рис. 8.18 иллюстрирует это явление. Если представить графически зависимость

начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата, то при небольших концентрациях наблюдается линейная зависимость (первый кинетический порядок), далее порядок реакции становится промежуточным между первым и нулевым и, наконец, при высоких концентрациях субстрата наблюдается нулевой порядок.

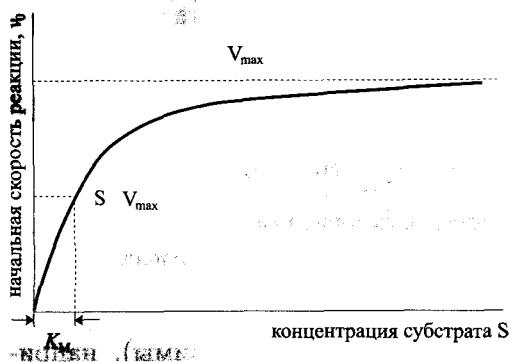


Рис. 8.18. Влияние концентрации субстрата на начальную скорость ферментативной реакции.

На первой, обратимой, стадии образуется комплекс фермента с субстратом. После второй стадии фермент высвобождается (ср. с уравнениями (2.182) и (2.183) в разделе 2.7). На рис. 8.19 показано изменение концентраций отдельных участников реакции во времени.

Выразим начальную скорость ферментативной реакции через концентрации фермента и субстрата. В соответствии с общей теорией формальной кинетики скорость образования продукта реакции выражается как

$$v_0 = k_2[ES]. \quad (8.12)$$

Примем, что концентрация промежуточного комплекса ES является *стационарной*, т.е. не изменяющейся во времени. Скорость

Объяснить насыщение по субстрату можно с позиций кинетической теории ферментативных реакций, разработанной Михаэлисом и Ментен. В соответствии с этой теорией фермент E реагирует с субстратом S с образованием продукта P согласно следующей схеме:

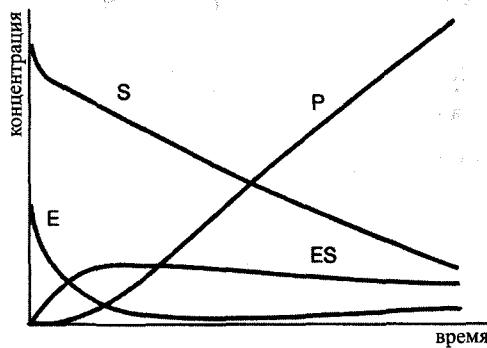
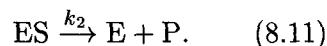
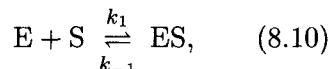


Рис. 8.19. Примерный ход изменения концентраций фермента E, субстрата S, продукта реакции P и промежуточного комплекса ES во времени в соответствии с кинетической схемой Михаэлиса–Ментен.

образования комплекса равна

$$v_1 = k_1[E][S]. \quad (8.13)$$

Скорость распада комплекса равна

$$v_2 = -k_{-1}[ES] - k_2[ES]. \quad (8.14)$$

Ввиду допущения о стационарности общая скорость изменения концентрации комплекса равна нулю:

$$\frac{d[ES]}{dt} = v_1 + v_2 = 0. \quad (8.15)$$

Подставляя (8.13) и (8.14) в (8.15), получаем:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]. \quad (8.16)$$

Общая концентрация фермента  $c_E$  равна

$$c_E = [E] + [ES]. \quad (8.17)$$

Подставим это соотношение в выражение (8.16):

$$k_1[S](c_E - [ES]) = k_{-1}[ES] + k_2[ES]. \quad (8.18)$$

Введем величину  $K_M$ , называемую константой Михаэлиса–Ментен:

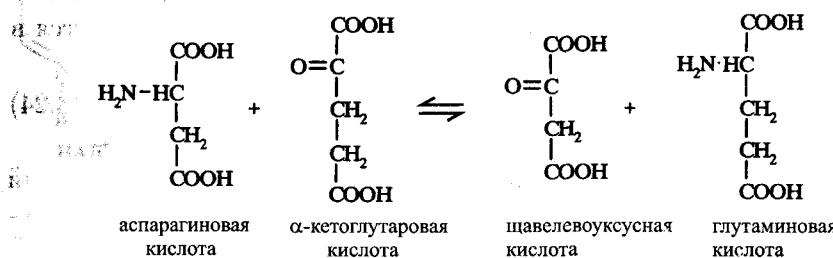
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[S](c_E - [ES])}{[ES]}. \quad (8.19)$$

Решив уравнение (8.19) относительно  $[ES]$ , получаем:

$$[ES] = \frac{c_E[S]}{K_M + [S]}. \quad (8.20)$$

Отсюда начальная скорость образования продукта ферментативной реакции (см. уравнение (8.12)) равна

$$v_0 = k_2 \frac{c_E[S]}{K_M + [S]}. \quad (8.21)$$





Примеры значений констант Михаэлиса–Ментен приведены в табл. 8.5. Ниже мы обсудим использование уравнения (8.21) для определения как ферментов, так и субстратов.

**Таблица 8.5.** Константы Михаэлиса–Ментен для некоторых аналитически важных ферментативных реакций.

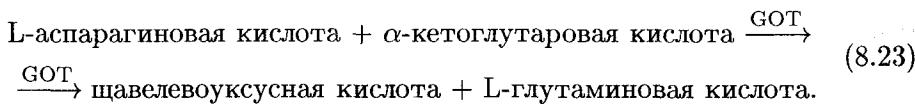
Фермент	Субстрат	$K_M$ , мМ
Каталаза	$H_2O_2$	25
Гексокиназа	глюкоза	0,15
Глутаматдегидрогеназа	глутамат	0,12

### Определение ферментов

Если концентрация субстрата достаточно велика,  $[S] \gg K_M$ , то уравнение (8.21) упрощается:

$$v_0 = v_{\max} = k_2 c_E. \quad (8.22)$$

В этих условиях скорость реакции максимальна и зависит только от концентрации фермента, но не субстрата (упоминавшееся выше явление насыщения по субстрату). Таким образом, измерение скорости реакции можно использовать для определения концентрации фермента. Примером может служить определение фермента GOT — одного из ферментов класса трансамина, катализирующего реакцию



Концентрация этого фермента в сыворотке крови человека является очень важным диагностическим параметром, характеризующим протекание процессов метаболизма аминокислот.

### Определение субстратов

Для определения субстратов следует использовать область концентраций  $[S] \ll K_M$ . В этом случае уравнение (8.21) превращается в

$$v_0 = \frac{k_2 c_E [S]}{K_M} = \frac{v_{\max}}{K_M} [S] = \text{const} \cdot [S]. \quad (8.24)$$

Определение субстратов при помощи ферментативных реакций широко применяется в клиническом, производственном, экологическом анализе и других областях (табл. 8.6).

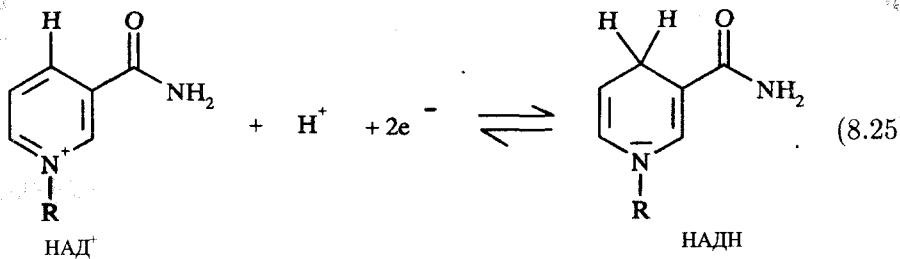
Таблица 8.6. Примеры использования ферментативных реакций для определения субстратов.

Субстрат	Ферментативная реакция	Фермент-катализатор
<i>Медицина:</i>		
Глюкоза	глюкоза + O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O ⇌ ⇒ D-глюконолактон + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	глюкозооксидаза
Этанол (в крови)	этанол + НАД <sup>+</sup> ⇌ ⇒ ацетальдегид + НАДН	алкогольдегидрогеназа
<i>Промышленность:</i>		
Пенициллин	пенициллин + H <sub>2</sub> O ⇌ ⇒ пенициллиновая кислота	пенициллиназа
Катехол	катехол + O <sub>2</sub> ⇌ ⇒ дикарбоновая кислота	катехол-1,2-оксигеназа
<i>Экология:</i>		
Фенол	фенол + O <sub>2</sub> ⇌ ⇒ о-бензохинон	полифенолоксидаза

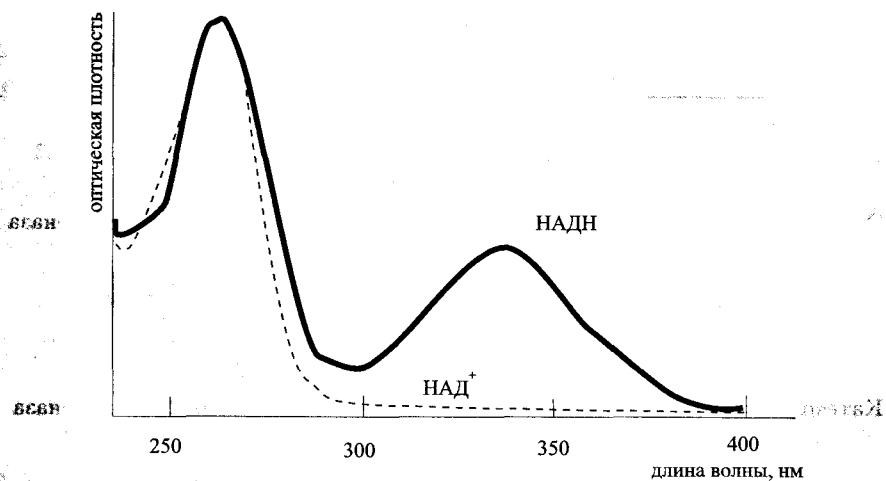
### Способы детектирования

В некоторых случаях ход протекания ферментативных реакций можно контролировать непосредственно, следя за изменением концентрации любого из ее участников. Так, для измерения скорости любой реакции с участием кислорода можно использовать кислородный датчик Кларка, а с участием иона аммония — соответствующий ионселективный электрод.

Однако значительно чаще используют химические индикаторы или дополнительные реакции, называемые индикаторными или вспомогательными. Так, для окислительно-восстановительных реакций в качестве индикатора можно использовать кофермент НАД<sup>+</sup> (рис. 8.17), поскольку УФ-спектры его окисленной (НАД<sup>+</sup>) и восстановленной (НАДН) форм заметно различаются.



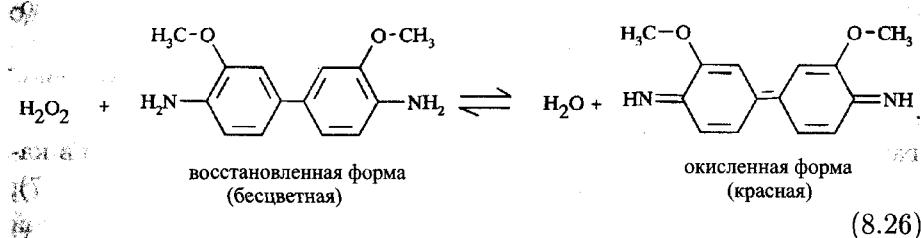
УФ-спектры обеих форм НАД<sup>+</sup> приведены на рис. 8.20. Для фотометрического контроля наиболее удобна длина волны 340 нм.



## Section 2023-2024

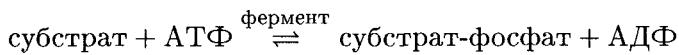
Рис. 8.20. Спектры поглощения в УФ-области водных растворов НАД<sup>+</sup> и НАДН.

Применение индикаторных реакций мы рассмотрим на примере определения глюкозы при помощи глюкозооксидазы (табл. 8.6). Одним из продуктов этой реакции является пероксид водорода. Введем в систему дополнительный реагент — о-дианизидин. Он бесцветен, однако в присутствии пероксида водорода превращается в окрашенный продукт вследствие реакции



Продукт окисления — диймин — интенсивно поглощает свет при 460 нм. Это можно использовать для фотометрического контроля протекания ферментативной реакции. Индикаторной реакции может предшествовать вспомогательная — как показано на следующей схеме.

### Ферментативная реакция (основная):

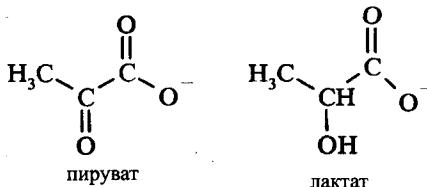
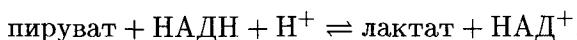


Вспомогательная реакция:





### Индикаторная реакция:



В этой схеме АДФ и АТФ — сокращенные обозначения адено-зин-5'-дифосфата и адено-зин-5'-трифосфата, соответственно (рис. 8.21). В качестве индикатора снова использован НАДН. Контроль реакции — фотометрический, по поглощению света при 340 нм (рис. 8.20).

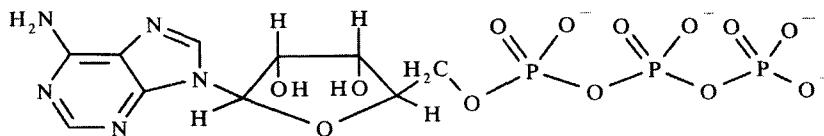
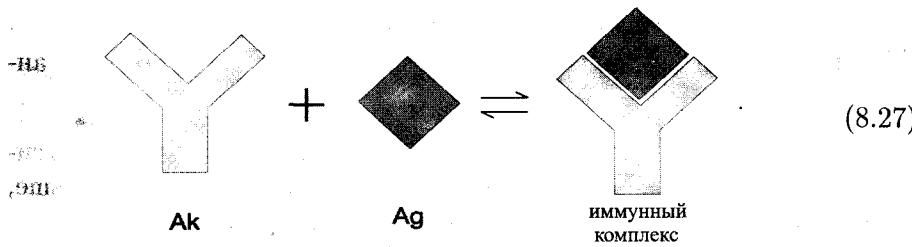


Рис. 8.21. Структурная формула аденоzin-5'-трифосфата (АТФ)

## Иммунный анализ

Еще одно направление развития биохимических методов анализа основано на использовании *иммунохимических* процессов. В основе методов иммунного анализа лежат взаимодействия антиген-антитело.

При попадании в организм человека или животного чужеродного высокомолекулярного вещества природы вступает в действие иммунная система. Она вырабатывает специальное вещество, способное связать постороннее вещество и, таким образом, его обезвредить. Чужеродное вещество называется **антителом**, а вырабатываемое иммунной системой «противоядие» — **антителом**. В результате реакции антигена (Ag) с антителом (Ak) образуется иммунный комплекс:





Впервые иммунные реакции в аналитической химии были использованы в 1950-е годы для определения инсулина в плазме крови с использованием антител против инсулина.

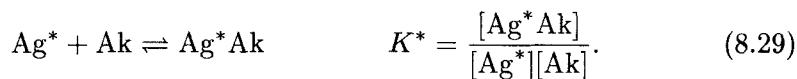
Антитела представляют собой вещества белковой природы. Примером может служить гамма-глобулин (в форме так называемого IgG-глобулина). Антигенами, как уже упоминалось, являются высокомолекулярные вещества (например, белки, пептиды или полисахариды) с молекулярными массами выше 1000. Принципиально возможно определять иммунохимическими методами и низкомолекулярные вещества. Для этого их надо предварительно связать с каким-либо белком-носителем. Такое связанное с белком низкомолекулярное вещество называется гаптеном.

Основными принципами детектирования в иммунных методах анализа служат измерение люминесценции, активности фермента или радиоактивности. Мы рассмотрим две разновидности иммунного анализа — радиоиммунный анализ (РИА) и гетерогенный иммуноферментный анализ (ИФА).

### Радиоиммунный анализ (РИА)

В методе радиоиммунного анализа удачно сочетаются высокая селективность реакций антиген-антитело и высокая чувствительность радиохимических методов анализа (раздел 3.6). Эти методы позволяют определять концентрации вплоть до нескольких пикограммов в миллилитре.

Радиоиммунные методы основаны на конкурирующем комплексообразовании определяемого вещества — природного антигена  $Ag$  — и синтетического меченого (радиоактивного) антигена  $Ag^*$  — с антителом  $Ak$ :



При этом необходимо соблюдение следующих основных условий.

- Концентрации меченого антигена и антитела во всей серии измерений должны оставаться постоянными. Единственной переменной величиной является концентрация определяемого антигена.
- Меченный антиген берется в избытке по отношению к антителу. Число молекул меченого антигена должно быть больше, чем общее число мест связывания в молекулах антитела.

- Константы ассоциации определяемого и меченого антигена  $K$  и  $K^*$  должны достаточно различаться между собой. Как правило, такие константы имеют порядок величины от  $10^{10}$  до  $10^{13}$  л·моль $^{-1}$ .



Рис. 8.22. Градуировочная зависимость для радиоиммунного метода анализа. Индикаторное вещество — меченный комплекс  $\text{Ag}^*\text{Ak}$ .

При взаимодействии с антителом смеси меченого и определяемого антигена имеют место процессы конкурентного комплексообразования (уравнения (8.28) и (8.29)). Ввиду этого концентрация меченого комплекса  $\text{Ag}^*\text{Ak}$  тем выше, чем меньше концентрация  $\text{Ag}$ . Зависимость концентрации меченого комплекса от концентрации  $\text{Ag}$  имеет

S-образный вид и может служить для градуировки (рис. 8.22).

Ход градуировочной зависимости, представленной на рис. 8.22, в принципе возможно рассчитать на основании закона действующих масс (см. главу 2). Однако на практике предпочитают пользоваться эмпирическими зависимостями, поскольку реальный процесс взаимодействия антиген-антитело обычно протекает сложнее, чем это представлено уравнениями (8.28) и (8.29) (за счет наличия множества различных центров связывания, образования комплексов различного состава и т.д.).

Концентрацию комплекса антитела с меченым антигеном определяют посредством измерения радиоактивности. Для этого комплекс предварительно отделяют от непрореагировавшего избытка меченого антигена. Разделение осуществляется очень легко, если антитело иммобилизовано. Обычно последовательность операций при выполнении радиоиммунного анализа выглядит следующим образом.

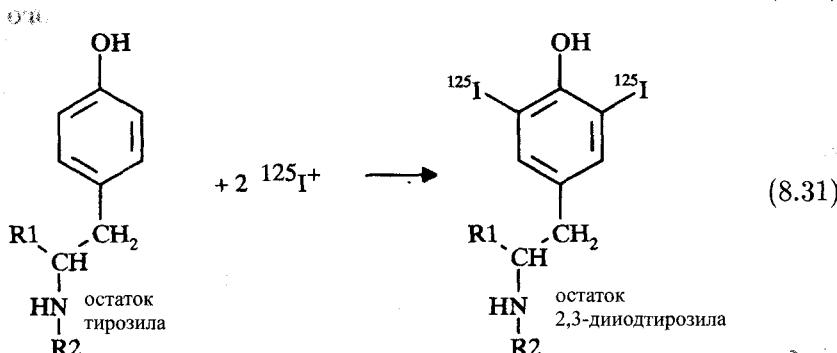
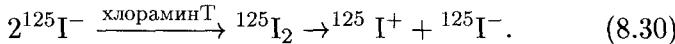
- Иммобилизация антитела, например, на внутренней поверхности реакционного сосуда.
- Проведение иммунной реакции с участием пробы, в которую добавлен меченный антиген.
- Отделение непрореагировавших веществ путем промывания поверхности сосуда.
- Измерение радиоактивности стенок сосуда.

### Использование радиоактивной метки $^{125}\text{I}$

Среди огромного множества радиоактивных изотопов наиболее подходящими радиохимическими свойствами для синтеза меченых антигенов обладают  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{3}\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{57}\text{Co}$  и  $^{125}\text{I}$ . Использование  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  и  $^{3}\text{H}$  удобно еще и тем, что соответствующие элементы входят в состав большинства биологических веществ, определяемых радиоиммунным методом. Кроме того, они являются достаточно мягкими излучателями, и работа с ними требует соблюдения лишь относительно простых правил техники безопасности. Однако чаще всего используют изотоп  $^{125}\text{I}$ . Он является чистым  $\gamma$ -излучателем, а его препараты легко доступны и могут быть получены в виде веществ со 100%-ной изотопной чистотой. Период полураспада изотопа  $^{125}\text{I}$  достаточно велик и составляет 60 суток, а энергия его излучения относительно низкая.

При синтезе и работе с препаратами, меченными  $^{125}\text{I}$ , следует иметь в виду ряд важных моментов.

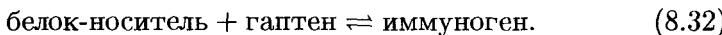
- Если молекула определяемого вещества содержит иод, то возможен нежелательный процесс изотопного обмена между определяемым и меченым антителом. Примерами биологически активных иодсодержащих соединений могут служить гормоны щитовидной железы — тироксин и триоидтиронин.
- Введение изотопной метки  $^{125}\text{I}$  легко осуществимо, если молекула содержит остаток тирозина или гистидина (как, например, у многих белковых гормонов). В этом случае для введения метки достаточно использовать смесь  $\text{Na}^{125}\text{I}$  и окислителя, например, хлорамина Т. Реакция протекает по следующей схеме:



- Если молекула не содержит удобных мест для введения метки  $^{125}\text{I}$ , то метку можно ввести вместе с остатком тирозила.

### тогда Синтез иммуногенов

Как мы уже отмечали, к иммунным взаимодействиям способны лишь высокомолекулярные соединения с молекулярной массой свыше 1000. Такие вещества можно определять как антигены непосредственно. Низкомолекулярные соединения-гаптены — стероиды, триазины и др. — сами по себе не вступают в иммунохимические реакции. Для определения таких веществ их необходимо предварительно связать с белком-носителем в высокомолекулярный продукт, называемый иммуногеном:



Белком-носителем чаще всего служит человеческий или бычий альбумин. На рис. 8.23 приведен пример синтеза иммуногена посредством реакций по аминным группам. Сначала аминогруппы гаптена и белка связывают с карбонильными группами глутарового альдегида с образованием двойного шиффова основания. Затем продукт реакции восстанавливают для придания ему большей химической устойчивости.

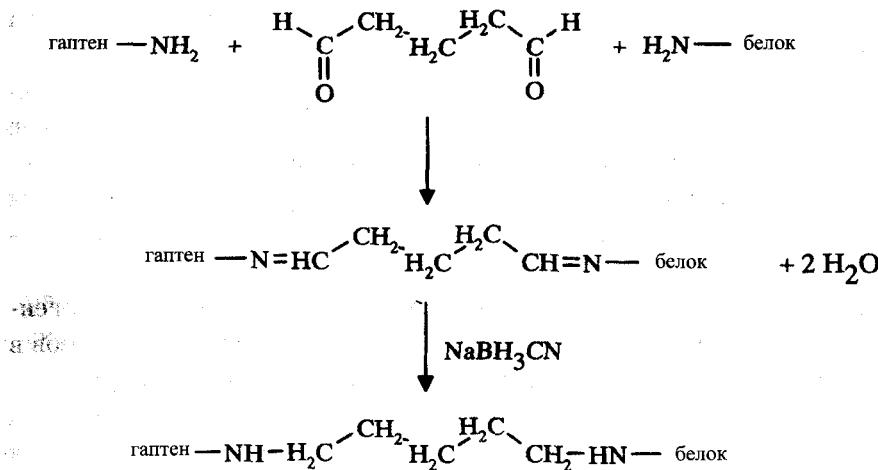


Рис. 8.23. Схема синтеза иммуногена по реакции глутарового альдегида с аминогруппами гаптена и белка.

Примеры использования радиоиммунного метода анализа для определения различных веществ приведены в табл. 8.7.

### Гетерогенный иммуноферментный анализ

Использование ферментов в иммунных методах анализа позволяет осуществить более простой способ детектирования по сравнению



с РИА. В методе иммуноферментного анализа (ИФА) используют антиген, меченный не радиоактивным изотопом, а ферментом.

Таблица 8.7. Примеры определения веществ иммунохимическими методами.

Определяемое вещество	Относительная молекулярная масса	Метод
Инсулин (белковый гормон)	5734	РИА
Пенициллин G	334	РИА
Морфин	285	РИА
Трипсин (белок)	24000	РИА
Атразин	179,5	ИФА
Бензол, толуол, ксиол	от 79 до 116	ИФА
Бенз[а]пирен	252	РИА

Как правило, иммуноферментный анализ проводят в гетерогенном варианте. В этом случае, как и в методе РИА, молекулы антитела иммобилизуют — часто посредством простой адсорбции на активной поверхности. В результате протекания конкурирующих реакций с участием определяемого и меченого антигена часть последнего оказывается связанный в комплекс с антителом и, таким образом, также сорбированной на поверхности. Реакционный сосуд отмывают от избытка несвязанного меченого антитела и добавляют необходимый субстрат с тем, чтобы определить содержание фермента, сорбированного на поверхности вместе с меченным антителом. Как и в других ферментативных реакциях, для определения фермента, как правило, применяют кинетический метод с фотометрическим детектированием.

Пределы обнаружения различных веществ методом гетерогенного ИФА находятся в области от нанограммов до микрограммов в литре. Примеры практического использования этого метода приведены в табл. 8.7. Как видно из таблицы, метод позволяет определять вещества, важные как для медицины, так и с точки зрения контроля окружающей среды.

Антитела, применяемые в иммунохимических методах анализа, представляют собой, по существу, специфические реагенты на самые разнообразные вещества, создаваемые самой природой. Способность живых организмов к синтезу «аналитических реагентов» открывает возможности разработки иммунных методов определения даже таких веществ, природу которых трудно однозначно охарактеризовать с чисто химической точки зрения, например, гумусовых веществ.

## 8.4. Обеспечение качества результатов анализа и «Хорошая лабораторная практика»

### Обеспечение качества результатов анализа

Важнейшей современной задачей аналитической химии является всестороннее обеспечение качества результатов анализа. Для этого необходимо постоянно сопоставлять между собой результаты, полученные в различных лабораториях — в том числе и в международном масштабе. Средствами обеспечения качества результатов анализа служат также официально регламентируемые процедуры планирования и проведения анализов, обработки и хранения данных.

Все указанные средства обеспечения качества результатов анализа составляют единую систему. Понятие «качество», согласно германскому стандарту DIN 55350, определяется следующим образом:

*Качество есть совокупность свойств и признаков продукта или вида деятельности, обеспечивающих его соответствие необходимым требованиям.*

Соответственно, обеспечение качества — это совокупность всех мероприятий, призванных гарантировать соответствие продукта или вида деятельности необходимым требованиям. В нее входят системы управления качеством, планирования качества и испытания качества.

Несоответствие продукта необходимым требованиям, влияющие на его потребительские свойства, называется *дефектом*. В химическом анализе, где «продуктом» служат результаты анализа, типичными примерами такого несоответствия могут быть случайные или систематические погрешности, ложные выводы относительно наличия либо отсутствия вещества в объекте и, наконец, невозможность получения каких-либо осмысленных результатов как таковых.

Для контроля методики анализа на предмет возможных погрешностей и дефектов необходимо в первую очередь отработать ее отдельные стадии и строго прописать все процедуры их выполнения. Затем методику необходимо проверить в целом, произвести ее *валидацию*, и определить все ее важнейшие аналитические характеристики. Для внедрения методики в повсеместную и повседневную практику необходим еще целый ряд мер по контролю качества результатов, которые мы подробнее обсудим ниже.

### Проверка методики анализа

Главная задача проверки (валидации) методики анализа — удостовериться в том, что она дает результаты, достаточно надежные и воспроизводимые для предполагаемой области применения.

При использовании относительных методов анализа первым этапом анализа является *градуировка*. В ее основе лежит использование образцов сравнения — стандартных растворов или твердых стандартов. Градуировочную функцию устанавливают при помощи линейного регрессионного анализа (разделы 1.3, 6.3).

*Воспроизводимость* методики характеризуют при помощи стандартного отклонения (уравнение (1.8)). Другими важнейшими характеристиками методики служат *предел обнаружения* (уравнения (1.14), (1.15)) и *рабочий диапазон* (раздел 1.3).

Для проверки методики на наличие систематических погрешностей, обусловленных причинами методического характера или влиянием матрицы, используют *процентную меру правильности* (уравнение (1.11)) как характеристику правильности отдельных результатов, и *функцию правильности* как характеристику методики в целом.

Функция правильности описывает связь между найденными  $x_{\text{найд}}$  и истинными  $x_{\text{ист}}$  значениями содержания определяемого компонента в виде линейной зависимости

$$x_{\text{найд}} = a_0 + a_1 x_{\text{ист}}. \quad (8.33)$$

Под «истинным» значением понимается содержание вещества, установленное с наивысшей возможной точностью. В идеальном случае значения коэффициентов в уравнении (8.33) должны составлять

$$a_0 = 0 \quad \text{и} \quad a_1 = 1. \quad (8.34)$$

В действительности, конечно, они могут быть равны этим величинам лишь приближенно. Для проверки значимости отличия величин коэффициентов регрессии от «идеальных» значений рассчитывают доверительные интервалы

$$\Delta a_0 = a_0 \pm t(P, f)s_{a_0}, \quad (8.35)$$

$$\Delta a_1 = a_1 \pm t(P, f)s_{a_1}, \quad (8.36)$$

где  $t$  — коэффициент Стьюдента (см. табл. 6.4);

$P$  — доверительная вероятность;

$f$  — число степеней свободы;

$s_{a_0}$ ,  $s_{a_1}$  — стандартные отклонения  $a_0$  и  $a_1$ , соответственно.

Стандартные отклонения параметров  $a_0$  и  $a_1$  рассчитывают по уравнениям (6.26) и (6.27) (раздел 6.3). Если доверительный интервал  $\Delta a_0$  при заданной доверительной вероятности  $P$  не включает в себя значение 0, то это свидетельствует о наличии постоянной систематической погрешности. Аналогично, если доверительный интервал  $\Delta a_1$  не включает в себя значение 1, то это говорит о наличии пропорциональной систематической погрешности.

В заключение следует проверить *устойчивость* (робастность) методики анализа. Цель такой проверки — убедиться, что на качество результатов анализа не влияют незначительные отклонения от точно прописанной процедуры.

Наиболее надежный способ проверки устойчивости методики — круговые межлабораторные испытания, осуществляемые в процессе внешнего контроля качества. Внутри лаборатории можно проверить методику на устойчивость, изменения в определенных пределах характер выполнения процедуры и параметры эксперимента.

Полностью отработанную и проверенную методику можно использовать в повсеместной аналитической практике, а также для контроля качества. Весь ход выполнения такой методики должен быть точно и строго описан согласно *стандартной форме*. Необходимо указать область применения методики и ее аналитические характеристики — показатели качества результатов.

### Внутренний контроль качества

Внутрилабораторный контроль качества результатов осуществляется путем анализа *контрольных проб*. К ним относятся:

- стандартные растворы;
- холостые пробы;
- искусственные пробы;
- реальные пробы;
- аттестованные стандартные образцы (см. раздел 1.3).

Каждую контрольную пробу анализируют несколько раз.

Удобным средством текущего контроля качества результатов анализа служат *контрольные карты*. Их используют и на производстве — для непрерывного контроля качества продукции или параметров технологического процесса. Общий вид контрольной карты приведен на рис. 8.24.

ОП



Рис. 8.24. Контрольные карты, отображающие изменение контролируемого параметра во времени.

**Таблица 8.8.** Параметры, используемые для контроля качества при помощи контрольных карт. Обозначения:  $N$  — число серий данных,  $n_i$  — число параллельных результатов в  $i$ -й серии,  $n$  — общее число данных,  $x_i$  — результат единичного измерения,  $s_i$  — стандартное отклонение для  $i$ -й серии,  $t$  — коэффициент Стьюдента,  $P$  — доверительная вероятность,  $\alpha = 1 - P$  — уровень значимости,  $f$  — число степеней свободы,  $\bar{x}$  — среднее значение,  $s_m$  — среднее стандартное отклонение,  $\bar{R}$  — средний размах.

	Вычисление	Нижняя граница	Верхняя граница
$\bar{x}$	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$	$\bar{x} - t(P, f) \frac{s}{\sqrt{n}}$	$\bar{x} + t(P, f) \frac{s}{\sqrt{n}}$
$s_m$	$s_m = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (n_i - 1) s_i^2}{\sum_{i=1}^N (n_i - 1)}}$	$s_m \sqrt{\frac{1}{n-1} \chi^2 (n-1, \frac{\alpha}{2})}$	$s_m \sqrt{\frac{1}{n-1} \chi^2 (n-1, 1 - \frac{\alpha}{2})}$
$\bar{R}$	$\bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{i,\max} - x_{i,\min})}{N}$	$D_{\text{u}} \bar{R}$	$D_{\text{b}} \bar{R}$

Точки на контрольной карте отображают значения контролируемого параметра, измеренные через определенные интервалы времени. Контролируемыми параметрами могут быть результаты единичных измерений, средние значения, медианы, величины сигнала контрольного (холостого) опыта, стандартные отклонения, величины размахов в сериях измерений, значения процентной меры правильности. Положение средней горизонтальной прямой соответствует номинальному значению параметра. Сверху и снизу от средней линии проведены еще по две горизонтальные прямые — верхние и нижние границы предупреждения и тревоги (пунктирные и штриховые линии рис. 8.24, соответственно). Их положение определяется природой контролируемого параметра и рассчитывается методами математической статистики (табл. 8.8). Так, если контролируется среднее значение измеряемой величины, то положения границ рассчитывают при помощи  $t$ -коэффициентов Стьюдента. В случае стандартных отклонений используют коэффициенты  $\chi^2$ -распределения (имеются в большинстве сборников статистических таблиц).

Свои статистические коэффициенты — так называемые  $D$ -коэффициенты — используют для величин размахов серий данных (разностей между наибольшим  $x_{i,max}$  и наименьшим  $x_{i,min}$  значением серии).  $D$ -коэффициенты для расчета верхней  $D_{\text{в}}$  и нижней  $D_{\text{н}}$  границ при доверительных вероятностях  $P = 95$  и  $99\%$  приведены в табл. 8.9.

**Таблица 8.9.**  $D$ -коэффициенты для расчета верхней ( $D_{\text{в}}$ ) и нижней ( $D_{\text{н}}$ ) границ для величины размаха.

$n$	$P = 95\% (\alpha = 5\%)$		$P = 99\% (\alpha = 1\%)$	
	$D_{\text{н}}$	$D_{\text{в}}$	$D_{\text{н}}$	$D_{\text{в}}$
2	0,039	2,809	0,008	3,518
3	0,179	2,176	0,080	3,518
4	0,289	1,935	0,166	2,614
5	0,365	1,804	0,239	2,280
6	0,421	1,721	0,296	2,100
7	0,462	1,662	0,341	1,986
8	0,495	1,617	0,378	1,906
9	0,522	1,583	0,408	1,846
10	0,544	1,555	0,434	1,798

Значение  $P = 95\%$  используют для расчета положений границ предупреждения, а  $P = 99\%$  — границ тревоги. Однократное попадание точки вне диапазона границ предупреждения означает необходимость усиления контроля за протеканием процесса. При попадании же точки вне диапазона границ тревоги необходимо немедленное вмешательство: это означает, что процесс вышел из-под контроля.

Детальному описанию системы внутреннего контроля качества посвящены специальные руководства. В них содержатся описания всех необходимых стандартных рабочих процедур и средств контроля, а также сведения об организационных структурах для контроля качества и сферах их компетенции.

### Внешний контроль качества

#### Круговые межлабораторные испытания

Важнейшим средством проверки достоверности результатов химического анализа служат межлабораторные испытания. Их задачами являются:

- стандартизация методик анализа;

- контроль лабораторных результатов анализа;
- аттестация стандартных образцов.

В соответствии с германским стандартом DIN 38402 в межлабораторных испытаниях должны участвовать не менее 8 (а лучше — более 15) лабораторий. В каждой лаборатории выполняют по 4 параллельных анализа одного и того же образца. Внутрилабораторные воспроизводимости результатов характеризуют при помощи величин стандартных отклонений (уравнение (1.6)). Для оценки правильности результатов используют процентную меру правильности (уравнение (1.11)). При этом, если истинное значение неизвестно с требуемой точностью, вместо него используют общее среднее значение для всех лабораторий.

### **Обеспечение единства результатов измерения химических величин (прослеживаемость)**

Необходимо, чтобы результаты химических анализов можно было непосредственно сравнивать между собой подобно результатам измерения физических величин. Возможность сопоставления результатов физических измерений обеспечивается наличием единой системы единиц измерения: длину измеряют в метрах, массу — в килограммах и т.д.

Возможность установить связь между результатами химических измерений по отношению к основной единице измерения количества вещества — молю — называется прослеживаемостью. Основным средством прослеживаемости химических измерений служат аттестованные стандартные образцы, состав которых точно известен. Главная проблема, возникающая при обеспечении единства химических измерений, заключается в ограниченной селективности методик химического анализа. В то время, как при измерении, например, массы не возникает принципиальных трудностей, измерение содержания веществ в матрицах сложного состава (таких, как плазма крови) далеко не всегда приводит к достоверным результатам. Таким образом, проверка (валидация) результатов химических измерений представляет собой значительно более трудную задачу, чем проверка результатов измерения физических величин.

### **Аккредитация аналитических лабораторий**

Процедура официального подтверждения соответствия аналитической лаборатории необходимым требованиям качества называется

аккредитацией. Уровень компетентности лаборатории в выполнении анализов в определенной области проверяют независимые службы, которые в разных странах организованы по-разному. Во многих странах существует централизованная система аккредитации лабораторий. В Германии единая служба аккредитации отсутствует.

Совет Европы предпринимает усилия по унификации национальных систем аккредитации. Разработаны единые критерии качества работы лабораторий, необходимые требования для их аккредитации и сертификации. Соответствующие нормативные документы составляют серию европейских стандартов EN 45000 (табл. 8.10). Ими должны руководствоваться все службы, проводящие аккредитацию.

**Таблица 8.10.** Европейские стандарты серии EN 45000, касающиеся аккредитации химико-аналитических лабораторий.

Европейский стандарт	Содержание
EN 45001	общие критерии деятельности аналитических лабораторий
EN 45002	общие критерии аттестации аналитических лабораторий
EN 45003	общие критерии для органов по аккредитации лабораторий
EN 45011	общие критерии для органов по аттестации продукции
EN 45012	общие критерии для органов по аттестации систем качества

### Основы «Хорошей лабораторной практики» (GLP)

В течение более чем 20 лет действует система нормативов, известная как «Хорошая лабораторная практика» (GLP — англ. Good Laboratory Practice, нем. Gute Laborpraxis). Первоначально она была разработана и введена в действие американским Управлением пищевой и медицинской промышленности (FDA) применительно к производствам, использующим токсичные вещества, с целью устранить имевшиеся несоответствия в нормативной документации. Нормы GLP стали обязательными для всех компаний в США, а впоследствии — и в странах, экспортирующих в США свою продукцию. Затем усилиями Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) эти нормы стали распространяться в международном масштабе. В частности, в Германии требования GLP являются обязательными при разработке любых новых видов химической продукции.

Главная задача GLP — обеспечить возможность полного прослеживания и восстановления всего хода исследования. Контроль качества призваны осуществлять специальные органы, периодически

инспектирующие лаборатории на предмет соблюдения нормативов GLP.

GLP устанавливает очень строгие требования к ведению и хранению документации — значительно более жесткие, чем европейские стандарты серии EN 45000. Сфера применения норм GLP устанавливаются законодательно. В первую очередь это относится к разработке новых химических веществ, получению и использованию токсичных веществ и к здравоохранению.

## 8.5. Литература

### *Раздел 8.1*

H. Hein, W. Kunze, *Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie*, VCH, Weinheim, 1994.

I. L. Marr, M. S. Cresser, L. J. Ottendorfer, *Umweltanalytik — Eine allgemeine Einführung*, Thieme, Stuttgart, 1988.

### *Раздел 8.2*

M. Grasserbauer, H. J. Dudek, M. Ebel, *Angewandte Oberflächenanalyse mit SIMS Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie*, Springer, Berlin, 1985.

### *Раздел 8.3*

H. U. Bergmayer (Hrsg.), *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3. Auflage, VCH, Weinheim, 1974.

E. Knoll, *Radioimmunoassay*, in: *Analytiker-Taschenbuch*, Bd. 8, S.93, Akademie-Verlag, Berlin, 1989.

### *Раздел 8.4*

W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, *Qualitätssicherung in der analytischen chemie*, VCH, Weinheim, 1992.

H. Günzler (Hrsg.), *Akkreditierung und Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*, Springer, Berlin, 1994.

# ГЛАВА 9

## ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В РАЗВИТИИ МЕТОДОВ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Журнал «Analytical Chemistry» (<http://pubs.acs.org/journals/ancham/index.html>), издаваемый Американским химическим обществом (American Chemical Society), один из своих номеров (№ 12) раз в два года целиком посвящает фундаментальным обзорам новейших достижений в области аналитической химии. Такие обзоры дают достаточно адекватное представление о современном состоянии аналитической химии, тех ее областях и методах, в которых достигнут (или ожидается) наиболее существенный прорыв. Предлагаем Вашему вниманию краткий «обзор обзоров», опубликованных в № 12 журнала «Analytical Chemistry» за 2000 и 2002 г. Мы включили в него лишь наиболее значимые темы — те методы, которые упоминаются в обоих этих номерах. Оценки и выводы отражают точку зрения авторов соответствующих обзорных статей.

### 9.1. Плоскостная хроматография

Хроматография, в настоящее время являясь самым распространенным и наиболее часто используемым методом химического анализа, продолжает интенсивно развиваться. Одним из хроматографических методов, в которых в последние годы отмечен существенный прогресс, является плоскостная, в первую очередь, тонкослойная, хроматография (ТСХ).

Тонкослойная хроматография — уникальный хроматографический метод, сочетающий в себе множество разных качеств и возможностей. С одной стороны, это предельно простой, дешевый и производительный метод обзорного качественного анализа сложных смесей. С другой стороны, ТСХ в ее современном воплощении стала высокоэффективным методом количественного анализа. Роль ТСХ становится особенно важной в связи с бурным развитием идеологии массового параллельного синтеза органических веществ (в первую очередь — новых лекарственных препаратов), известной

как «комбинаторная химия». Результатом комбинаторного синтеза является сложная смесь близко родственных по своей структуре веществ, для экспресс-анализа которой метод ТСХ, в настоящее время позволяющий разделять до нескольких десятков компонентов, является едва ли не оптимальным. Комбинаторный синтез часто проводят на частицах твердого носителя. В последнее время отмечены удачные попытки проведения такого синтеза непосредственно на частицах носителя, закрепленного на хроматографической пластине. При этом для ускорения реакции вместо традиционного нагревания использован метод нетермического, микроволнового, воздействия. Таким образом, пластина для ТСХ становится одновременно инструментом и для синтеза веществ, и для их разделения.

Для количественного анализа методом ТСХ в настоящее время широко используются различные устройства, обеспечивающие принудительное равномерное движение подвижной фазы за счет гидродинамических сил или электроосмотического потока. Начато использование в ТСХ градиентного элюирования — инструмента, традиционного для колоночной хроматографии, который позволяет как повысить эффективность разделения, так и сократить время анализа. Применение градиентного элюирования позволяет анализировать методом ТСХ смеси, состоящие из 30–40 компонентов.

Отмечен прогресс в области создания новых подвижных и неподвижных фаз для ТСХ, оптимизации их состава (для этого широко используются методы математического планирования эксперимента). Круг неподвижных фаз для ТСХ, долгое время сводившийся почти исключительно к тем или иным разновидностям силикагеля или оксида алюминия, в настоящее время стал почти столь же широким, как и круг неподвижных фаз для колоночной хроматографии. В частности, он включает в себя химически модифицированные кремнеземы — гидрофобизированные (для обращенно-фазовой ТСХ), с разнообразными функциональными группами, в том числе хиральными.

Развиваются и способы детектирования в ТСХ. Наряду с традиционными фотометрическим (в отраженном или проходящем свете) и флуориметрическим методами возрастающую роль начинают играть масс-спектрометрические методы детектирования — главным образом с лазерной десорбцией-ионизацией (MALDI). Для фотометрического детектирования все больше используется сканирующая лазерная денситометрия, в том числе с применением оптоволоконной техники.

Основными сферами применения ТСХ являются анализ лекарственных препаратов, реакционных смесей органического синтеза и биологических образцов. Важным достоинством ТСХ по сравнению со значительно более дорогостоящей колоночной хроматографией является возможность анализа загрязненных проб и, таким образом, резкое упрощение пробоподготовки при анализе реальных, в первую очередь природных, объектов.

## 9.2. Сверхкритическая флюидная хроматография

В настоящее время сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) находится на том этапе своего развития, когда роль фундаментальных исследований уже снижается, а роль практического применения — резко возрастает. Наибольший рост использования СФХ отмечен в области анализа лекарственных средств и полупродуктов их синтеза (методами комбинаторной химии). В сумме методами СФХ и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в настоящее время выполняется около  $\frac{3}{4}$  всех анализов такого рода объектов. При этом обращенно-фазовая ВЭЖХ и СФХ удачно дополняют друг друга. Механизм удерживания в СФХ близок к механизму удерживания в нормально-фазовой ВЭЖХ. Поэтому метод СФХ очень удобен для определения относительно неполярных органических веществ, традиционно определяемых нормально-фазовой ВЭЖХ (для определения полярных веществ основным методом по-прежнему остается обращенно-фазовая ВЭЖХ). В то же время аппаратура для СФХ значительно дешевле, чем для ВЭЖХ, а время анализа — существенно меньше. Кроме того, процесс разделения в методе СФХ гораздо менее чувствителен к наличию в подвижной и неподвижной фазах следов воды, чем в методе нормально-фазовой ВЭЖХ, поэтому результаты получаются значительно более воспроизводимыми. Все это вместе взятое позволяет предполагать, что уже в ближайшем будущем СФХ станет едва ли не основным методом решения тех аналитических задач, которые традиционно решаются при помощи нормально-фазовой ВЭЖХ. Одна из важнейших задач такого рода — разделение и определение оптических изомеров, имеющая большое значение для анализа и контроля чистоты лекарственных препаратов и других физиологически активных веществ.

К сверхкритической флюидной хроматографии тесно примыкают новые направления ВЭЖХ, получившие развитие в последние го-



ды, — ВЭЖХ при сверхвысоких температурах и давлениях. В основе тех и других методов лежит весьма сходная идеология, основанная на использовании температуры и давления как одного из основных средств оптимизации процесса разделения, а также уменьшении вязкости подвижной фазы для увеличения скорости ее потока и сокращения времени анализа. Для обобщенного наименования СФХ и ВЭЖХ при сверхвысоких температурах и давлениях предложен английский термин «unified chromatography».

Использование сверхвысоких температур открывает в ВЭЖХ совершенно новые возможности. Так, смесь алкилфенолов при сверхвысоких температурах удалось разделить в 50 раз быстрее, чем в традиционном варианте ВЭЖХ. Намечаются большие перспективы использования в качестве подвижной фазы перегретой (до 190°C) воды вместо обычных для обращенно-фазовой ВЭЖХ водно-органических смесей. Исключение органического растворителя из состава подвижной фазы позволяет, в частности, широко использовать для детектирования метод ЯМР  $^1\text{H}$ . Для этого достаточно применять в качестве подвижной фазы относительно дешевую тяжелую воду  $\text{D}_2\text{O}$ , не дающую собственного сигнала ЯМР, в то время как в традиционной ВЭЖХ ее необходимо было бы использовать в смеси с чрезвычайно дорогими дейтерированными органическими растворителями.

Основными компонентами, определяемыми при помощи СФХ, как уже отмечалось, являются относительно неполярные органические вещества. Это липиды, жирорастворимые витамины, алкалоиды и терпеноиды растительного происхождения, металлоорганические соединения, компоненты горюче-смазочных материалов, многие лекарственные препараты, продукты комбинаторного синтеза.

### 9.3. Жидкостная хроматография

В традиционной высокоеффективной жидкостной колоночной хроматографии наибольший прогресс отмечается, главным образом, в сфере аналитического оборудования. Основными тенденциями здесь являются миниатюризация, сокращение времени анализа, ориентация на биологические приложения (в том числе уже неоднократно упоминавшуюся здесь комбинаторную химию), повышение производительности анализа. Все шире используются микроколонки, позволяющие оперировать с объемами пробы менее 1 мкл. Для их изготовления применяют технологии, аналогичные технологиям производства микрочипов.



Одно из важных направлений совершенствования жидкостной колоночной хроматографии — развитие дву- и многомерных методов, давно используемых в плоскостном (тонкослойном) варианте. Суть двумерной ТСХ состоит в том, что хроматографическую пластиинку после элюирования поворачивают на  $90^\circ$  и повторно элюируют в перпендикулярном направлении с использованием другой подвижной фазы. При этом могут разделиться компоненты, не разделившиеся на первой стадии процесса.

В колоночной хроматографии реализация подобного приема сопряжена со значительными техническими проблемами, поэтому двумерная колоночная хроматография появилась значительно позже тонкослойной и только сейчас, по существу, начинает активно развиваться. Для осуществления двумерной колоночной хроматографии используют две последовательно соединенные колонки, различающиеся природой неподвижной фазы (например, одна — нормальная, другая — обращенная). При этом режимы хроматографирования устанавливают таким образом, чтобы время разделения на второй колонке было значительно меньше, чем на первой. Между колонками находится промежуточный детектор и устройство переключения потока, позволяющее сразу же при появлении на выходе из первой колонки очередного пика направлять поток элюата на вторую колонку. Преимущества двумерной хроматографии перед одномерной — резкое возрастание максимально возможного числа разрешенных пиков (если для первой колонки это число равно  $n_1$ , а для второй —  $n_2$ , то в двумерном варианте теоретический предел составляет  $n_1 n_2$  разрешенных пиков). Применение двумерной жидкостной хроматографии (в сочетании с масс-спектрометрическим детектированием, предоставляющим дополнительные возможности раздельной регистрации компонентов сложных смесей) позволило обнаружить в продуктах частичного ферментативного разложения цитозольных белков дрожжей более 100 000 различных полипептидов в диапазоне концентраций, различающихся на три порядка.

Еще одно направление развития жидкостной колоночной хроматографии — использование электрокинетических сил для осуществления потока подвижной фазы (электрокапиллярная хроматография). При этом достигается удачное сочетание высокой селективности хроматографических методов с высокой эффективностью и большими возможностями в плане миниатюризации, присущими капиллярному электрофорезу.

Ведутся исследования по созданию и применению в жидкостной хроматографии неподвижных фаз совершенно новых типов. К ним

относятся неподвижные фазы на основе полимерных матриц с молекулярными отпечатками (специально синтезируемых материалов с порами, размеры, форма и строение которых являются оптимальными для сорбции тех или иных веществ или классов веществ), а также неподвижные фазы с перестраиваемыми свойствами. Примером последних могут служить электропроводящие полимеры, свойства которых (в том числе хроматографические) можно плавно изменять, регулируя значение приложенного к ним электрического потенциала.

## 9.4. Газовая хроматография

Газовая хроматография давно уже стала рутинным, повсеместно применяемым методом анализа. Вполне естественно, что большинство публикаций последнего времени в этой области посвящено не разработке основ метода, а его применению для решения конкретных практических задач. Среди фундаментальных работ можно отметить резко возросшее число статей по многомерной газовой хроматографии, технически реализуемой так же, как и многомерная жидкостная хроматография. Большие усилия направлены на сокращение времени анализа. Разумеется, оборотной стороной сокращения времени хроматографического анализа является уменьшение эффективности разделения (наиболее «быстрые» современные хроматографы могут разрешить лишь порядка 10 пиков), однако существует большой круг практических задач, в первую очередь экологических, для которых решающей аналитической характеристикой является именно время анализа. Помимо традиционных приемов, используемых для ускорения хроматографического анализа (уменьшение размеров колонки, увеличение скорости потока подвижной фазы — газа-носителя) в последнее время стали использовать и такое средство, как высокоскоростной режим программирования температуры (до  $250^{\circ}\text{C}/\text{с}$ ). В некоторых случаях это позволило дополнительно сократить время анализа на порядок.

К задаче создания высокоскоростных газовых хроматографов тесно примыкает задача создания небольших портативных газовых хроматографов, пригодных, в том числе, для работы в полевых условиях (обе проблемы часто решаются сходными техническими средствами). В этом отношении перспективным представляется отказ от применения специальных газов-носителей, хранимых и транспортируемых в баллонах под высоким давлением, и использование взамен атмосферного воздуха при атмосферном давлении. Поток

подвижной фазы в этом случае осуществляется при помощи вакуумного насоса, устанавливаемого на выходе из колонки.

## 9.5. Атомная спектроскопия

Среди различных методов атомно-спектроскопического (и шире, элементного) анализа наибольший прогресс отмечен в области атомно-эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии с индуктивно связанный плазмой (ИСП МС).

В атомно-эмиссионной спектроскопии наблюдается тенденция к возрастанию роли тлеющего разряда как источника атомизации (особенно при анализе проводящих материалов). Важное значение тлеющего разряда заключается в возможности его использования для проведения распределительного (послойного) анализа материалов. Достигнутые к настоящему времени разрешение по глубине и чувствительность уже вполне сравнимы с характеристиками метода масс-спектрометрии вторичных ионов, традиционно используемого для решения подобных задач. Снизив мощность тлеющего разряда, можно осуществить испарение образца без его атомизации и, следовательно, использовать тлеющий разряд в молекулярном масс-спектрометрическом анализе. Таким образом, тлеющий разряд является перестраиваемым источником «двойного назначения», пригодным для использования как в атомном, так и в молекулярном анализе. Для локального пробоотбора и атомизации широко используются и лазеры (способ лазерной абляции). При этом в атомно-абсорбционной спектроскопии лазер может служить и источником внешнего излучения.

Другая важная тенденция — разработка и применение так называемых «тандемных источников», в которых функции атомизации пробы и возбуждения (в атомно-эмиссионной спектроскопии) или ионизации атомов (в масс-спектрометрии), обычно сочетаемые в одном устройстве, распределены между разными узлами прибора. Примером может служить объединение тлеющего разряда, используемого в качестве атомизатора, и микроволновой плазмы для возбуждения или ионизации полученных атомов. Такое разделение функций позволяет использовать режим работы каждого узла прибора, оптимальный для решения именно данной задачи, и в конечном счете приводит к заметному увеличению чувствительности, а во многих случаях — и селективности определения.

В масс-спектрометрии с индуктивно связанный плазмой, ставшей к настоящему времени основным видом элементного масс-спектро-

метрического анализа, отмечаются разнообразные усовершенствования аппаратуры, в первую очередь — масс-анализаторов. Наряду с традиционными квадрупольными анализаторами все шире используются быстродействующие времяпролетные, а также различные варианты многоканальных анализаторов. Применение многоканального способа регистрации, позволяющего одновременно в одинаковых условиях регистрировать ионные токи нескольких ионов, резко увеличивает точность результатов при использовании способа внутреннего стандарта, а также позволяет с высокой точностью измерить соотношение концентраций изотопов одного и того же элемента (изотопное отношение). Последнее особенно важно для многих геологических (в первую очередь — геохронологических) исследований. Еще один сравнительно новый для ИСП МС тип масс-анализаторов — секторные магнитные анализаторы, используемые обычно в молекулярной масс-спектрометрии. Они характеризуются высоким разрешением (описано использование в ИСП МС анализаторов с разрешением до 8000) и позволяют разделить изобарические ионные пики — пики, принадлежащие изотопам различных элементов с приблизительно одинаковой (с точностью до целого числа атомных единиц) массой. Наличие таких изотопов может сильно осложнить определение содержания отдельных элементов при использовании масс-анализаторов низкого разрешения.

Возрастает число работ, посвященных применению в элементной масс-спектрометрии буферных газов и газов-реагентов — обычно водорода или гелия. Для этого используют специальное устройство, — так называемую реакционную камеру, помещаемую между источником ионизации и масс-анализатором. При этом значительно уменьшаются интенсивности сигналов фона, формируемых самой аргоновой плазмой (ионов  $\text{Ar}^+$ ,  $\text{ArO}^+$ ,  $\text{Ar}_2^+$  и др.) и, соответственно, снижаются пределы обнаружения элементов. Этот прием до некоторой степени аналогичен химической ионизации, широко используемой в молекулярном масс-спектрометрическом анализе (хотя там он решает совсем другие задачи).

## 9.6. Оптоволоконные химические сенсоры и биосенсоры

В настоящее время широко применяются оптические химические и биохимические сенсоры всех трех поколений: первого, основанные на простом измерении какого-либо оптического свойства объекта,

второго (индикаторные), использующие предварительное проведение химической реакции с иммобилизованным реагентом-индикатором, и третьего, в основе действия которых лежат новые физические явления, обычно не используемые в химическом анализе в отрыве от сенсоров.

Важнейшим элементом оптического сенсора любого типа, во многом определяющим его возможности, является оптоволоконный кабель-световод. Наряду с традиционными, прозрачными в видимой и (частично) ближней ИК-области, в последнее время начинают все шире применяться световоды для средней ИК-области на основе новых оптических материалов — халькогенидных и других неоксидных стекол. Используются и пучки световодов — для решения двух основных задач: получения оптических образов объектов и преодоления одного из основных недостатков оптических сенсоров — малой селективности. По-видимому, создание индивидуальных химических оптических сенсоров высокой селективности является слишком трудной задачей, которая вряд ли будет решена в ближайшее время. Альтернативой может быть использование массива малоселективных сенсоров с последующей обработкой данных известными хемометрическими методами многокомпонентного анализа.

В отличие от химических, биохимические сенсоры часто обладают исключительно высокой селективностью, обусловленной природой лежащих в основе их действия ферментативных и иммунохимических реакций. В качестве чувствительных элементов таких сенсоров сейчас используются не только иммобилизованные ферменты и антитела, но и цельные клетки микроорганизмов, например, синезеленой водоросли *Chlorella vulgaris* для определения гербицидов (по их воздействию на процесс фотосинтеза). Предел обнаружения таких сенсоров составляет 0,1 мкг индивидуального пестицида в 1 л, что соответствует требованиям ЕС.

Исходно при использовании оптических биосенсоров чаще всего применяли люминесцентный (фото- или хемилюминесцентный) метод детектирования. Однако его использование, как правило, требует предварительного введения люминесцентной метки в молекулы вещества, используемого в чувствительном элементе сенсора. Это далеко не всегда является простой задачей. В настоящее время все большую популярность завоевывает новый метод детектирования, основанный на использовании поверхностного плазмонного резонанса. Поверхностный плазмонный резонанс — оптическое явление, имеющее квантовомеханическую природу. Оно заключается в том,

что при облучении зеркальной поверхности проводника (обычно металла) лучом света под строго определенным углом интенсивность отраженного света резко падает вследствие резонансного поглощения света электронами проводимости приповерхностного слоя проводника. Угол падения светового луча, при котором наблюдается поверхностный плазмонный резонанс, сильно зависит от показателя преломления среды, прилегающей к поверхности металла. Поэтому измерение угла поверхностного плазмонного резонанса можно рассматривать как своеобразный вариант весьма прецизионной рефрактометрии (возможно зафиксировать изменение показателя преломления на  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  единиц). Сочетание высокой селективности, характерной для биохимических реакций, с универсальностью, присущей рефрактометрическому способу детектирования, делает биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса очень перспективным средством экспресс-контроля биологически активных веществ.

## 9.7. Твердофазная спектроскопия ЯМР

Традиционными объектами исследования в спектроскопии ЯМР являются жидкости и растворы. Однако в последнее время существует устойчивый интерес к применению этого метода для анализа твердых тел. Особенности спектроскопии ЯМР твердых тел обусловлены наличием в твердых телах сильных диполь–дипольных взаимодействий, приводящих к значительному уширению спектральных линий. Для получения спектров ЯМР твердых тел высокого разрешения (с почти столь же узкими линиями, как для жидкостей) применяют специальные приемы, в первую очередь — очень быстрое вращение образца под строго определенным, называемым магнитическим, углом к вектору напряженности внешнего магнитного поля.

Твердофазная спектроскопия ЯМР используется как метод исследования структуры твердых тел — в первую очередь с нечетко выраженной кристаллической структурой, к которым неприменимы традиционные методы рентгеноструктурного анализа. Важнейшими объектами исследования являются цеолиты и катализаторы на их основе (метод используется с целью изучения как структуры самих цеолитов, так и физико-химического состояния сорбированных на них веществ) и синтетические полимеры (изучение процессов старения, модификации). Отмечен рост числа публикаций по использованию этого метода для изучения природных полимеров



биологического происхождения, в том числе гумусовых веществ. Надо сказать, что спектры ЯМР полимеров, как правило, отличаются чрезвычайной сложностью, затрудняющей их интерпретацию.

## 9.8. Рентгеновская спектроскопия

Использование явления полного отражения произвело настоящую революцию в методах рентгеновской спектроскопии, повысив их чувствительность на много порядков. Сейчас рентгенофлуоресцентная спектроскопия с полным отражением становится повседневным методом определения следов элементов в жидких образцах и анализа приповерхностных слоев твердых тел. В последние годы разработан родственный метод, называемый малоугловой рентгеновской спектроскопией (англ. grazing-exit X-ray spectrometry), обладающий, по-видимому, значительными потенциальными возможностями.

Дальнейшее развитие этого метода во многом будет определяться успехами в разработке новых детекторов рентгеновского излучения. В настоящее время все большее значение приобретает энергодисперсионный способ регистрации рентгеновского излучения. Для этого необходимы детекторы с большим разрешением и высоким квантовым выходом — особенно при определении легких элементов. Самыми совершенными в этом отношении представляются детекторы нового типа — со сверхпроводящим тунNELьным переходом (superconductive tunnel junction, STJ). Они обладают высокой скоростью счета, а их разрешающая способность сравнима с разрешающей способностью традиционных анализаторов с волновой дисперсией. Необходимо также создание детекторов-анализаторов с энергетической дисперсией, способных работать при относительно высоких температурах (без охлаждения сжиженными газами) и устойчивых к сильному рентгеновскому излучению.

В методе рентгенофлуоресцентного анализа все шире применяются устройства для фокусировки рентгеновского излучения (капиллярные рентгеновские линзы). Уже достигнута возможность фокусировать первичное рентгеновское излучение на участке образца диаметром до 5–10 мкм. Латеральное разрешение в этом случае составляет около 100 мкм. Таким образом, открываются возможности применения для локального анализа не только традиционно используемой для этого рентгеноэмиссионной (электронно-зондовой), но и рентгенофлуоресцентной спектроскопии. Кроме того, фокусирование рентгеновского излучения резко повышает его удельную ин-

тенсивность (на единицу поверхности) и, следовательно, чувствительность определения элементов. Это особенно важно при определении легких элементов, обладающих малыми выходами рентгеновской флуоресценции и низкоэнергетическим, сильно поглощающимся окружающей средой характеристическим рентгеновским излучением.

В методе рентгеноэмиссионного анализа проблема определения легких элементов стоит, пожалуй, еще более остро, чем в рентгенофлуоресцентной спектроскопии. В последнее время этот метод стал важным средством экологического контроля — едва ли не основным методом анализа аэрозольных частиц воздуха, в значительной степени состоящих как раз из легких элементов (C, N, O). Другая важная проблема рентгеноэмиссионной спектроскопии — повышение правильности результатов анализа. В силу крайне малых размеров участка анализируемой поверхности ее пространственные неоднородности могут сильно искажать количественные результаты определения элементов. Для учета этих факторов проводятся интенсивные теоретические исследования, главным образом методом статистического моделирования (Монте-Карло).

## 9.9. Термические методы анализа

В отличие от большинства других методов химического анализа, направленных главным образом на установление состава веществ и материалов, методы термического анализа — это методы изучения их свойств и определения фундаментальных параметров: энталпий, теплоемкостей, температур фазовых переходов. Среди различных методов термического анализа наибольшее применение находит дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Недавно описан способ, позволяющий получать информацию, обычно получаемую методом ДСК, посредством сочетания двух других методов термического анализа — термогравиметрии и дифференциального термического анализа.

Методы термического анализа непрерывно совершенствуются, повышается их прецизионность и чувствительность. Сейчас стало возможным изучать фазовые переходы и другие тепловые явления с невиданной ранее степенью детализации. Так, для монокристалла  $\text{BaTiO}_3$ , претерпевающего в области 403 К переход структуры кристаллической решетки из тетрагональной в кубическую, в диапазоне 1 К — от 402 до 403 К — зафиксировано шесть отдельных

тепловых явлений. Для ультрамалых твердых частиц обнаружена сильная зависимость их температуры плавления от размера. Для частиц индия радиусом порядка 2 нм температура плавления снижается на 110 К по сравнению с макроскопическими образцами. Подобные исследования становятся чрезвычайно важными в связи с бурным развитием нанотехнологий.

Как и ранее, по-прежнему важны термические методы анализа при исследовании таких объектов, как керамики, катализаторы, стекла. Эти методы позволяют изучать протекание твердофазных реакций, ответственных за образование новых материалов. Другой важнейший круг объектов термического анализа — синтетические полимеры. Термическими методами можно исследовать процессы плавления, кристаллизации, стеклования, старения (деградации) полимеров. Здесь основная проблема состоит в том, что многие процессы с участием полимеров протекают достаточно медленно, и потому наблюдаемые эффекты сильно зависят от скорости нагревания, характеристик температурной модуляции и других параметров эксперимента. Еще одна сфера применения термических методов — исследование топливных материалов и высокоэнергетических, в том числе взрывчатых, веществ. Среди относительно новых областей использования можно отметить биологию и медицину. Это, в частности, исследование термическими методами лекарственных препаратов и особенно готовых форм, которые в зависимости от их состава и способа приготовления могут обладать весьма различными физическими характеристиками и, следовательно, биологической усвояемостью. Кроме того, изучение тепловых эффектов — важный неразрушающий метод исследования кинетики метаболических процессов в живых клетках.

## 9.10. Хемометрика

Хемометрика представляет собой универсальный инструмент, позволяющий извлекать из химических данных большого объема и сложной структуры скрытую в них информацию. Как и прежде, одно из важнейших направлений хемометрики — создание и применение математических методов анализа многокомпонентных систем в условиях наложения аналитических сигналов (включая и многомерную градуировку) или, говоря несколько условно, разделение сигналов вместо разделения веществ. При этом один и тот же алгоритм (с соответствующими изменениями) может быть применен, к приме-

ру, как для разделения перекрывающихся хроматографических или вольтамперометрических пиков, так и спектральных полос. В последнее время для решения подобных задач все больше используются методы так называемого «мягкого моделирования» (эволюционный и оконный факторный анализ, метод чередующихся наименьших квадратов и др.), позволяющие работать в условиях сильного дефицита информации об индивидуальных компонентах. Одним из методов анализа, где математическое разделение сигналов нашло особенно широкое применение, стала инфракрасная спектроскопия в ближней области спектра, бурно прогрессирующая в последние годы.

Еще одно важное направление развития современной хемометрики — построение и распознавание образов химических объектов, иными словами, их автоматическая классификация. В последнее время большее внимание стало уделяться первой, особенно трудно формализуемой, части этой задачи — отбору как можно более информативных признаков для построения наиболее эффективных классификационных моделей. Для этой цели используют методы и алгоритмы, традиционно используемые для решения других хемометрических задач, например, анализ главных компонент или дробный метод наименьших квадратов. Как методы многокомпонентного анализа, так и методы распознавания образов находят все большее применение в сферах, связанных с использованием химических сенсоров.

К проблемам, связанным с построением и распознаванием химических образов, тесно примыкает круг задач, связанных с установлением количественных соотношений между составом (или строением) и свойствами химических веществ, а также предсказания свойств по данным о составе и строению. Они имеют огромное значение для создания новых лекарственных средств, веществ и материалов с заданными свойствами. Как правило, для решения подобных задач применяют современные методы многомерного регрессионного анализа — такие, как регрессия на главных компонентах, дробный метод наименьших квадратов, а также методы с использованием обучаемых нейронных сетей. Здесь также отмечено повышенное внимание к проблеме отбора исходных признаков, служащих для количественного описания состава и особенно строения (молекулярных дескрипторов).

Таблица П.1. Величины  $pK_S$  некоторых кислот при 25°C.

Кислота	$pK_{S1}$	$pK_{S2}$	$pK_{S3}$	$pK_{S4}$
$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$	4,85			
$\text{Al}(\text{OH})_3$	12,2			
$\text{H}_3\text{AsO}_3$	9,20	13,50		
$\text{H}_3\text{AsO}_4$	2,22	6,98	11,53	
$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20°C)	9,28	12,75	13,80	
$\text{H}_2\text{B}_4\text{O}_7$	4,00	9,00		
HBr	-6			
HBrO	8,60			
Бромкрезоловый зеленый	4,68			
Бромкрезоловый пурпурный	6,30			
п-Бромфенол	9,24			
Бромфеноловый синий	3,86			
Бромтимоловый синий	7,10			
$\text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6,35	10,25		
HCOOH	3,75			
$\text{CH}_3\text{COOH}$	4,75			
$\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$	4,87			
$\text{CH}_2\text{FCOOH}$	2,57			
$\text{CH}_2\text{ClOOH}$	2,87			
$\text{CHCl}_2\text{COOH}$	1,29			
$\text{CCl}_3\text{COOH}$	-0,08			
$\text{CH}_2\text{BrCOOH}$ (20°C)	2,89			
$\text{CH}_2\text{ICOOH}$ (20°C)	3,16			
$\text{CH}_2\text{CNCOOH}$	2,47			
$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	4,19			
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{COOH}$	4,31			
Фенол	9,89			
Феноловый красный	7,90			
Фенолфталеин	9,4			
1,10-Фенантролин- $\text{H}^+$	9,40			
Крезоловый пурпурный	1,51	8,32		
Крезоловый красный	8,20			

## Продолжение таб. П.1.

Тимоловый синий	8, 90
Тимолфталеин	10, 0
Щавелевая кислота	1, 25 4, 28
Янтарная кислота	4, 19 5, 48
Винная кислота	3, 04 4, 37
Фталевая кислота	2, 95 5, 41
Лимонная кислота	2, 94 4, 14 5, 82
Аскорбиновая кислота	4, 30 11, 82
Салициловая кислота	3, 00 12, 38
Глицин·H <sup>+</sup>	2, 35 9, 77
N-трис(оксиметил)метилглицин	8, 08
Цистеин·H <sup>+</sup>	1, 96 8, 36 10, 28
Цистин·2H <sup>+</sup>	1, 04 2, 05 8, 00
ЭДТА	2, 07 2, 75 6, 24 10, 34
Гидрохинон	10, 0 12, 0
8-Оксихинолин·H <sup>+</sup>	5, 01 9, 90
Метиловый оранжевый	3, 40
Метиловый красный	4, 95
Ванилин	7, 40
HCN	9, 32
HO CN	3, 66
HSCN	0, 85
HCl	-3
HClO	7, 53
HClO <sub>2</sub>	2, 00
HClO <sub>3</sub>	0
HClO <sub>4</sub>	-9
Хлорфеноловый красный	6, 00
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> ·H <sub>2</sub> O (HCrO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	6, 50
HF	3, 17
Fe(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> <sup>3+</sup>	2, 22
H <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	2, 22 4, 17
HI	-8
HIO	12, 3
HIO <sub>3</sub>	0, 79
H <sub>5</sub> IO <sub>6</sub>	1, 64
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	9, 25



## Продолжение таб. П.1.

$\text{CH}_3\text{NH}_3^+$	10, 64				
$(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+$	10, 99				
$(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$	9, 83				
$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}_2^+$	10, 59				
$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{NH}^+$	10, 75				
$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+$	4, 54				
Пиридин· $\text{H}^+$	5, 10				
Имидазол· $\text{H}^+$	6, 83				
$\text{H}_3\text{N}-\text{NH}_3^{2+}$	0, 27	7, 24			
$\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^{2+}$	6, 85	9, 93			
$(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})\text{NH}_3^+$	9, 50				
$(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_3\text{NH}^+$	7, 76				
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	10, 63				
Триаминопропан· $3\text{H}^+$	3, 72	7, 95	9, 59		
Трис(оксиметил)аминометан	8, 08				
$\text{HN}_3$	4, 72				
Веронал	7, 43				
$\text{HNO}_3$	-1, 32				
$\text{H}_2\text{O}_2$ (20°C)	11, 65				
$\text{PH}_4^+$	0				
$\text{H}_3\text{PO}_2$ (18°C)	2, 00				
$\text{H}_3\text{PO}_3$ (18°C)	1, 8	6, 16			
$\text{H}_3\text{PO}_4$	2, 23	7, 21	12, 32		
$\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$	1, 52	2, 36	6, 60	9, 25	
$\text{H}_2\text{S}$	7, 00	12, 92			
$\text{H}_2\text{SO}_3$	1, 76	7, 20			
$\text{H}_2\text{SO}_4$	-3	1, 99			
$\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$	0, 99				
N-2-Оксизтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота	7, 55				
2-(N-морфолин)этансульфокислота	6, 15				
$\text{H}_2\text{Se}$	3, 89	11, 00			
$\text{H}_2\text{SeO}_3$	2, 54	8, 02			
$\text{H}_2\text{SeO}_4$	-3	2, 00			
$\text{H}_4\text{SiO}_4$ (30°C)	9, 70	11, 70	12	12	
$\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$	9, 60				

Таблица П.2. Изменение окраски, интервалы pH перехода и способы приготовления растворов некоторых индикаторов.

Индикатор	pH пе- рехода	Изменение окраски (кислая–основная форма)	Растворять (г/100 мл)
Метиловый фиолето- вый, 1 ступень	0,1 – 1,5	желтая – синяя	0,05
Крезоловый красный, 1 ступень	0,2 – 1,8	красная – желтая	0,04
м-Крезоловый пурпур- ный, 1 ступень	1,2 – 2,8	красная – желтая	0,04 90% A
Тимоловый синий, 1 ступень	1,2 – 2,8	желтая – красная	0,1 20% A
Тропеолин 00	1,3 – 3,2	красная – желтая	1,0 W
Метиловый фиолето- вый, 2 ступень	1,5 – 3,2	синяя – фиолетовая	0,05 W
2,4-Динитрофенол	2,6 – 4,0	бесцветная – желтая	0,05 W
Диметиловый желтый	2,9 – 4,0	красная – желтая	0,1 A
Бромфеноловый синий	3,0 – 4,6	желтая – синяя	0,04 A
Метиловый оранжевый	3,0 – 4,4	красная – оранжевая	0,1 W
Конго красный	3,0 – 5,2	синяя – красная	0,1 W
α-Нафтоловый красный	3,7 – 5,7	фиолетовая – желтая	0,1 70% A
2,5-Динитрофенол	3,8 – 5,2	бесцветная – желтая	
Бромкрезоловый зеленый	3,8 – 5,4	желтая – синяя	0,04 90% A
Метиловый красный	4,4 – 6,2	красная – желтая	0,2 60% A
Бромкрезоловый пурпурный	5,2 – 6,8	желтая – пурпурная	0,04 90% A
Лакмус	5,0 – 8,0	красная – синяя	0,1 W
Бромтимоловый синий	6,0 – 7,6	желтая – синяя	0,1 20% A
4-Нитрофенол	6,0 – 8,0	бесцветная – желтая	
Нейтральный красный	6,8 – 8,0	красная – желтая	0,1 60% A
Розовая кислота	6,8 – 8,0	оранжевая – фиолетовая	0,5 90% A
Крезоловый красный, 2 ступень	7,2 – 8,8	красная – желтая	0,04 W
α-Нафтольфталеин	7,3 – 8,7	розовая – зеленая	0,1 70% A
м-Крезоловый пурпур- ный, 2 ступень	7,4 – 9,0	желтая – пурпурная	0,04 W
3-Нитрофенол	7,0 – 9,0	бесцветная – желтая	
Тимоловый синий, 2 ступень	8,0 – 9,6	желтая – синяя	0,1 20% A

## Продолжение таб. П.2.

Фенолфталеин	8, 2 – 10, 0	бесцветная – красная	0, 1	70%	A
Тимолфталеин	9, 4 – 10, 6	бесцветная – синяя	0, 04	90%	A
$\beta$ -Нафтоловый	10, 0 – 12, 0	оранжевая – фиолетовая	0, 04		W
Ализариновый желтый	10, 0 – 12, 1	желтая – оранжевая	0, 1		W
Ланациловый фиолетовый	11, 0 – 13, 0	фиолетовая – оранжевая	0, 1		W

Примечание. A — этанол, W — вода.

Таблица П.3. Смешанные индикаторы для кислотно-основного титрования.

Состав смеси		Изменение окраски, интервал pH
I	метиловый оранжевый (100 мг в 100 мл воды) + индигосульфонат натрия (500 мг в 50 мл воды)	3, 0 – 4, 0 – 4, 4 фиолетовая – серая – зеленая
II	метиловый красный (125 мг в 50 мл метанола) + метиленовый голубой (85 мг в 50 мл метанола) (индикатор Таширо)	4, 4 – 5, 2 – 6, 2 фиолетовая – серая – зеленая
III	нейтральный красный (100 мг в 100 мл 70% этанола) + метиленовый голубой (100 мг в 100 мл 70% этанола)	6, 8 – 7, 2 – 8, 0 фиолетовая – серая – зеленая
IV	фенолфталеин (100 мг в 100 мл 70% этанола) + $\alpha$ -нафтольфталеин (50 мг в 50 мл 70% этанола)	7, 5 – 8, 6 – 9, 8 розовая – зеленая – фиолетовая

Таблица П.4. Значения  $pK_L$  малорастворимых электролитов. В скобках — температура,  $^{\circ}\text{C}$  (если не указана —  $25^{\circ}\text{C}$ ).

Соединение	$pK_L$	Соединение	$pK_L$	Соединение	$pK_L$
AgCl	9, 75	Ce(IO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	9, 5	Mn(OH) <sub>2</sub>	14, 2
AgCl (50)	8, 88	Ce <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	28, 4	MnCO <sub>3</sub>	10, 1
AgBr	12, 28	Co(OH) <sub>2</sub>	16	MnS (зеленый)	12, 6
AgI	16, 08	CoCO <sub>3</sub>	12, 0	MnS (розовый)	9, 6
AgCN	14, 2	CoS	22, 1	MnS	15
AgSCN	12, 0		(22–26)	NaHCO <sub>3</sub>	2, 9
AgBrO <sub>3</sub>	4, 28	Cr(OH) <sub>3</sub>	30	Ni(OH) <sub>2</sub>	13, 8
AgIO <sub>3</sub>	7, 52	CuCl (20)	6, 0	NiCO <sub>3</sub>	6, 87
AgOH (18)	7, 9	CuBr (20)	7, 4	NiS	20, 7
AgOOCCH <sub>3</sub>	2, 40	CuI (20)	11, 3		(21–26)

## Продолжение таб. П.4.

AgN <sub>3</sub>	8, 54	CuSCN (18)	10, 8	PbF <sub>2</sub> (9)	7, 5
Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11, 2	Cu <sub>2</sub> S	48, 0	PbCl <sub>2</sub>	4, 77
Ag <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	11, 95	Cu(IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	7, 13	PbBr <sub>2</sub>	4, 4
Ag <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	6, 7	Cu(OH) <sub>2</sub>	19, 3	PbI <sub>2</sub>	8, 06
Ag <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	11, 30	CuCO <sub>3</sub>	9, 86	Pb(OOCH) <sub>2</sub>	6, 70
Ag <sub>2</sub> S	49, 6	CuC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	7, 54	Pb(IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	12, 59
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4, 80	CuCrO <sub>4</sub>	5, 44	PbCO <sub>3</sub> (18)	13, 5
Ag <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	17, 8		(37–44)	PbC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (18)	10, 56
Ag <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>	19	CuS	35, 1	PbCrO <sub>4</sub>	13, 75
Ag <sub>3</sub> AsO <sub>3</sub>	18, 5	Fe(OH) <sub>2</sub> (18)	15, 3	PbSO <sub>4</sub>	7, 80
Ag <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (20)	6, 3	FeCO <sub>3</sub> (20)	10, 6	PbS	26, 6
Al(OH) <sub>3</sub>	32, 7	FeC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	6, 7		(27–29)
BaF <sub>2</sub>	5, 76	FeS	17, 3	RaSO <sub>4</sub> (20)	10, 37
Ba(IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	9, 2		(18–21)	RbClO <sub>4</sub>	2, 4
BaCO <sub>3</sub>	9, 26	Fe(OH) <sub>3</sub> (18)	37, 4	Sn(OH) <sub>2</sub>	25, 3
BaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (18)	6, 79	[Hg <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub>	17, 88	SnS	25, 0
BaCrO <sub>4</sub>	9, 93	[Hg <sub>2</sub> ]Br <sub>2</sub>	20, 9		(25–28)
BaSO <sub>4</sub>	9, 96	[Hg <sub>2</sub> ]I <sub>2</sub>	27, 9	SrF <sub>2</sub>	8, 54
BaSO <sub>4</sub> (50)	9, 70	[Hg <sub>2</sub> ](CN) <sub>2</sub>	39, 3	SrCO <sub>3</sub>	9, 96
Be(OH) <sub>2</sub>	18, 6	[Hg <sub>2</sub> ]CO <sub>3</sub>	16	SrC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (18)	7, 25
[BiO]Cl	6, 15	[Hg <sub>2</sub> ]CrO <sub>4</sub>	8, 70	SrCrO <sub>4</sub> (18)	4, 44
Bi <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	97	[Hg <sub>2</sub> ]SO <sub>4</sub>	6, 17	SrSO <sub>4</sub>	6, 55
CaF <sub>2</sub>	10, 40	HgS (черный)	51, 8	TlCl	3, 72
Ca(IO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (18)	6, 13	HgS (красный)	52, 4	TlBr	5, 41
Ca(OH) <sub>2</sub> (18)	5, 26	KClO <sub>4</sub>	2, 05	TlI	7, 24
CaCO <sub>3</sub> (кальцит)	8, 18	K <sub>2</sub> [PtCl <sub>6</sub> ]	5, 85	TlIO <sub>3</sub>	5, 66
CaC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	8, 07	La(IO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	11, 21	TlN <sub>3</sub>	3, 66
CaCrO <sub>4</sub> (18)	1, 64	La(OH) <sub>3</sub>	20	Tl <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	12, 01
CaSO <sub>4</sub>	4, 32	La <sub>2</sub> (C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	27, 7	Zn(OH) <sub>2</sub>	17
Ca[HPO <sub>4</sub> ](H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	6, 57	Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0, 5	$\alpha$ -ZnS	23, 8
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	26, 0	MgF <sub>2</sub>	8, 18	$\beta$ -ZnS	21, 6
Cd(OH) <sub>2</sub> (18)	13, 9	Mg(OH) <sub>2</sub>	10, 74		(22–25)
CdCO <sub>3</sub>	13, 6	MgCO <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub>	4, 25		
CdS (желтый)	26, 1	MgC <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	4, 1		
CdS (красный)	28, 0	MgNH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	12, 6		

Таблица П.5. Константы устойчивости комплексных соединений.

Комплекс	Температура, °C	Ионная сила	$\lg K$	$\lg \beta$
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)]^{2+}$	30	0,5 – 5	4,15	4,15
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$	30	0,5 – 5	3,50	7,65
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_3]^{2+}$	30	0,5 – 5	2,89	10,54
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$	30	0,5 – 5	2,13	12,67
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^+$			6,18	6,18
$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^+$			4,69	10,87
$[\text{Ag}(\text{NH}_3)]^+$	30	0,5 – 5	3,20	3,20
$[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$			3,83	7,03
$[\text{Zn}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$				9,46
$[\text{Cd}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$				7,12
$[\text{Ni}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$				7,95
$[\text{Ni}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$				8,90
$[\text{AlF}_4]^-$	25	0,5		17,75
$[\text{AlF}_5]^{2-}$	25	0,5	1,62	19,37
$[\text{AlF}_6]^{3-}$	25	0,5	0,47	19,84
$\text{FeF}_3$	25	0,5		12,06
$[\text{FeF}_5]^{2-}$	25	0,5		15,4
$[\text{Zn}(\text{OH})_4]^{2-}$	25			15,44
$[\text{Al}(\text{OH})_4]^-$			-1	32
$[\text{AgCl}_2]^-$	25	0		4,75
$[\text{AgCl}_4]^{3-}$	25	5		5,32
$[\text{AuCl}_4]^-$	18			21,30
$[\text{HgI}_4]^{2-}$	25	0,5		29,83
$[\text{CdI}_4]^{2-}$	25	5		6,05
$[\text{PbI}_4]^{2-}$	25	0		3,85
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	18			35,00
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	18			42
$[\text{Co}(\text{CN})_6]^{4-}$				29,5
$[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$				48
$[\text{Ni}(\text{CN})_4]^{2-}$				15,5
$[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{3-}$	25	0		30,3
$[\text{Zn}(\text{CN})_4]^{2-}$	25			16,9
$[\text{Cd}(\text{CN})_4]^{2-}$	25	3		18,45
$[\text{Hg}(\text{CN})_4]^{2-}$	25			41,4
$[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$				38
$[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$	18	0,3		21,1



## Продолжение таб. П.5.

$[\text{Ag}(\text{SCN})_2]^-$	25	2, 2	7, 6
$[\text{Ag}(\text{SCN})_4]^{3-}$	25	2, 2	10, 1
$[\text{Hg}(\text{SCN})_4]^{2-}$	25	0, 3	21, 3
$[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)]^-$	20	0	8, 8
$[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$	20	0	13, 5
$[\text{Ni}(\text{en})_2]^{2+}$	30	1, 2	14, 1
$[\text{Ni}(\text{en})_3]^{2+}$	30	1, 2	18, 6
$[\text{Cu}(\text{en})_2]^{2+}$	30	0, 5	19, 6
$[\text{Zn}(\text{en})_2]^{2+}$	30	1	10, 4
$[\text{Ag}(\text{en})_2]^+$	18		7, 84
$[\text{Cd}(\text{en})_2]^{2+}$	30	0, 5	10, 0
$[\text{Cd}(\text{en})_3]^{2+}$	30	0, 5	12, 1
$[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$	30	1	48, 7
$[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$			21, 3
$[\text{Fe}(\text{dipyr})_3]^{2+}$	25	0, 33	17, 58
$[\text{Cu}(\text{dipyr})_2]^{2+}$	25	0, 1	3, 65 14, 2
$[\text{Cu}(\text{dipyr})_3]^{2+}$	25	0, 5	17, 85
$[\text{Cu}(\text{citr})]^-$	25		14, 20
$[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{citr})_2]^-$	25		18, 77
$[\text{Cu}(\text{OH})(\text{citr})]^{2-}$	25		16, 35
$[\text{Cu}(\text{OH})_2(\text{citr})_3]^{6-}$			19, 3
Ca-ErioT			5, 4
Mg-ErioT			7, 0

Таблица П.6. Логарифмы коэффициентов побочных реакций  $\alpha_Y = [Y']/[Y^{4-}]$  для аниона  $Y^{4-}$  этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).

	pH	$\lg \alpha_Y$	pH	$\lg \alpha_Y$	pH	$\lg \alpha_Y$
	0	21, 4	5, 0	6, 61	10, 0	0, 50
	0, 5	19, 41	5, 5	5, 65	10, 5	0, 23
	1, 0	17, 44	6, 0	4, 78	11, 0	0, 09
	1, 5	15, 51	6, 5	4, 03	11, 5	0, 03
	2, 0	13, 70	7, 0	3, 51	12, 0	0, 01
	2, 5	12, 12	7, 5	2, 86	12, 5	0, 00
	3, 0	10, 79	8, 0	2, 35		
	3, 5	9, 65	8, 5	1, 85		
	4, 0	8, 61	9, 0	1, 36		
	4, 5	7, 60	9, 5	0, 90		

Таблица П.7. Стандартные электродные потенциалы некоторых окисительно-восстановительных пар при 25°C.

Восстановленная форма	$\rightleftharpoons$	Окисленная форма	$E^0$ , В	$pK$
Ag	$\rightleftharpoons$	$\text{Ag}^+$	$+ \text{e}^-$	0,79996 13,5
$\text{Ag} + \text{Cl}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{AgCl}$	$+ \text{e}^-$	0,2221 3,75
$\text{Ag} + \text{Br}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{AgBr}$	$+ \text{e}^-$	0,0713 1,20
$\text{Ag} + \text{I}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{AgI}$	$+ \text{e}^-$	-0,1519 -2,57
$\text{Ag} + 2\text{CN}^-$	$\rightleftharpoons$	$[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$	$+ \text{e}^-$	-0,395 -6,7
$2\text{Ag} + \text{S}^{2-}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Ag}_2\text{S}$	$+ 2\text{e}^-$	-0,7051 -23,8
$\text{Ag}^+$	$\rightleftharpoons$	$\text{Ag}^{2+}$	$+ \text{e}^-$	1,987 33,6
Al	$\rightleftharpoons$	$\text{Al}^{3+}$	$+ 3\text{e}^-$	-1,67 -84,6
$\text{As} + 3\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{H}_3\text{AsO}_3 + 3\text{H}^+$	$+ 3\text{e}^-$	0,2475 12,5
$\text{H}_3\text{AsO}_3 + \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{H}_3\text{AsO}_4 + 2\text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	0,58 19,6
$\text{AsO}_3^{3-} + 2\text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{AsO}_4^{3-} + \text{H}_2\text{O}$	$+ 2\text{e}^-$	-0,08 -2,7
Au	$\rightleftharpoons$	$\text{Au}^+$	$+ \text{e}^-$	1,46 24,8
Au	$\rightleftharpoons$	$\text{Au}^{3+}$	$+ 3\text{e}^-$	1,42 72,0
$\text{Au} + 4\text{Cl}^-$	$\rightleftharpoons$	$[\text{AuCl}_4]^-$	$+ 3\text{e}^-$	1,0 50,7
$\text{Au} + 2\text{CN}^-$	$\rightleftharpoons$	$[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$	$+ \text{e}^-$	-0,60 -10,1
Ba	$\rightleftharpoons$	$\text{Ba}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-2,90 -98
Be	$\rightleftharpoons$	$\text{Be}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-1,70 -57,4
Bi	$\rightleftharpoons$	$\text{Bi}^{3+}$	$+ 3\text{e}^-$	0,277 14,0
$\text{Bi}^{3+} + 3\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{BiO}_3^- + 6\text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	1,73 58,4
$2\text{Br}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{Br}_2(\text{aq})$	$+ 2\text{e}^-$	1,087 36,7
$\text{Br}^- + \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HBrO} + \text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	1,33 44,9
$\text{Br}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{BrO}_3^- + 6\text{H}^+$	$+ 6\text{e}^-$	1,44 146
$\text{Br}^- + 2\text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{BrO}^- + \text{H}_2\text{O}$	$+ 2\text{e}^-$	0,75 25,3
$\text{Br}^- + 6\text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{BrO}_3^- + 3\text{H}_2\text{O}$	$+ 6\text{e}^-$	0,61 61,8
$\text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HCOOH} + 2\text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	0,056 1,89
$\text{HCOOH}$	$\rightleftharpoons$	$\text{CO}_2 + 2\text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	-0,196 -6,62
Ca	$\rightleftharpoons$	$\text{Ca}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-2,76 -93,2
Cd	$\rightleftharpoons$	$\text{Cd}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-0,402 -13,6
$\text{Cd}(\text{Hg})$	$\rightleftharpoons$	$\text{Cd}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-0,3519 -11,9
$\text{Ce}^{3+}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Ce}^{4+}$	$+ \text{e}^-$	1,713 28,9
$2\text{Cl}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{Cl}_2$	$+ 2\text{e}^-$	1,3583 45,89
$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HClO} + \text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	1,489 50,6
$\text{Cl}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{HClO}_2 + 3\text{H}^+$	$+ 4\text{e}^-$	1,57 106
$\text{Cl}^- + 3\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{ClO}_3^- + 6\text{H}^+$	$+ 6\text{e}^-$	1,45 147
$\text{Cl}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{ClO}_4^- + 8\text{H}^+$	$+ 8\text{e}^-$	1,36 184



## Продолжение таб. II.7.

$\text{Cl}^- + 2 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}$	$+ 2\text{e}^-$	0,88	29,8
$\text{Cl}^- + 4 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{ClO}_2^- + 2 \text{H}_2\text{O}$	$+ 4\text{e}^-$	0,77	52
$\text{Cl}^- + 6 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{ClO}_3^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	$+ 6\text{e}^-$	0,62	62,8
$\text{Cl}^- + 8 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{ClO}_4^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	$+ 8\text{e}^-$	0,53	71,6
Co	$\rightleftharpoons$	$\text{Co}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-0,277	-9,4
$\text{Co}^{2+}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Co}^{3+}$	$+ \text{e}^-$	1,842	31,1
Cr	$\rightleftharpoons$	$\text{Cr}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-0,557	-18,8
$\text{Cr}^{2+}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Cr}^{3+}$	$+ \text{e}^-$	-0,40	-6,76
$2 \text{Cr}^{3+} + 7 \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 14\text{H}^+$	$+ 6\text{e}^-$	1,36	138
$\text{Cr}(\text{OH})_3 + 5 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{CrO}_4^{2-} + 4\text{H}_2\text{O}$	$+ 3\text{e}^-$	-0,12	-6,1
$\text{Cr}^{3+} + 8 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{CrO}_4^{2-} + 4 \text{H}_2\text{O}$	$+ 3\text{e}^-$	-0,72	-36,5
Cs	$\rightleftharpoons$	$\text{Cs}^+$	$+ \text{e}^-$	-2,923	49,4
Cu	$\rightleftharpoons$	$\text{Cu}^+$	$+ \text{e}^-$	0,522	8,82
Cu	$\rightleftharpoons$	$\text{Cu}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	0,3460	11,69
$\text{Cu}(\text{Hg})$	$\rightleftharpoons$	$\text{Cu}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	0,3511	11,86
$\text{Cu}^+$	$\rightleftharpoons$	$\text{Cu}^{2+}$	$+ \text{e}^-$	0,170	2,87
$2 \text{F}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{F}_2$	$+ 2\text{e}^-$	2,87	96,9
$\text{Fe}^{2+}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Fe}^{3+}$	$+ \text{e}^-$	0,7704	13,0
$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	$\rightleftharpoons$	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	$+ \text{e}^-$	0,36	6,1
ферроин	$\rightleftharpoons$	ферриин	$+ \text{e}^-$	1,04	17,6
$\text{H}_2$	$\rightleftharpoons$	$2 \text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	0,0000	0
$2 \text{H}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{H}_2$	$+ 2\text{e}^-$	-2,24	-76
Hg	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	0,852	28,8
$2 \text{Hg}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}_2^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	0,7986	27,0
$2 \text{Hg} + 2 \text{Cl}^-$ (нас. $\text{KCl}$ )	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}_2\text{Cl}_2$	$+ 2\text{e}^-$	0,2412	8,15
$2 \text{Hg} + 2 \text{Cl}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}_2\text{Cl}_2$	$+ 2\text{e}^-$	0,2677	9,04
$2 \text{Hg} + 2 \text{Br}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}_2\text{Br}_2$	$+ 2\text{e}^-$	0,1396	4,72
$2 \text{Hg} + 2 \text{I}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}_2\text{I}_2$	$+ 2\text{e}^-$	-0,0405	-1,37
$2 \text{Hg} + \text{SO}_4^{2-}$	$\rightleftharpoons$	$\text{Hg}_2\text{SO}_4$	$+ 2\text{e}^-$	0,6151	20,8
$2 \text{I}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{I}_2$	$+ 2\text{e}^-$	0,5355	18,1
$\text{I}^- + \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{IOH} + \text{H}^+$	$+ 2\text{e}^-$	0,99	33,4
$\text{I}^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	$\rightleftharpoons$	$\text{IO}_3^- + 6 \text{H}^+$	$+ 6\text{e}^-$	1,085	110
$\text{I}^- + 2 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{IO}^- + \text{H}_2\text{O}$	$+ 2\text{e}^-$	0,49	16,6
$\text{I}^- + 6 \text{OH}^-$	$\rightleftharpoons$	$\text{IO}_3^- + 3 \text{H}_2\text{O}$	$+ 6\text{e}^-$	0,26	26,4
K	$\rightleftharpoons$	$\text{K}^+$	$+ \text{e}^-$	-2,9241	-49,4
Li	$\rightleftharpoons$	$\text{Li}^+$	$+ \text{e}^-$	-2,9595	-50
Mg	$\rightleftharpoons$	$\text{Mg}^{2+}$	$+ 2\text{e}^-$	-2,375	-80

## Продолжение таб. П.7.

Mn	$\rightleftharpoons$	Mn <sup>2+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	-1,18	-39,9
Mn <sup>2+</sup>	$\rightleftharpoons$	Mn <sup>3+</sup>	+ e <sup>-</sup>	1,51	25,5
Mn <sup>2+</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	MnO <sub>2</sub> + 4 H <sup>+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	1,23	41,6
Mn <sup>2+</sup> + 4 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	MnO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 8 H <sup>+</sup>	+ 4e <sup>-</sup>	1,74	118
Mn <sup>2+</sup> + 4 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + 8 H <sup>+</sup>	+ 5e <sup>-</sup>	1,51	127
Mn + 2 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	Mn(OH) <sub>2</sub>	+ 2e <sup>-</sup>	-1,52	-51
MnO <sub>2</sub> + 4 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	MnO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	+ 2e <sup>-</sup>	0,58	19,6
MnO <sub>2</sub> + 4 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	+ 3e <sup>-</sup>	0,58	29,4
Na	$\rightleftharpoons$	Na <sup>+</sup>	+ e <sup>-</sup>	-2,7131	-45,8
Ni	$\rightleftharpoons$	Ni <sup>2+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	-0,23	-7,77
2 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$\rightleftharpoons$	N <sub>2</sub> H <sub>5</sub> <sup>+</sup> + 3 H <sup>+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	1,28	43,2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	NH <sub>3</sub> OH <sup>+</sup> + 2 H <sup>+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	1,32	44,6
2 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$\rightleftharpoons$	N <sub>2</sub> + 8 H <sup>+</sup>	+ 6e <sup>-</sup>	0,27	27,4
2 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	N <sub>2</sub> O + 10 H <sup>+</sup>	+ 8e <sup>-</sup>	0,65	87,8
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	NO + 6 H <sup>+</sup>	+ 5e <sup>-</sup>	0,84	70,9
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 8 H <sup>+</sup>	+ 6e <sup>-</sup>	0,86	87,2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	NO <sub>2</sub> + 8 H <sup>+</sup>	+ 7e <sup>-</sup>	0,89	105
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + 3 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 10 H <sup>+</sup>	+ 8e <sup>-</sup>	0,88	119
2 HN <sub>3</sub>	$\rightleftharpoons$	3 N <sub>2</sub> + 2 H <sup>+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	-3,09	-104
2 NH <sub>3</sub> + 2 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	+ 2e <sup>-</sup>	0,10	3,38
NH <sub>3</sub> + 2 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	NH <sub>2</sub> OH + H <sub>2</sub> O	+ 2e <sup>-</sup>	0,42	14,2
2 NH <sub>3</sub> + 6 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	N <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	+ 6e <sup>-</sup>	-0,73	-74
2 NH <sub>3</sub> + 8 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	N <sub>2</sub> O + 7 H <sub>2</sub> O	+ 8e <sup>-</sup>	-0,42	-56,8
NH <sub>3</sub> + 5 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	NO + 4 H <sub>2</sub> O	+ 5e <sup>-</sup>	-0,10	-8,45
NH <sub>3</sub> + 7 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + 5 H <sub>2</sub> O	+ 6e <sup>-</sup>	-0,16	-16,2
NH <sub>3</sub> + 7 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	NO <sub>2</sub> + 5 H <sub>2</sub> O	+ 7e <sup>-</sup>	-0,013	-1,54
NH <sub>3</sub> + 9 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 6 H <sub>2</sub> O	+ 8e <sup>-</sup>	-0,12	-16,2
2 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	O <sub>2</sub> + 4 H <sup>+</sup>	+ 4e <sup>-</sup>	1,229	83,0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$\rightleftharpoons$	O <sub>2</sub> + 2 H <sup>+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	0,682	23,0
2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$\rightleftharpoons$	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 H <sup>+</sup>	+ 2e <sup>-</sup>	1,77	59,8
4 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	O <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	+ 4e <sup>-</sup>	0,401	27,1
2 HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	2 O <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	+ 4e <sup>-</sup>	-0,075	-5,07
P + 3 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> + 3 H <sup>+</sup>	+ 3e <sup>-</sup>	-0,50	-25,3
P + 4 H <sub>2</sub> O	$\rightleftharpoons$	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 5 H <sup>+</sup>	+ 5e <sup>-</sup>	-0,41	-34,6
PH <sub>3</sub> + 3 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	P + 3 H <sub>2</sub> O	+ 3e <sup>-</sup>	-0,87	-44
P + 2 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	H <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+ e <sup>-</sup>	-2,05	-34,6
P + 5 OH <sup>-</sup>	$\rightleftharpoons$	HPO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + 2 H <sub>2</sub> O	+ 3e <sup>-</sup>	-1,57	-79,6

## Продолжение таб. П.7.

## П.П. АСТР. АДДИЦИОНАЛЬНЫЙ, табл. II

$P + 8 OH^-$	$\rightleftharpoons$	$PO_4^{3-} + 4 H_2O$	$+ 5e^-$	-1,49	-126
Pb	$\rightleftharpoons$	$Pb^{2+}$	$+ 2e^-$	-0,1263	-4,27
$Pb^{2+} + 2 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$PbO_2 + 4 H^+$	$+ 2e^-$	1,46	49,3
$PbSO_4 + 2 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$PbO_2 + SO_4^{2-} + 4H^+$	$+ 2e^-$	1,685	56,9
Rb	$\rightleftharpoons$	$Rb^+$	$+ e^-$	-2,9259	-49,4
$H_2S$	$\rightleftharpoons$	$S + 2 H^+$	$+ 2e^-$	0,141	4,76
$H_2S + 4 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$SO_4^{2-} + 10 H^+$	$+ 8e^-$	0,30	40,5
$2 S + 3 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$H_2S_2O_3 + 4 H^+$	$+ 4e^-$	0,50	33,8
$2 S + 4 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$H_2S_2O_4 + 6 H^+$	$+ 6e^-$	0,63	64
$S + 3 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$H_2SO_3 + 4 H^+$	$+ 4e^-$	0,45	30,4
$S + 4 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$SO_4^{2-} + 8 H^+$	$+ 6e^-$	0,356	36,1
$2 S_2O_3^{2-}$	$\rightleftharpoons$	$S_4O_6^{2-}$	$+ 2e^-$	0,06	2,0
$S^{2-}$	$\rightleftharpoons$	$S$	$+ 2e^-$	-0,48	-16,2
$S + 6 OH^-$	$\rightleftharpoons$	$SO_3^{2-} + 3 H_2O$	$+ 4e^-$	-0,61	-41,2
$S + 8 OH^-$	$\rightleftharpoons$	$SO_4^{2-} + 4 H_2O$	$+ 6e^-$	-0,72	-73
$S_2O_3^{2-} + 10 OH^-$	$\rightleftharpoons$	$2 SO_4^{2-} + 5 H_2O$	$+ 8e^-$	-0,76	-103
$Sb + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$SbO^+ + 2 H^+$	$+ 3e^-$	-0,212	-10,7
$H_3SbO_3 + 3 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$H[Sb(OH)_6] + 2 H^+$	$+ 2e^-$	0,75	25,3
Sn	$\rightleftharpoons$	$Sn^{2+}$	$+ 2e^-$	-0,1496	-4,75
$Sn^{2+}$	$\rightleftharpoons$	$Sn^{4+}$	$+ 2e^-$	0,15	5,1
$Sr$	$\rightleftharpoons$	$Sr^{2+}$	$+ 2e^-$	-2,89	-97,6
Tl	$\rightleftharpoons$	$Tl^+$	$+ e^-$	-0,336	-5,7
$Tl^+$	$\rightleftharpoons$	$Tl^{3+}$	$+ 2e^-$	1,247	42,2
$V^{2+}$	$\rightleftharpoons$	$V^{3+}$	$+ e^-$	-0,253	-4,3
$V^{3+} + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$VO^{2+} + 2 H^+$	$+ e^-$	0,337	5,7
$VO^{2+} + 3 H_2O$	$\rightleftharpoons$	$V(OH)_4^+ + 2 H^+$	$+ e^-$	1,00	16,9
Zn	$\rightleftharpoons$	$Zn^{2+}$	$+ 2e^-$	-0,7628	-25,8

Таблица П.8. Сравнение пределов обнаружения элементов (нг/мл) различными методами атомной спектроскопии.

Элемент	Символ	Порядковый номер	AAC (пламя)	AAC (электротерм.)	АЭС (пламя)	АЭС (ИСП)	АЭС (ППГ)	АФС
Азот	N	7						
Алюминий	Al	13	20	0,01	3	0,2	2	0,6
Барий	Ba	56	8	0,04	1	0,01	2	2
Бериллий	Be	4	1	0,003	100	0,003	0,5	1
Бор	B	5	700	15	50	0,1	5	2000
Бром	Br	35						
Ванадий	V	23	20	0,1	7	0,06	8	30
Висмут	Bi	83	0,02	0,1	1000	10	75	2
Вольфрам	W	74	500		200	0,8	30	2000
Гадолиний	Gd	64	1000	8	120	0,4		800
Галлий	Ga	31	50	0,01	5	0,6	38	0,9
Гафний	Hf	72	2000			10		
Германий	Ge	32	50	0,1	400	0,5		100
Гольмий	Ho	67	40	0,7	10	3		100
Диспрозий	Dy	66	50		20	4	5	300
Европий	Eu	63	20	0,5	0,2	0,06		20
Железо	Fe	26	3	0,01	10	0,09	3	3
Золото	Au	79	6	0,01	500	0,9	3	5
Индий	In	49	20	0,02	1	0,4	38	0,2
Иод	I	53						
Иридий	Ir	77	500	0,5	400	30	60	
Иттербий	Yb	70	5	0,1	0,2	0,02		10
Иттрий	Y	39	50	10	40	0,04	2	500
Кадмий	Cd	48	0,5	0,0002	300	0,07	0,5	0,001
Калий	K	19	1	0,004	0,01	30	0,3	0,8
Кальций	Ca	20	0,5	0,01	0,1	0,001	0,2	0,08
Кислород	O	8						
Кобальт	Co	27	2	0,008	5	0,1	1	2
Кремний	Si	14	20	0,005		2	15	300
Лантан	La	57	2000	0,5	5	0,1	2	
Литий	Li	3	0,3	0,01	0,001	0,02	1	0,4

## Продолжение таб. П.8.

Лютесций	Lu	71	700		200	0,1		
Магний	Mg	12	0,1	0,0002	1	0,003	0,2	0,1
Марганец	Mn	25	0,8	0,0005	1	0,01	0,5	0,4
Медь	Cu	29	1	0,005	3	0,04	2	0,03
Молибден	Mo	42	10	0,02	10	0,2	0,5	12
Мышьяк	As	33	0,02	0,08	2000	2	45	0,1
Натрий	Na	11	0,2	0,004	0,01	0,1	0,05	0,1
Неодим	Nd	60	600		200	0,3	38	2000
Никель	Ni	28	2	0,05	10	0,2	2	2
Ниобий	Nb	41	1000		60	0,2	38	1000
Олово	Sn	50	10	0,03	100	3	23	10
Осмий	Os	76	80	2	2000	0,4		
Палладий	Pd	46	10	0,05	40	2	9	40
Платина	Pt	78	40	0,2	2000	0,9	26	300
Празеодим	Pr	59	2000		500	10	53	1000
Рений	Re	75	200	10	200	6	23	
Родий	Rh	45	2	0,1	10	30	45	100
Ртуть	Hg	80	0,001	0,2	150	1	75	0,003
Рубидий	Rb	37	0,3		0,02		15	
Рутений	Ru	44	70		300	30	30	500
Самарий	Sm	62	500		50	1	83	100
Свинец	Pb	82	10	0,007	0,2	1	23	10
Селен	Se	34	0,02	0,05		1	45	0,06
Сера	S	16	20	10	1600	30		
Серебро	Ag	47	0,9	0,001	2	0,2	2	0,1
Скандий	Sc	21	20	6	10	0,4		10
Стронций	Sr	38	2	0,01	0,1	0,002	2	0,3
Сурьма	Sb	51	0,1	0,08	200	10	3	0,1
Таллий	Tl	81	9	0,01	2	40		4
Тантал	Ta	73	9			5	75	
Теллур	Te	52	0,002	0,03	600	15	75	0,08
Тербий	Tb	65	600		200	0,1		500
Титан	Ti	22	10	0,3	30	0,03	1	2
Торий	Th	90				3		
Тулий	Tm	69	10		4	0,2		100
Углерод	C	6				44		
Уран	U	92		30	100	1,5	150	

## Продолжение таб. П.8.

Фосфор	P	15	0,3	100	15	75	
Фтор	F	9					
Хлор	Cl	17					
Хром	Cr	24	2	0,004	1	0,08	1
Цезий	Cs	55	8	0,04	0,02		
Церий	Ce	58			150	0,4	500
Цинк	Zn	30	0,8	0,0006	1000	0,1	2
Цирконий	Zr	40	350		1000	0,06	8
Эрбий	Er	68	40	0,3	20	1	5
							500

**Примечание.** AAC — атомно-абсорбционная спектроскопия, АЭС — атомно-эмиссионная спектроскопия, ИСП — индуктивно связанный плазма, ППТ — плазма постоянного тока, АФС — атомно-флуоресцентная спектроскопия.

## Предметный указатель

автоматизация лабораторий, 149  
автоматический анализатор, 151  
    дискретный, 153  
    непрерывный, 156  
    параллельный, 162  
    центрифужный, 162  
    элементный, 163  
адсорбция, 68  
аккредитация лабораторий, 245  
амперометрия, 202  
    детектирование в ВЭЖХ, 58  
анализ химический  
    «безреактивный», 153  
    валовый, 213  
    групповой, 197  
    количественный, 191  
    локальный, 216  
    многокомпонентный, 134, 136  
    полевой, 207  
    производственный, 149  
    распределительный, 214  
антigen, 233  
антитело, 233  
атомно-эмиссионная спектроскопия, 216  
Бергвельд, 173  
валидация методики, 239  
Ван-Деемтера уравнение, 18  
внутренний стандарт, 22  
воспроизводимость, 240  
время удерживания, 12, 79, 102

исправленное, 13, 26, 40  
высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), 15, 26, 48, 85, 91  
газ-носитель, 24, 29, 103  
газоразрядный счетчик, 31  
галтен, 234, 237  
генеральная совокупность, 114  
гидродинамический объем, 78  
гипотеза статистическая, 118  
главные компоненты, 141  
глубина отбора аналитической информации, 214, 224  
градуировка, 240  
многомерная  
    непрямая, 137  
    обращенная, 139  
    прямая, 137  
данные аналитические многомерные, 112, 133  
    коррелированные, 113  
датчики (сенсоры) химические, 168, 170–172, 176–178, 181, 186, 189–191, 195  
денситометр, 84  
детектирование  
    в ферментативном анализе, 231  
    в хроматографии, 28  
    атомно-эмиссионное, 110, 213  
    гель-, 78  
    катарометр, 109  
    кондуктометрическое, 72  
    масс-спектрометрическое, 22, 90

- проточные вискозиметры, 78  
рефрактометрическое, 56  
спектроскопическое, 22, 40, 59  
тонкослойной, 83  
флуоресцентное, 67  
флюидной, 90  
фотометрическое, 54, 74  
электрохимическое, 57
- детекторы  
в хроматографии  
термоионные, 32  
в ИК-спектроскопии, 109  
в хроматографии, 29  
в ВЭЖХ, 54  
масс-спектроскопические, 34  
пламенно-ионизационные, 90  
спектроскопические, 33  
флуоресцентные, 56  
электронного захвата, 31  
многоканальные, 222
- детекторы в хроматографии  
пламенно-ионизационные, 31  
диодная линейка, 22, 55, 190, 194  
дискриминирующая функция, 146
- дисперсионный анализ, 122  
многоуровневый, многофакторный, 125
- дисперсия, 124  
внутрилабораторная, 124  
зон в ПИА, 159  
межлабораторная, 124  
остаточная, 135  
сравнение, 122
- дифференцирование, интегри-  
рование данных, 129  
диффузия, 18, 68, 72, 158, 159
- емкость ионообменников, 72  
емкость электрическая, 196
- изотахофорез, 95  
изоэлектрическая точка, 95  
изоэлектрическое фокусирова-  
ние, 94
- ИК-анализатор бездисперсион-  
ный, 199, 209
- ИК-спектроскопия  
в ближней области, 137, 167, 195, 197, 199  
с нарушенным полным внут-  
ренним отражением, 186, 194  
с фурье-преобразованием, 131, 194
- индекс полярности Снайдера, 63  
индексы удерживания, 39  
Ковача, 40
- индикаторная реакция, 231  
индикаторные бумаги, 208  
индикаторные трубы, 204, 207
- индикаторы  
кислотно-основные, 154  
интеграл Гаусса, 117  
ионный обмен, 70  
ионообменники, 70
- Калмана фильтр, 129  
калориметрия, 202  
катарометр, 29  
Кларка датчик, 202  
классификация данных, 139  
кластерный анализ, 142  
Клаузуса-Клапейрона закон, 43

колонки хроматографические, 29  
 для ВЭЖХ, 53  
 емкость, 35  
 капиллярные, 28, 29, 34, 45, 90  
 капилярные, 35  
 набивные, 28, 29, 34, 45  
 колонка хроматографическая набивная, 103  
 конвекция, 158  
 кондуктометрия, 72  
 детектирование в ВЭЖХ, 57  
 контрольная карта, 241  
 кофактор, 227  
 кофермент, 227  
 коэффициент  
 Мартина, 25  
 диффузии, 18, 26, 88, 91  
 емкости, 14, 21, 63, 65, 84  
 распределения, 12, 25, 43, 76, 79, 85  
 селективности, 14, 20, 63, 65, 91  
 удерживания ( $R_f$ ), 84  
 относительный, 86  
 Крейга процесс, 8  
 Кубелки-Мунка функция, 86  
 кулонометрия, 209  
 детектирование в ВЭЖХ, 57  
 кюветы, 154  
 лабораторный робот, 164  
 лазер, 216  
 Ламберта-Бера закон, 137, 182  
 летучесть, 26  
 масс-спектрометр, 103

квадрупольный, 104, 108  
 масс-спектрометрия, 40, 103, 207, 216  
 в тлеющем разряде, 219  
 вторичных ионов, 214, 215, 218  
 распыленных нейтральных частиц, 219  
 tandemная, 110  
 математическое моделирование, 133  
 матрица  
 расстояний, 144  
 межлабораторные испытания, 241  
 мембрана  
 газопроницаемая, 170  
 ионселективная, 174, 184  
 полупроницаемая, 154  
 «мертвое» время, 13  
 метод ближайших соседей, 147  
 механизация лабораторий, 149  
 миграция, 92  
 Михаэлиса-Ментен теория ферментативных реакций, 228  
 молекулярная эксклюзия, 75  
 молекулярно-массовое распределение, 79  
 неподвижная фаза, 8, 27, 29, 34, 37, 45, 59, 75, 77, 81, 90, 202  
 нормальная, 62  
 носители, 34  
 обращенная, 60  
 химически закрепленная, 59  
 химически привитая, 37  
 хиральная, 67  
 непрерывный проточный анализ, 156

- Нернста уравнение, 169, 175  
образец сравнения, 23, 240  
оже-эффект, 220  
октановое число, измерение, 197  
оптроды, 181  
ионселективные, 184  
  
плотность вероятности, 114  
поверхностные акустические волны, 189  
поверхностные световые волны, 186  
подвижная фаза, 8, 24, 46, 49, 62, 65, 72, 78, 81, 87, 90  
подвижность ионов, 92  
полевой транзистор, 173  
поляризация электродов, 197  
потенциометрия, 202  
правильность, 240  
предел обнаружения, 240  
пределочный диффузионный ток, 58  
предколонка (в ВЭЖХ), 49, 62, 202  
преобразование Адамара, 133  
преобразование Фурье, 109, 130  
дискретное, 131  
обратное, 131  
признак классификационный, 140  
пробоподготовка, 160, 192  
пропорциональный счетчик, 115  
проточно-инжекционный анализ, 158, 194  
  
рабочий диапазон, 240  
радиоактивность, 235  
разрешение, 129  
геометрическое, 214  
  
распознавание образов, 139  
распределение случайной величины, 113–118  
Рауля закон, 26  
регрессионный анализ, 134  
рентгеновская трубка, 221  
рентгеновское излучение, 217  
рефрактометрия, 199  
  
сверхкритическое (флюидное) состояние, 87  
световод, 178  
селективный мониторинг ионов, 104, 207  
сепаратор, 103, 106  
сигнал фона, 129  
скорость счета, 222  
сопротивление массопереносу, 18  
спектрометр  
  электронный, 221  
спектроскопия  
  УФ-видимая, 103  
  ЯМР  
    импульсная, 131  
  атомно-абсорбционная, 216  
    гидридная техника, 110  
  атомно-эмиссионная, 103  
    с ИСП, 193  
  оже-электронная, 224  
  фотоэлектронная, 220  
    электронная, 214, 219  
среднее значение, 114  
сравнение, 122  
стандартное отклонение, 114, 240  
  среднее, 121  
стандартные образцы, 241  
Стьюдента коэффициент, 242  
  
тест статистический, 118

- согласия, 136
- Стьюдента
  - простой, 118
  - расширенный, 120
- Фишера, 122, 124
- тест-методы, 204
- титрование
  - кислотно-основное, 209
  - кулонометрическое, 210
- удерживаемый объем, 24, 43, 75, 79
  - исправленный, 25, 40
  - удельный, 25
  - чистый, 25
- уровень значимости, 119
- уширение хроматографических пиков, 12, 15, 17, 36, 91
- ферменты, 171, 226
- фильтрация данных, 126
  - метод Савицкого-Голея, 127
  - метод скользящего среднего, 127
  - рекурсивная, 129
  - с предварительным преобразованием, 129
  - с фурье-преобразованием, 131
- флюидная фаза (флюид), 87
- фотометр, 178, 193, 198
- хемиризистор, 177
- хемометрика, 112
  - многомерные методы, 133
- хеморецептор, 178, 181
- химический сдвиг, 222
- хромато-масс-спектрометрия, 104, 193
- интерфейс
- ионизация при атмосферном давлении, 107
- струйный, 106
- термораспыление, 106
- электрораспыление, 108
- ионизация химическая, 106
- хроматограмма, 11
  - внешняя, 9
  - внутренняя, 9, 23, 81, 84
- хроматограф
  - газовый, 27
  - жидкостный высокоэффективный, 49, 158
  - насосы, 50
- хроматографические параметры, 12
- хроматографический анализ
  - качественный, 22
  - количественный, 23
- хроматография, 8
  - адсорбционная, 9, 72
  - бумажная, 81
  - газо-адсорбционная, 24, 29
  - газоадсорбционная, 45
  - газовая, 9, 23, 24, 103, 164, 194
  - капиллярная, 103, 207
  - сочетание с ИК-спектрскопией, 109
  - сочетание с масс-спектротипией, 103
  - газожидкостная, 24
  - гель-, 48, 75, 92, 206
  - жидкостная, 9, 17, 23, 46, 103
  - адсорбционная, 68
  - высокоэффективная (ВЭЖХ), 47, 203, 212

- классическая, 47, 60  
сочетание с масс-спектрометрией, 105  
ион-парная, 66  
ионная, 48, 70, 71  
ионнообменная, 48, 70  
    классическая, 70  
мицеллярная электрокинетическая, 100  
нормально-фазовая, 47, 59, 65, 67, 68, 106  
обращенно-фазовая, 47, 59, 65, 68, 106, 107  
плоскостная, 9, 81  
производственная, 202  
распределительная, 9, 59, 66  
сочетание со спектроскопией, 102  
теория, 15  
тонкослойная, 70, 81  
флюидная, 9, 87  
элюативная, 10, 70  
экстракция, 206  
    сверхкритическая флюидная, 89  
электрод  
    ионселективный, 166, 168, 170, 171  
    сравнения, 170  
электронно-зондовый микронализ, 217  
электроосмотический поток, 99  
электропроводность, 177, 196  
электрофорез, 87, 92  
    зонный, 94  
    капиллярный, 96, 97  
    ввод пробы, 98  
    детектирование, 98  
    классический, 93  
    на носителе, 94  
    фронтальный, 94  
электрохимическая ячейка, 170  
элюент, 10, 72  
элюотропный ряд растворителей, 63  
энергоанализатор, 222