

Методы разделения и идентификации веществ

АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В УФ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ СПЕКТРА

Методы, используемые в биологической химии

Биохимия на всем протяжении своего развития **была и остается экспериментальной наукой.**

Успех любого исследования **определяется** главным образом **правильным выбором экспериментального подхода** к научной проблеме и **корректным использованием** выбранных методических приемов.

В биохимии используются практически все современные методы физико-химического анализа.

УФ и видимый диапазоны спектра



С – поддиапазон: полностью задерживается озоновым слоем в стратосфере на высоте около 50 км.

В – поддиапазон: поверхности земли достигает около 10% исходного.

А – поддиапазон: достигает поверхности земли. **Только этот поддиапазон УФ вызывает фотоэффекты у живых объектов, необходимые для процессов их жизнедеятельности.**

Абсорбционная спектроскопия в УФ и видимой областях спектра служит для:

- **Высококочувствительного качественного анализа сложных смесей веществ.**
- **Высококочувствительного количественного анализа.**
- **Изучения структуры веществ, а также для оценки её изменений в различных условиях.**

Достоинства:

- **Изучаемые вещества не разрушаются.**
- **Высокая чувствительность методов.**
- **Высокая специфичность методов.**
- **Возможность обнаружения низких концентраций веществ в составе сложных смесей без их предварительного разделения.**

Энергия любого вида электромагнитного излучения (в том числе и светового) поглощается и излучается отдельными порциями. Эти порции энергии обладают свойствами материальной частицы и называются *квантами излучения* или *фотонами*.

Энергия кванта (фотона):

$$E = h \times \nu$$

h – постоянная Планка

ν - частота, Гц

Энергия кванта прямо пропорциональна частоте (ν) и обратно пропорциональна длине волны (λ).

Взаимодействие кванта (фотона) с веществом

1. Квант светового излучения не взаимодействует с веществом. При этом энергия кванта не поглощается веществом, квант изменяет свое направление – происходит рассеивание светового излучения.
2. Квант светового излучения поглощается веществом. Это обусловлено тем, что сама молекула (функциональная группа в составе молекулы) является **хромофором**. Именно хромофор поглощает энергию кванта.

Хромофор поглощает только те кванты, энергия которых равна **разнице энергий** электронов хромофора в его основном и возбужденном состояниях:

$$h\nu = E_{e^- \text{ возб. сост.}} - E_{e^- \text{ осн. сост.}}$$

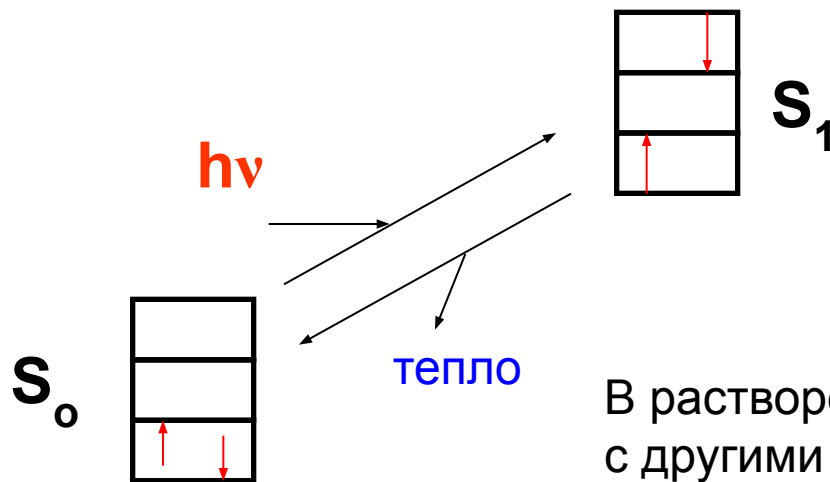
Этим объясняется феномен: разные вещества (хромофоры) поглощают световые излучения с разной длиной волны (λ).

Основное и возбужденное состояние вещества

Основное (невозбужденное) состояние вещества (S_0) – вещество не поглощает и не излучает энергию.

Когда вещество поглощает квант энергии – происходит его переход в **возбужденное (S_1) состояние**.

S – синглетное состояние (спин e^- не меняется)

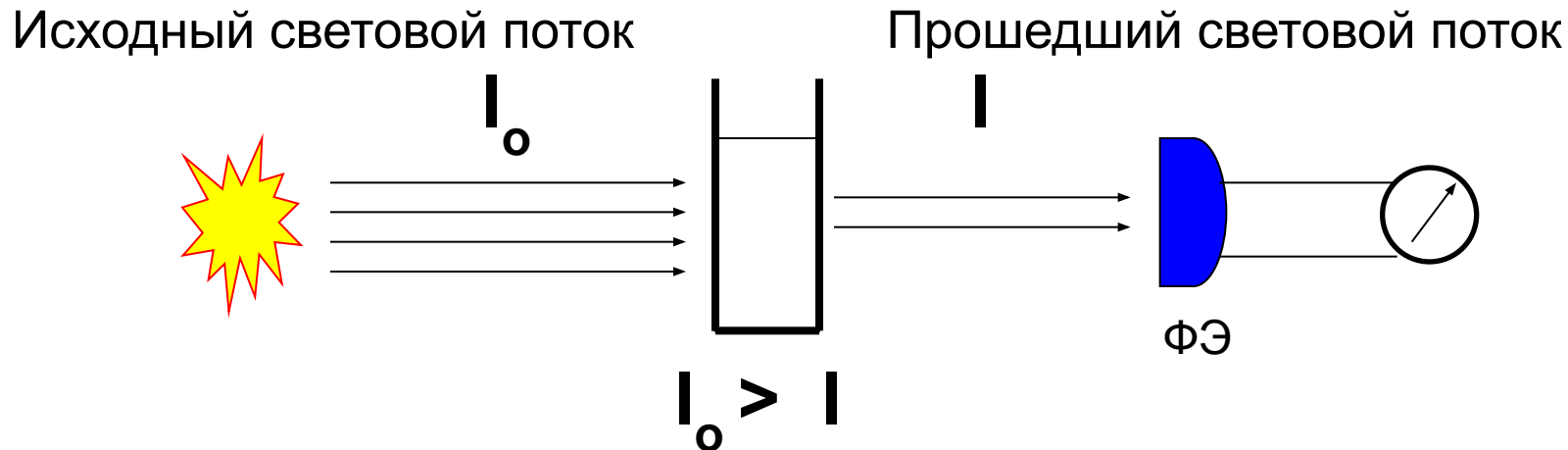


Электроны переходят с орбиталей нижних энергетических уровней на орбитали с высоким энергетическим уровнем (спин e^- сохраняется).

S_1 – состояние длится 10^{-8} - 10^{-9} с

В растворе возбужденная молекула соударяется с другими молекулами с частотой 10^{12} с, теряет энергию и возвращается в состояние S_0 .

Поглощение светового излучения средой описывает закон Ламберта-Бугера-Бэра



Как измерить интенсивность прошедшего светового потока?

$$\%T \text{ (светопропускание)} = I \times 100\% / I_0$$

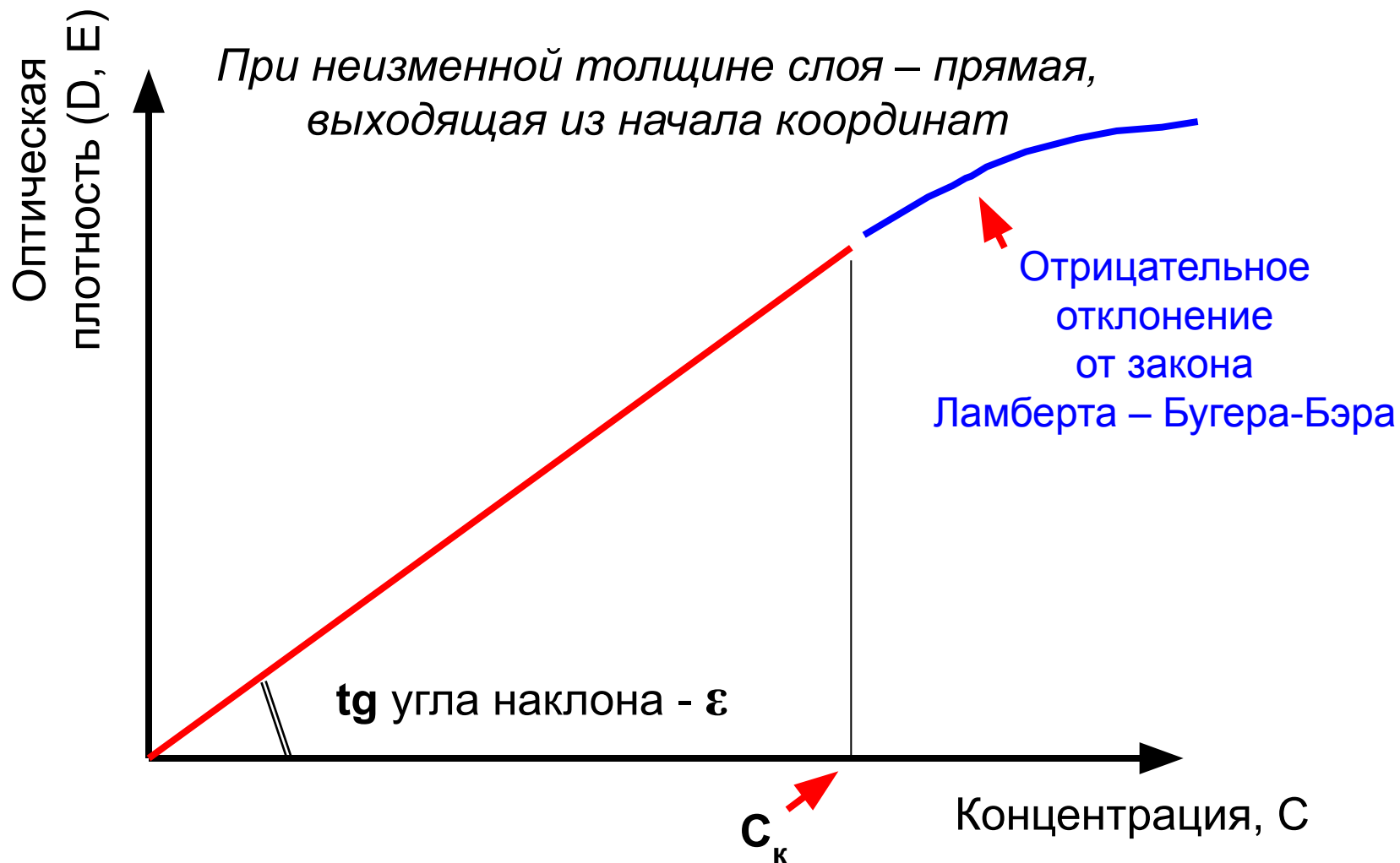
$$E, A, D \text{ (экстинкция, оптическая плотность)} = \lg I_0 / I$$

Закон выражает связь между E и C:

$$E = \varepsilon \times C \times l$$

C – *mol/l*; l – толщина слоя, см; ε – молярный коэффициент экстинкции

Зависимость оптической плотности (экстинкции) от концентрации поглощающего вещества в растворе

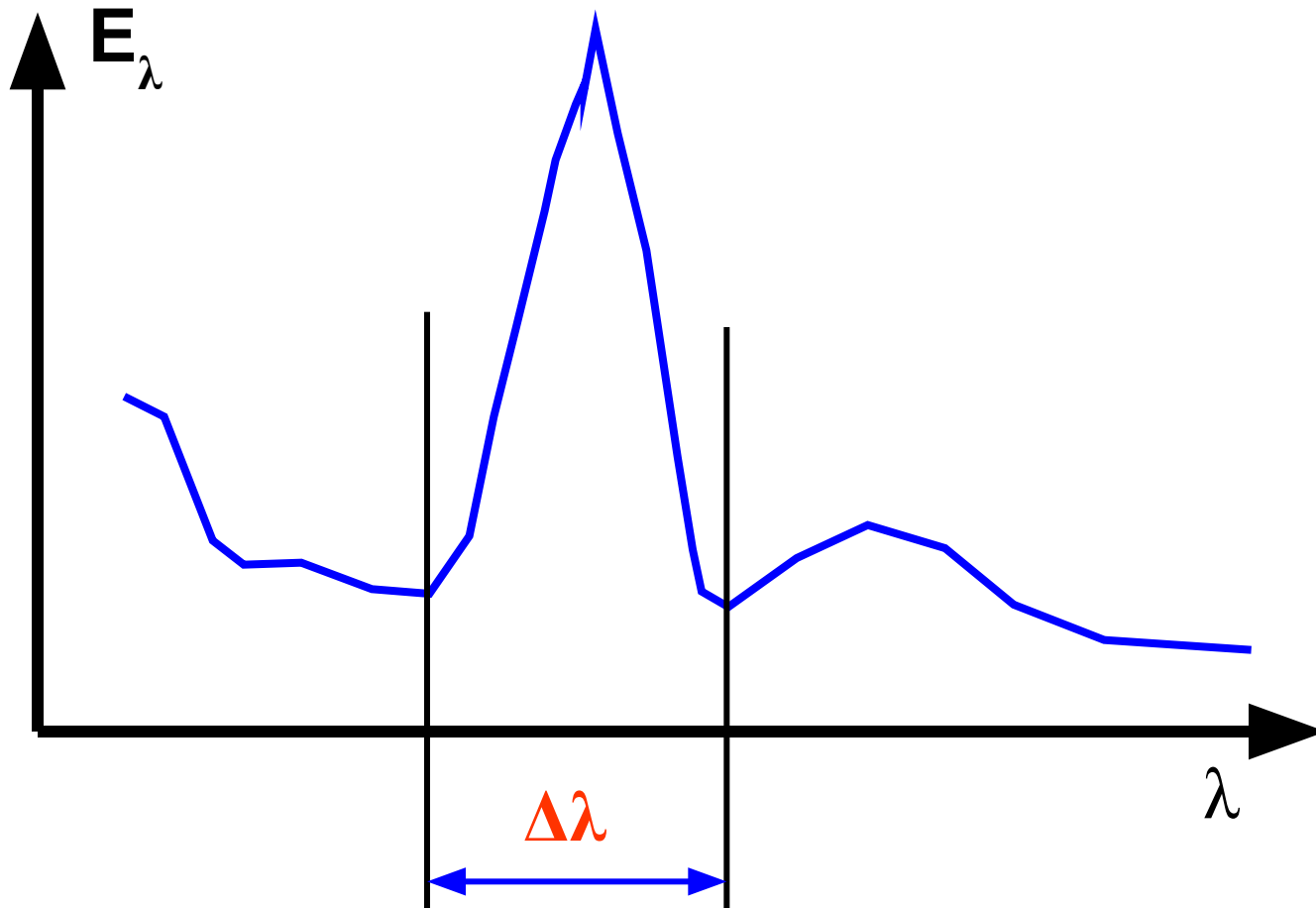


Основные причины отклонений от закона Ламберта – Бугера-Бэра

- реакции ассоциации, диссоциации или химические взаимодействия соединения с растворителем;
- флуоресценция анализируемого вещества в растворе. Весь вторичный световой поток попадает на фотоэлемент. При большой толщине слоя – происходит тушение флуоресценции;

- немонохроматичность падающего на образец света (I_0) при большой ширине спектральной щели. При этом могут быть существенные отличия в распределении интенсивности световых пучков с разной λ . Это особенно сильно проявляется у веществ с очень узким диапазоном поглощения. Для устранения возможной ошибки выбирают ширину спектральной щели \leq полуширины исследуемой полосы ($1/2 \Delta\lambda$);
- присутствие рассеянного и/или отраженного света (дефекты призм, зеркал, пыль и тд.);
- неисправность фотоэлемента, усилителя прибора.

$\Delta\lambda$ — ширина полосы поглощения



Ширина спектральной щели $< \frac{1}{2} \Delta\lambda$

Спектр поглощения

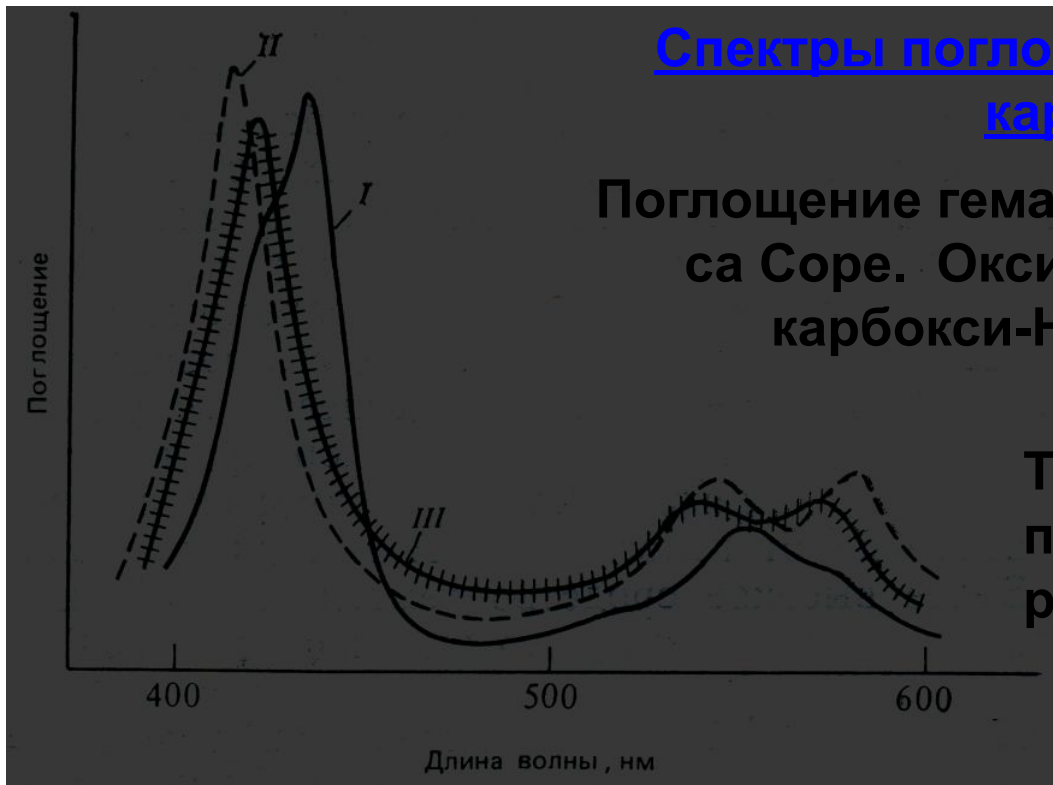
Спектр поглощения (абсолютный спектр поглощения) – зависимость количества поглощенного света от длины волны.

У каждого вещества спектр поглощения уникален – это его «молекулярный паспорт».

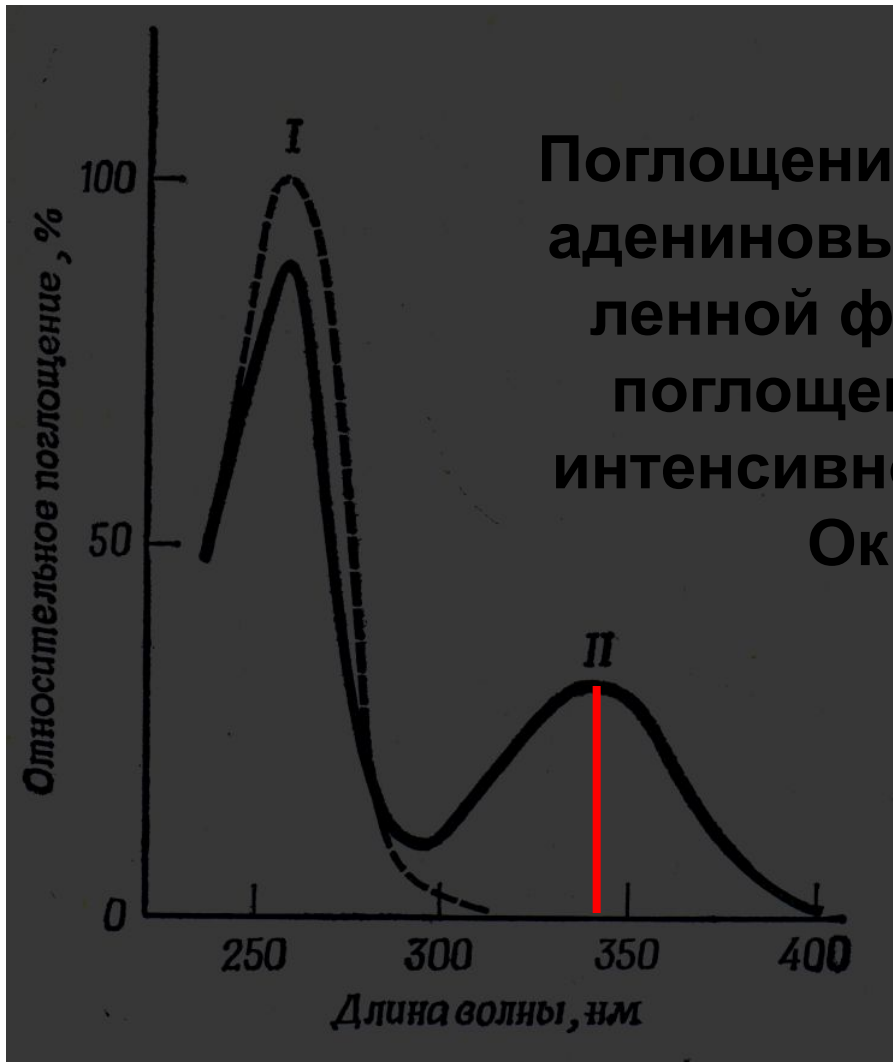
Спектры поглощения Hb (I), окси-Hb (II) и карбокси-Hb (III)

Поглощение гема идет в обл. 400 нм – полоса Soret. Окси-Hb при: ~414 и 543 нм; карбокси-Hb при: 420 и 560 нм.

Точные положения пиков поглощения уникальны для различных видов животных.



Спектр поглощения окисленной (I) и восстановленной (II) форм пиридиновых нуклеотидов (НАД и НАДФ).



Поглощение при λ 260 нм обусловлено адениновым кольцом. Для восстановленной формы характерно снижение поглощения при 260 нм и появление интенсивного поглощения при 340 нм. Окисленная форма поглощает только при 260 нм.

Аппаратура для абсорбционной спектроскопии

1. Фотоколориметр (фотометр, колориметр):

Единственный источник света

Спектральный диапазон: λ 315 – 700 нм

λ задается светофильтрами (иногда дифракционной
решеткой)

Светофильтр выделяет **полихромный** световой поток

Для измерений используют кюветы из оптического

стекла

2. Спектрофотометр:

Для УФ и видимой областей – отдельные источники света

Спектральный диапазон: λ 200 – 1000 нм

λ задается монохроматором

Монохроматор выделяет **монохромный** световой поток

Для измерений в УФ-диапазоне используются **кюветы из кварцевого стекла.**

Область применения абсорбционной спектроскопии:

- 1. Измерение C вещества в растворе (количественный анализ);**
- 2. Регистрация течения химических превращений;**
- 3. Идентификация веществ в растворе (спектр поглощения – «молекулярный паспорт» вещества – качественный анализ);**
- 4. Регистрация изменений физико-химических свойств молекул (денатурация-ренатурация ДНК) и т.д.**

**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ
СПЕКТРОСКОПИЯ
(ФЛУОРИМЕТРИЯ)**

Флуориметрия

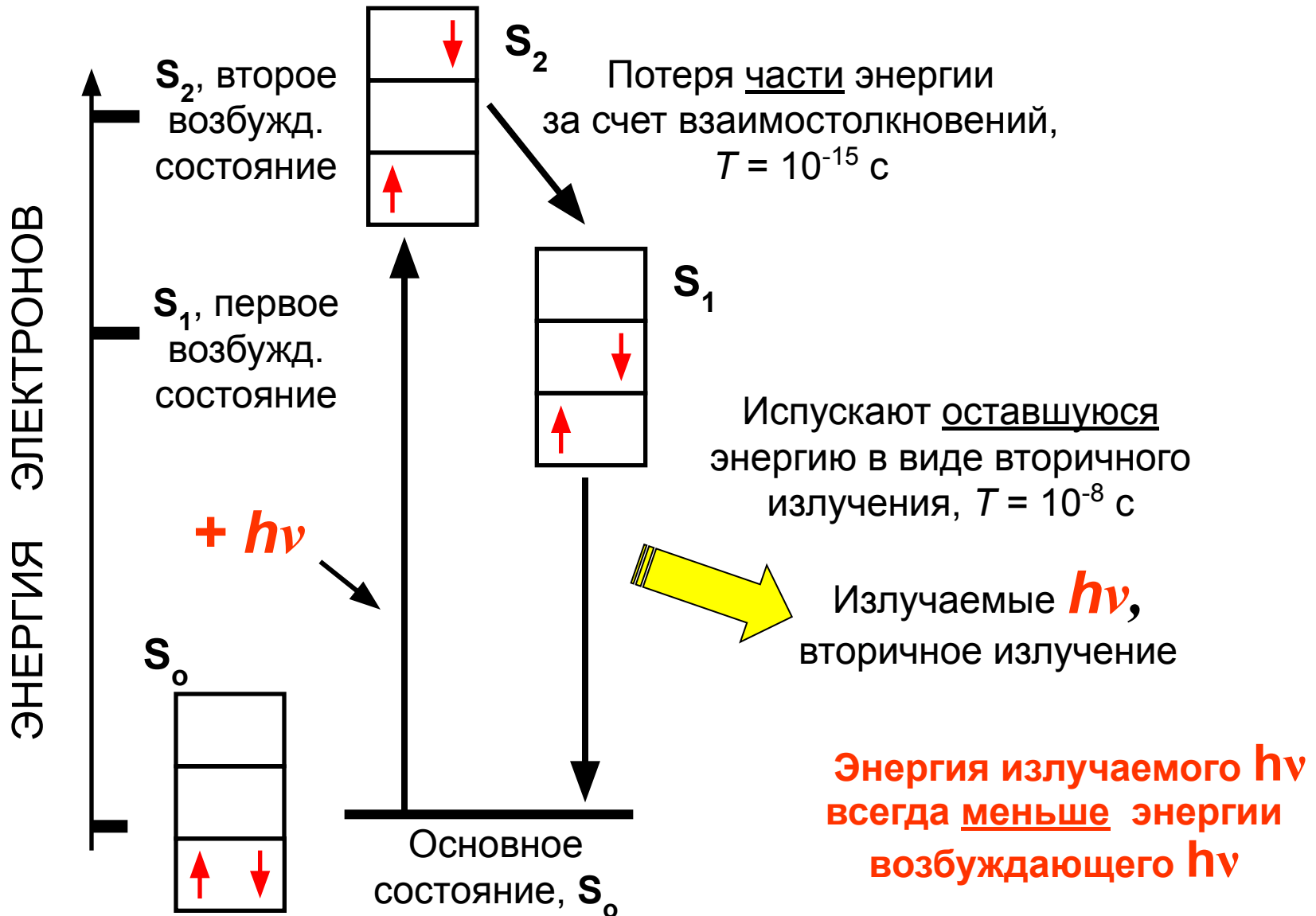
Флуоресценция – испускание света молекулой, возбужденной световым излучением. (Свечение молекул также можно инициировать химической реакцией – хемилюминесценция).

Некоторые вещества содержат в своем составе функциональные группы – **флуорофоры**, которые поглощают кванты возбуждающего светового излучения и обеспечивают **флуоресценцию** – испускание вторичного светового излучения (вторичного светового потока).

Полагают, что для флуорофорной группы характерно наличие асимметричного атома углерода.

Флуориметрия – регистрация интенсивности вторичного светового излучения (потока).

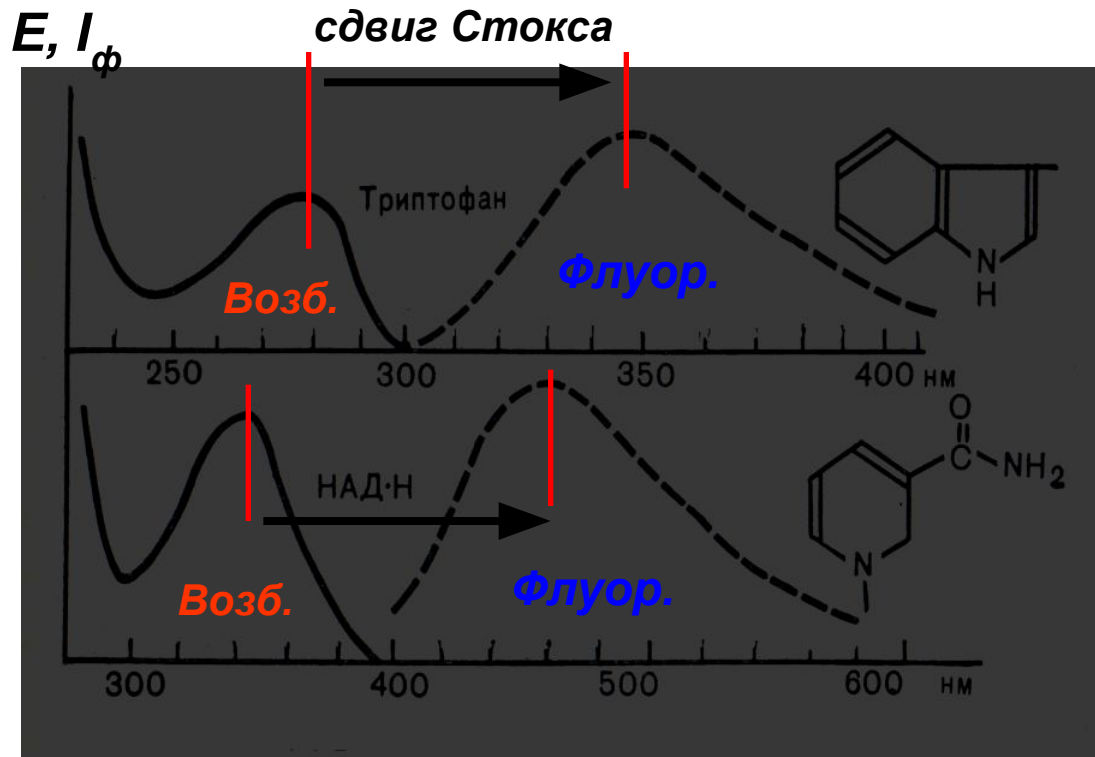
Природа флуоресценции



Спектры возбуждения и спектры флуоресценции

Спектр возбуждения - зависимость количества поглощенного света от длины волны (то же, что спектр поглощения).

Спектр флуоресценции – интенсивность флуоресценции (I_{ϕ}), измер. при различных длинах волн.



Сдвиг Стокса – энергия кванта флуоресценции всегда меньше энергии кванта возбуждения –
- **тах. флуоресценции сдвинут в длинноволновую область**

Основные закономерности флуоресценции

1. Флуоресценция происходит при любой длине волны возбуждающего света.

2. Q (квантовый выход флуоресценции):

$$Q = \frac{\text{число квантов флуоресценции}}{\text{число поглощенных квантов}}$$

3. **Закон Вавилова:** Q не зависит от длины волны возбуждающего света.

Зависимость I_{ϕ} от концентрации вещества

$$I_{\phi} = I_o \times Q \times C$$

I_o – интенсивность возбуждающего света;

Q – квантовый выход;

C – концентрация вещества

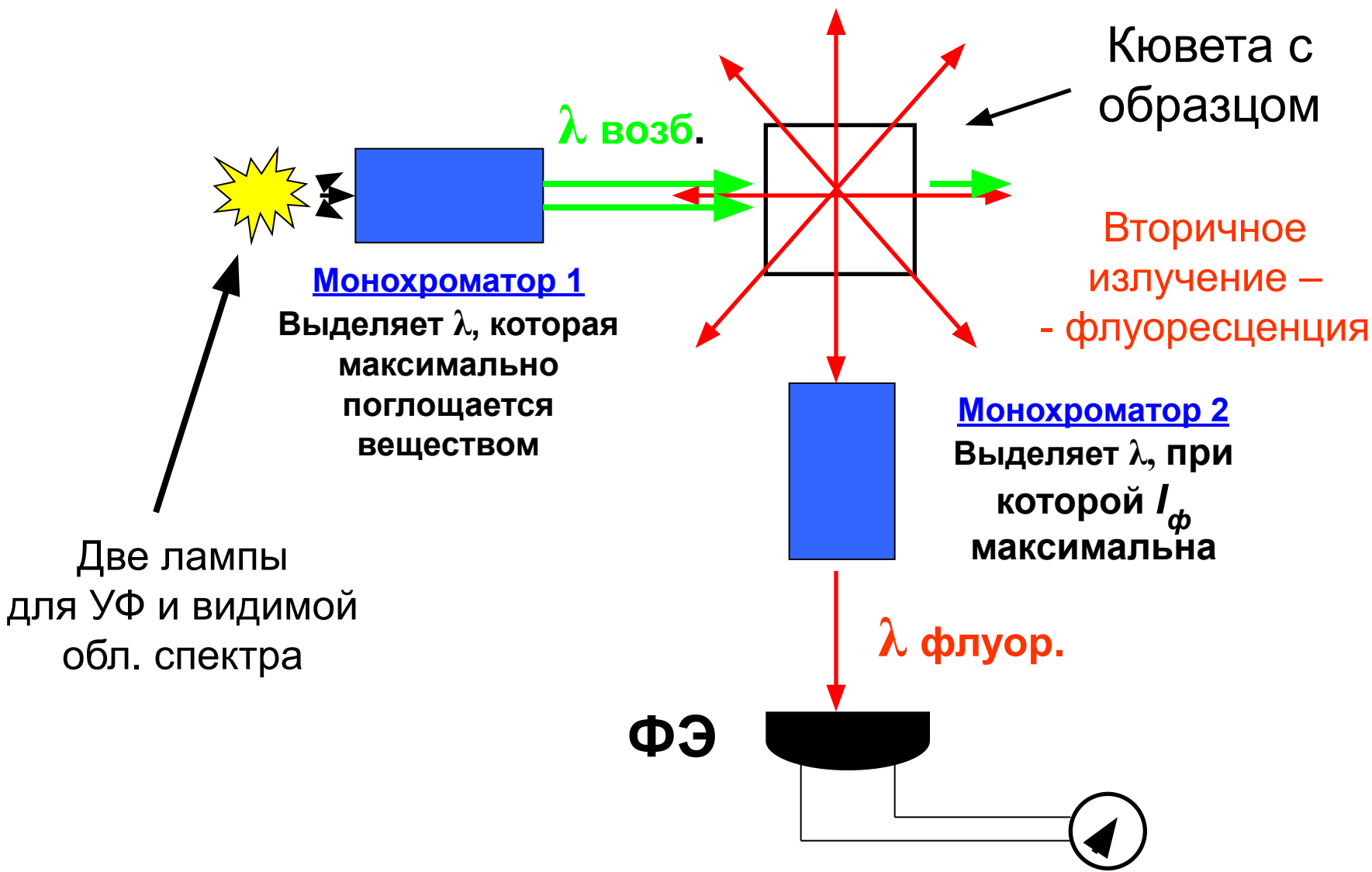
Флуоресцентный анализ на порядок чувствительней, чем спектрофотометрия. Для соблюдения линейной зависимости I_{ϕ} от C , содержание флуорофора в кювете не должно превышать 5% от её объема.

Для того, чтобы в полной мере реализовать высокую чувствительность, свойственную флуориметрии, необходимо:

- возбуждать флуоресценцию при максимуме поглощения;**
- регистрировать флуоресценцию при длине волны, при которой интенсивность флуоресценции максимальна.**

Для количественно анализа требуется калибровочный график ($I_{\text{ф}}$ от C) или раствор стандарта (раствор флуорофора с известной концентрацией).

Устройство спектрофлуориметра (вид сверху)



Применение флуориметрии

1. **Высококчувствительный и высокоспецифичный количественный анализ (в том числе, в энзимологии).**
2. **Качественный анализ – спектры возбуждения и флуоресценции уникальны.**
3. **Возможность работы с суспензиями живых клеток и субклеточных структур (мутность пробы не имеет значения).**
Главное – избегать условий, при которых происходит тушение флуоресценции.
4. **С использованием флуоресцентных зондов и меток – можно изучать структуру биомолекул, свойства биомембран, оценивать трансмембранный потенциал, активность транспортных и др. процессов и состояний.**

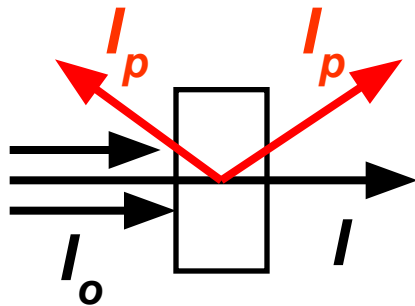
СВЕТОРАССЕИВАНИЕ

Методы, основанные на измерении светорассеивания

Светорассеивание, обусловленное частицами, взвешенными в растворе (преципитат в результате взаимодействия антигена и антитела).

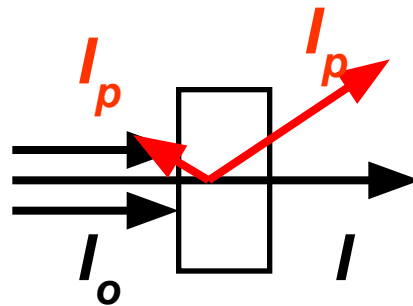
Теория светорассеивания разработана Рэлеем: $I_p = \frac{1}{\lambda^4}$

А. $D_{\text{частицы}} < 1/10 \lambda$



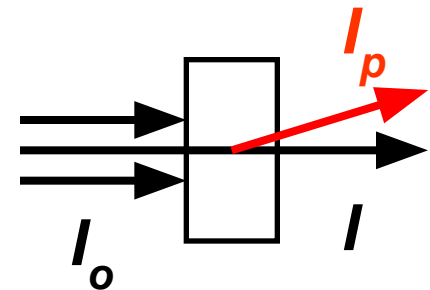
Рассеивание идет симметрично

Б. $D_{\text{частицы}} > 1/10 \lambda$



Рассеивание идет не симметрично

В. $D_{\text{частицы}} > \lambda$



Рассеянный свет почти совпадает с прошедшим

1. Турбидиметрия (англ. «turbidity» – мутность).

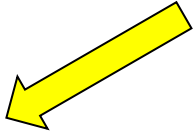
Метод основан на измерении интенсивности прошедшего через образец (не рассеянного) света.

Реализуется с помощью обычного фотометра. Выбирают светофильтр, обеспечивающий световой поток с минимальной λ . Метод эффективен, если образец рассеивает не менее 10% от величины I_0 .

2. Нефелометрия.

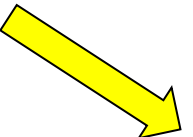
Метод основан на измерении интенсивности рассеянного образцом света. Метод более чувствителен, чем турбидиметрия, реализуется с помощью специального прибора – **нефелометра**. Через образец пропускают свет с $\lambda = 600-700$ нм (при большой λ шире диапазон D частиц, рассеивающих свет).

Пламенная фотометрия



Эмиссионная
пламенная
фотометрия

Регистрация интенсивности
излучения пламени
при определенной λ



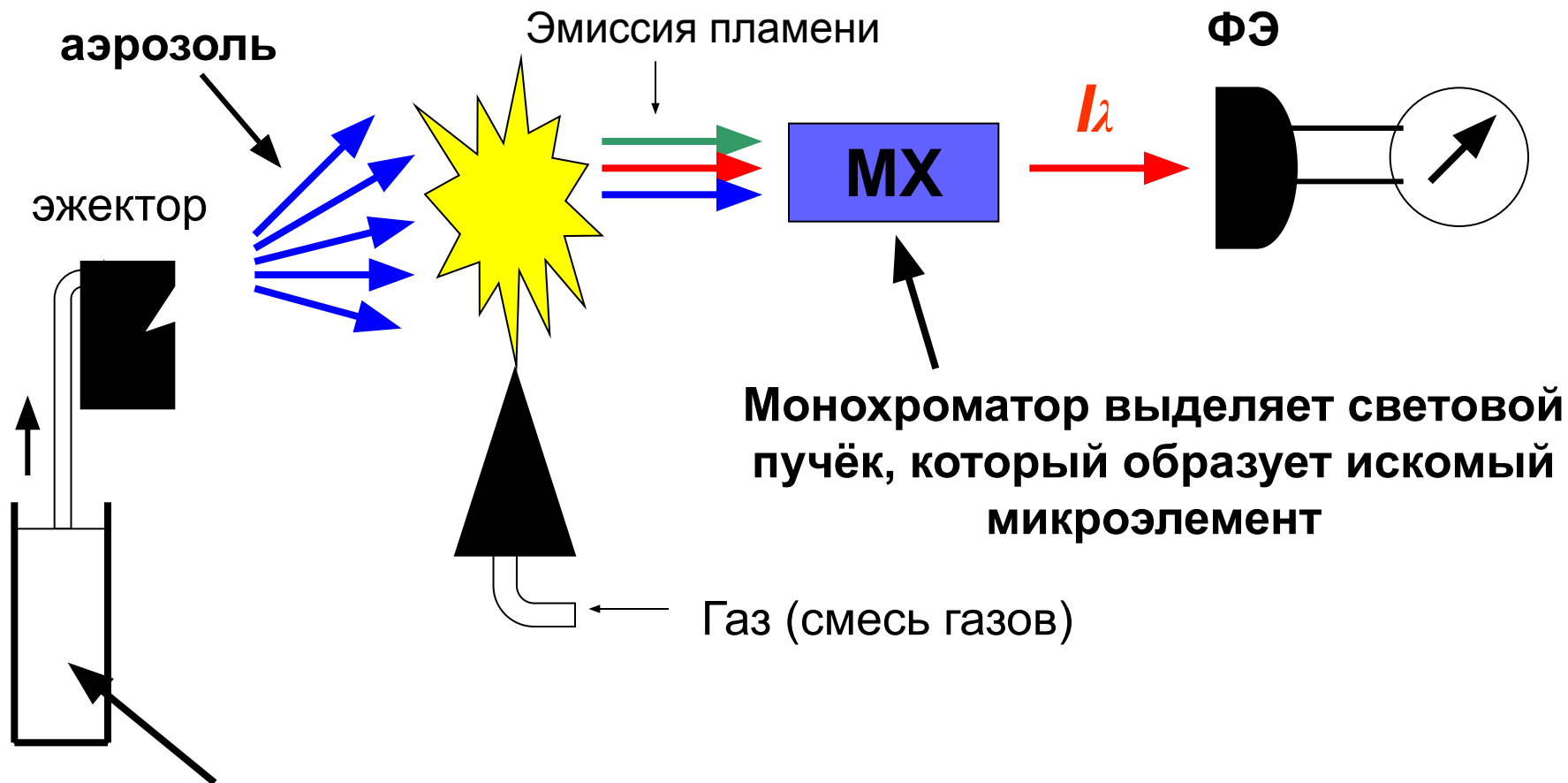
Абсорбционная
фотометрия
пламени

Регистрация поглощения
пламенем проходящего
через него излучения
с определенной λ

Соли металлов, сгорая в пламени ($T \geq 1500^\circ \text{C}$), совершают переход: **основное состояние** $\square\square$ **возбужденное состояние**. Эти явления лежат в основе:

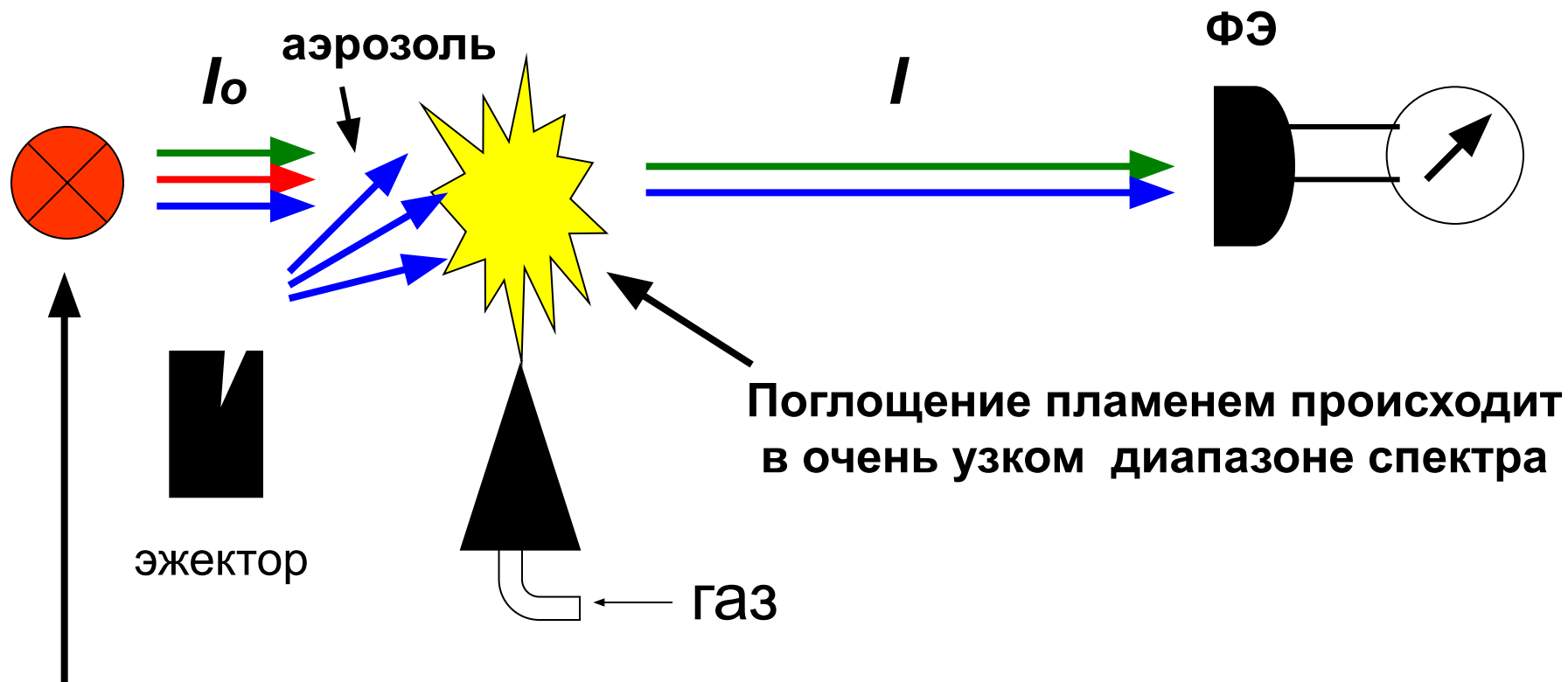
- Испускания пламенем излучения с определенной λ .
- Поглощения пламенем проходящего через него излучения с определенной λ .

Эмиссионная пламенная фотометрия – пламенный фотометр



Анализируемый материал разводят в 50-100 раз для обеспечения стандартного размер частиц получаемого аэрозоля.

Абсорбционная фотометрия пламени- пламенный фотометр



Лампа специальной конструкции - позволяет получать излучение с λ , характерной для искомого микроэлемента. **Для каждого микроэлемента – индивидуальная лампа.**

Применение пламенной фотометрии

Этот методический подход позволяет определять широкий диапазон химических элементов в растворах (более 20 элементов): Na, K, Ca, Li, Mg, Mn, Fe, Ti, Zn, V и др.

Пламенная фотометрия более точный и чувствительный метод по сравнению с химическими методами – комплексонометрия.

Ионселективные электроды могут полностью заменить пламенную фотометрию только для определения концентрации диагностически значимых электролитов в биологических жидкостях пациента (сыворотка, плазма, моча, спинномозговая жидкость и т.д.).

Различные химические элементы требуют разную температуру пламени для их количественного определения:

$T > 1500^{\circ} \text{C}$ (метан): Na, K

$T > 2500^{\circ} \text{C}$ (воздух + ацетилен): Mg, Fe, Ca

$T > 3000^{\circ} \text{C}$ (азот + ацетилен): Ti, V