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 корректныи использованием выбранных методических приемов.

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

УФ и видимый диапазоны спектра

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

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

A – 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:

- Высокочувствительного качественного анализа сложных смесей веществ.
- Высокочувствительного 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 <u>порциями</u>. 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:

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

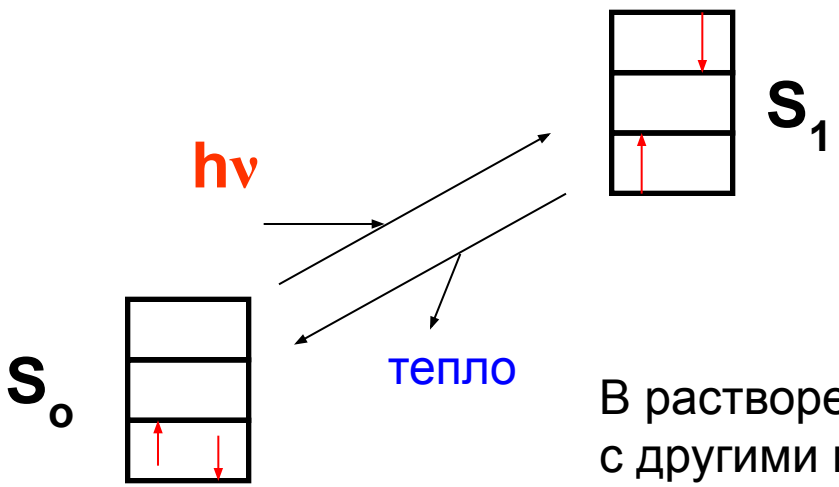
Этим объясняется феномен: разные вещества (хромофоры) поглощают световые излучения с разной длиной волны (λ).

Основное и возбужденное состояния вещества

Основное (невозбужденное) состояние вещества (S_o) – 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)

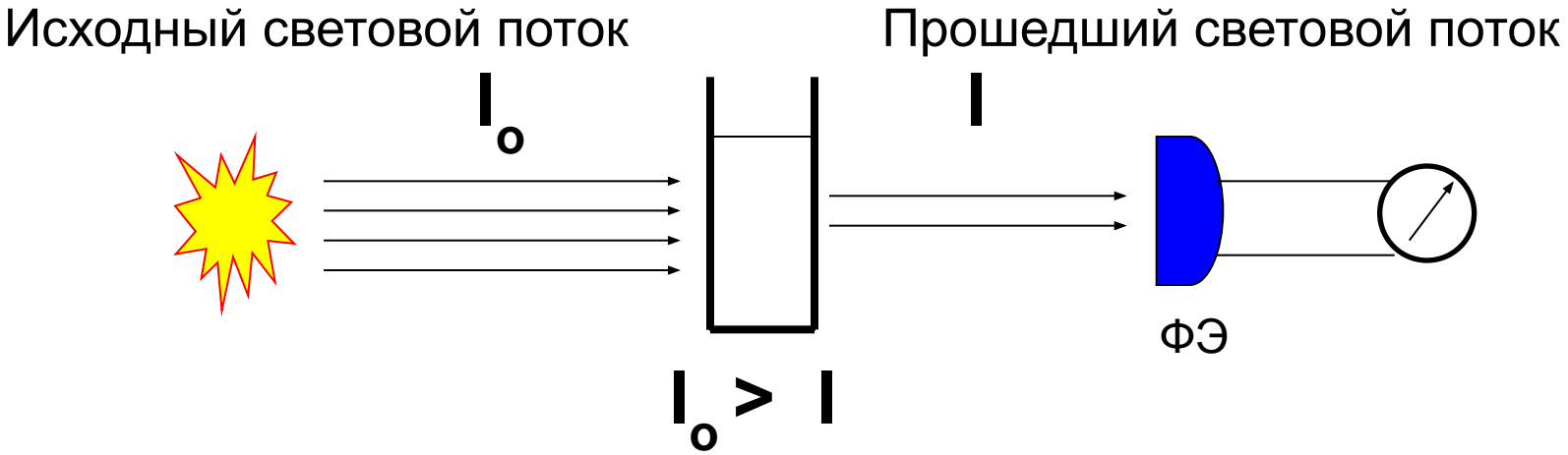


Электроны переходят с орбиталей нижних энергетических уровней на орбитали с высоким энергетическим уровнем (спин e^- сохраняется).

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_o.

Поглощение светового излучения средой описывает закон Ламберта-Бугера-Бэра



Как измерить интенсивность прошедшего светового потока?

%T (светопропускание) = I x 100% / I_o

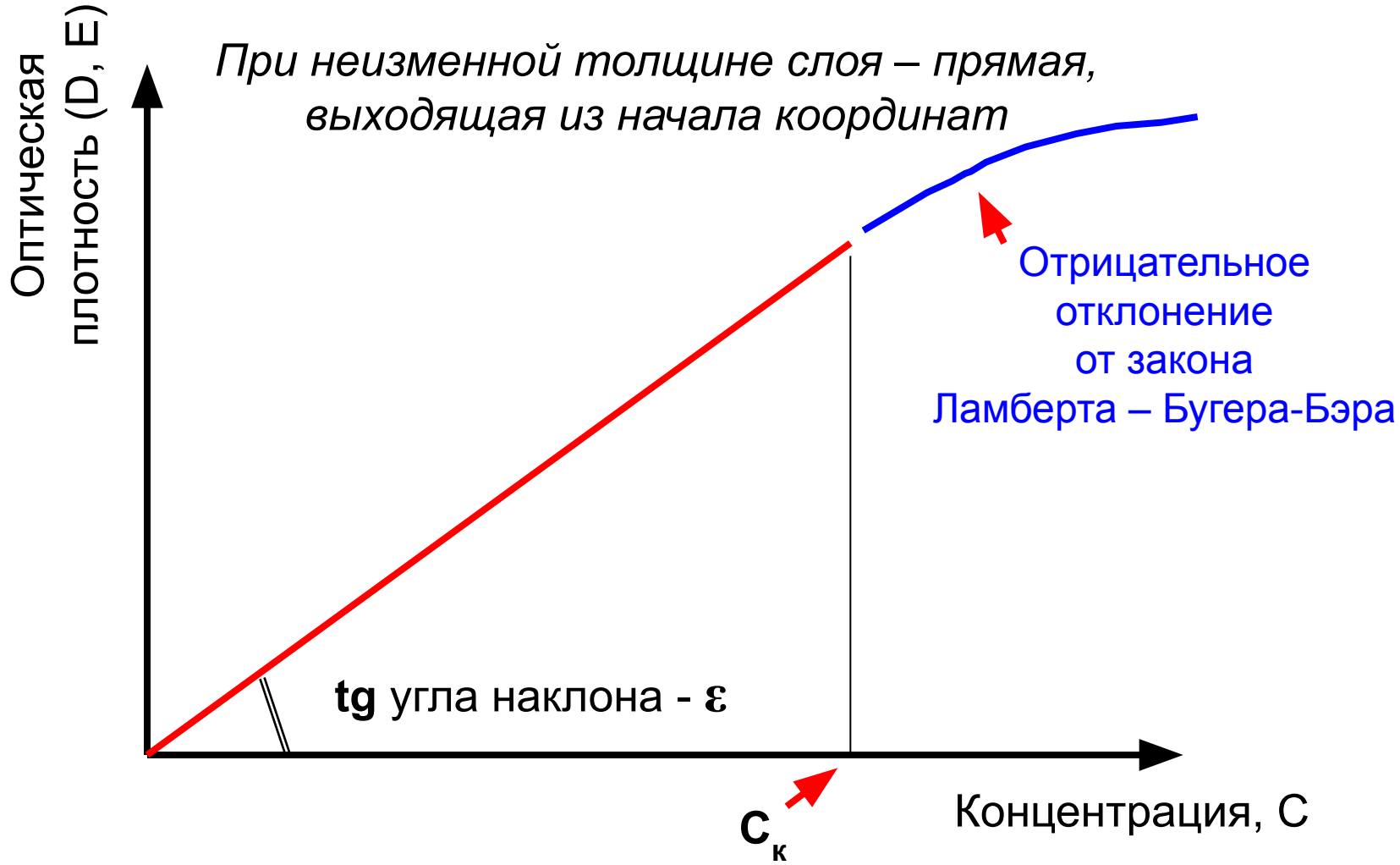
E, A, D (экстинкция, оптическая плотность) = lg I_o/ I

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;

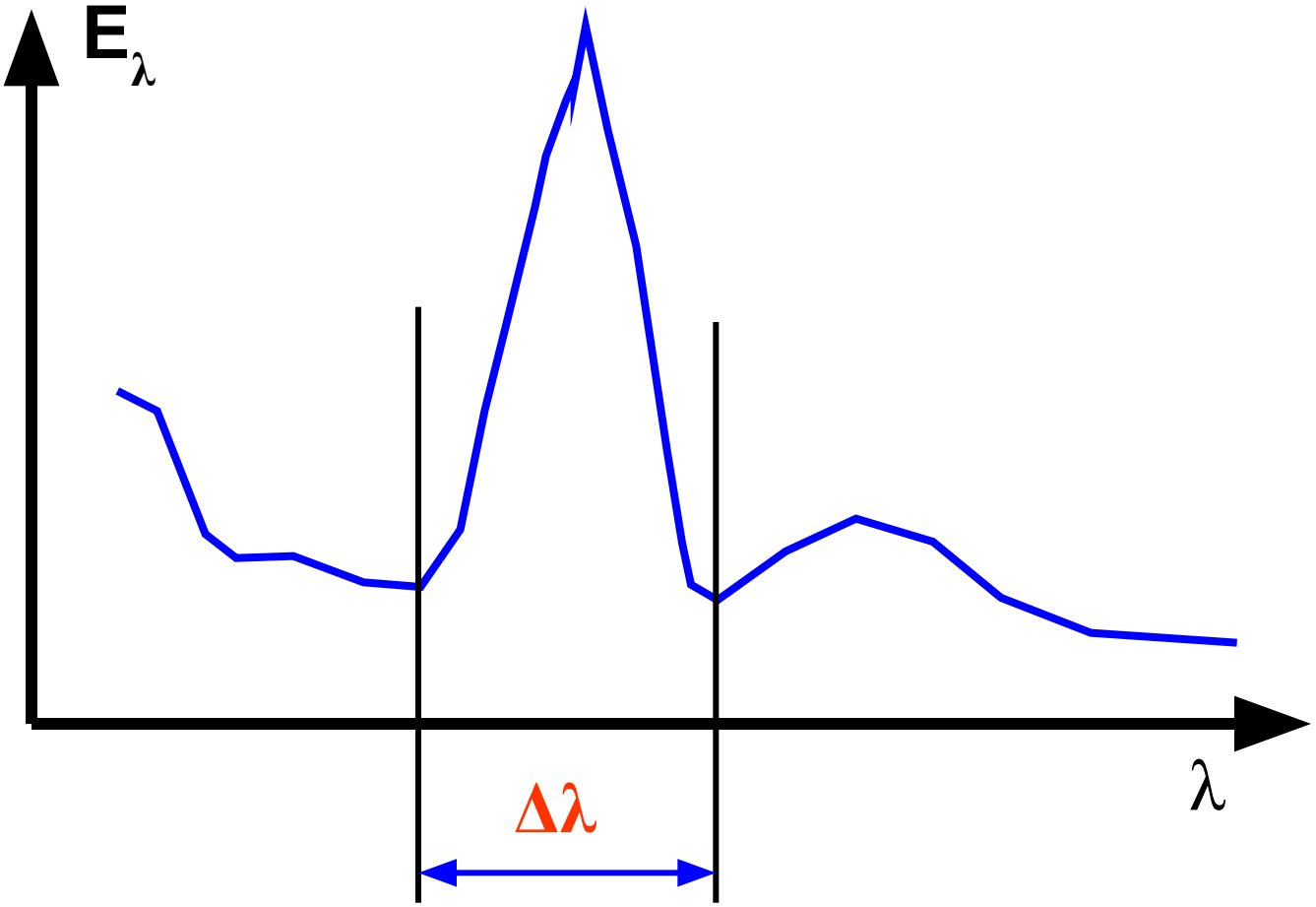
- флуоресценция анализируемого вещества в растворе. Весь вторичный световой поток попадает на фотоэлемент. При большой толщине слоя – происходит тушение флуоресценции;

- немонохроматичность падающего на образец света (I_o) 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

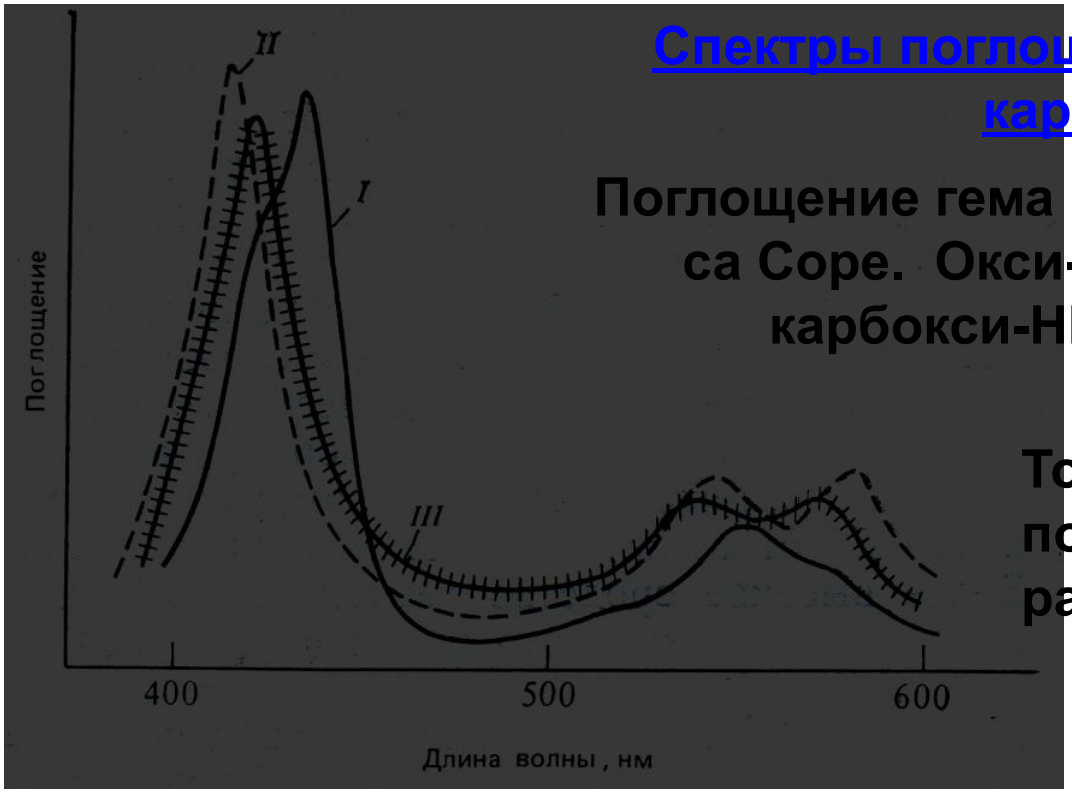


Ширина спектральной щели < ½ $\Delta\lambda$

Спектр поглощения

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

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

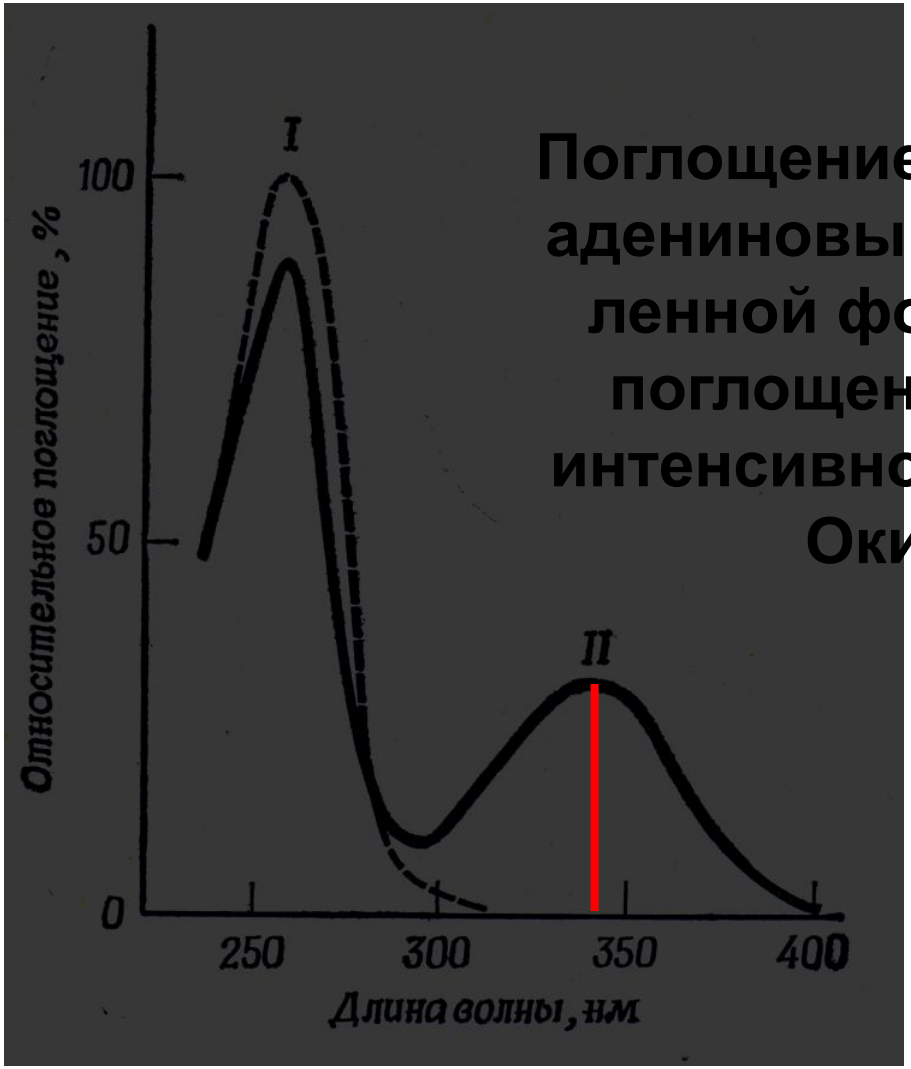


Спектры поглощения Hb (I), окси-Hb (II) и карбокси-Hb (III)

Поглощение гема идет в обл. 400 нм – полоса Соре. 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)

   <u>Светофильтр</u> 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

   <u>Монохроматор</u> выделяет монохромный световой поток

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

Область применения абсорбционной спектроскопии:

1. Измерение С 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

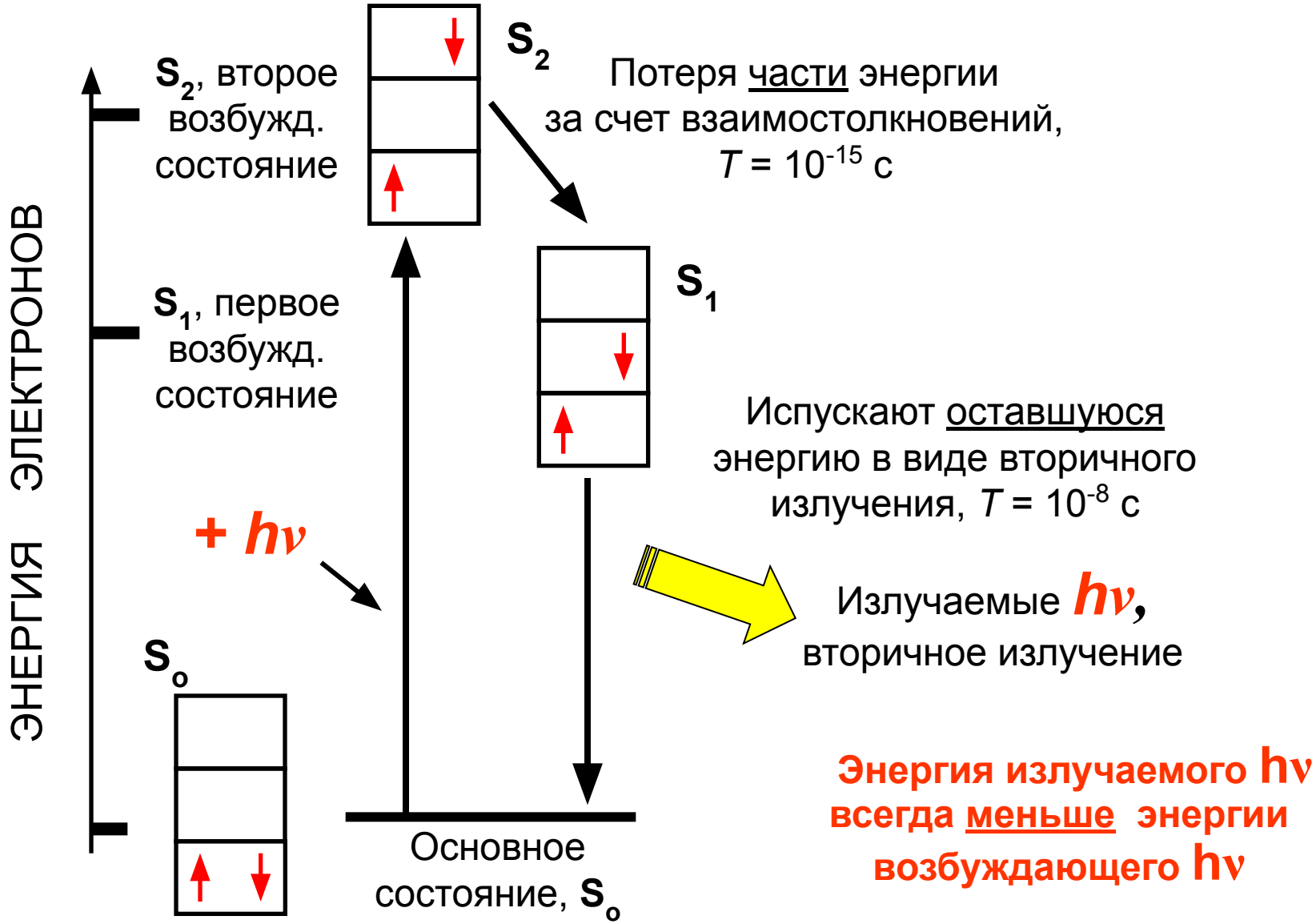
Флуоресценция – испускание света молекулой, возбужденной световым излучением. (Свечение молекул также можно инициировать химической реакцией – хемилюминесценция).

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).

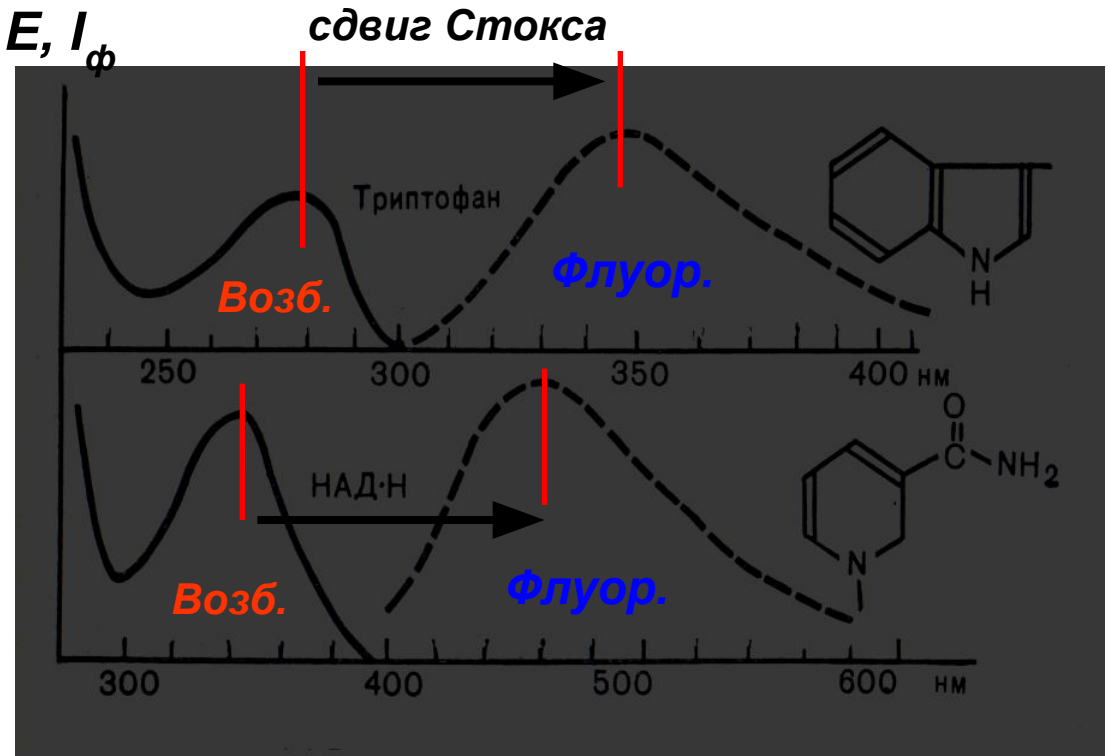
Природа флуоресценции



Спектры возбуждения и спектры флуоресценции

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

Спектр флуоресценции – интенсивность флуоресценции ($I_ф$), измер. при различных длинах волн.



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

Основные закономерности флуоресценции

1. Флуоресценция происходит при любой длине волны возбуждающего света.

2. *Q* (квантовый выход флуоресценции):

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

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

Зависимость $I_ф$ от концентрации вещества

$$I_ф = I_o \times Q \times C$$

I_o – интенсивность возбуждающего света;

Q – квантовый выход;

C – концентрация вещества

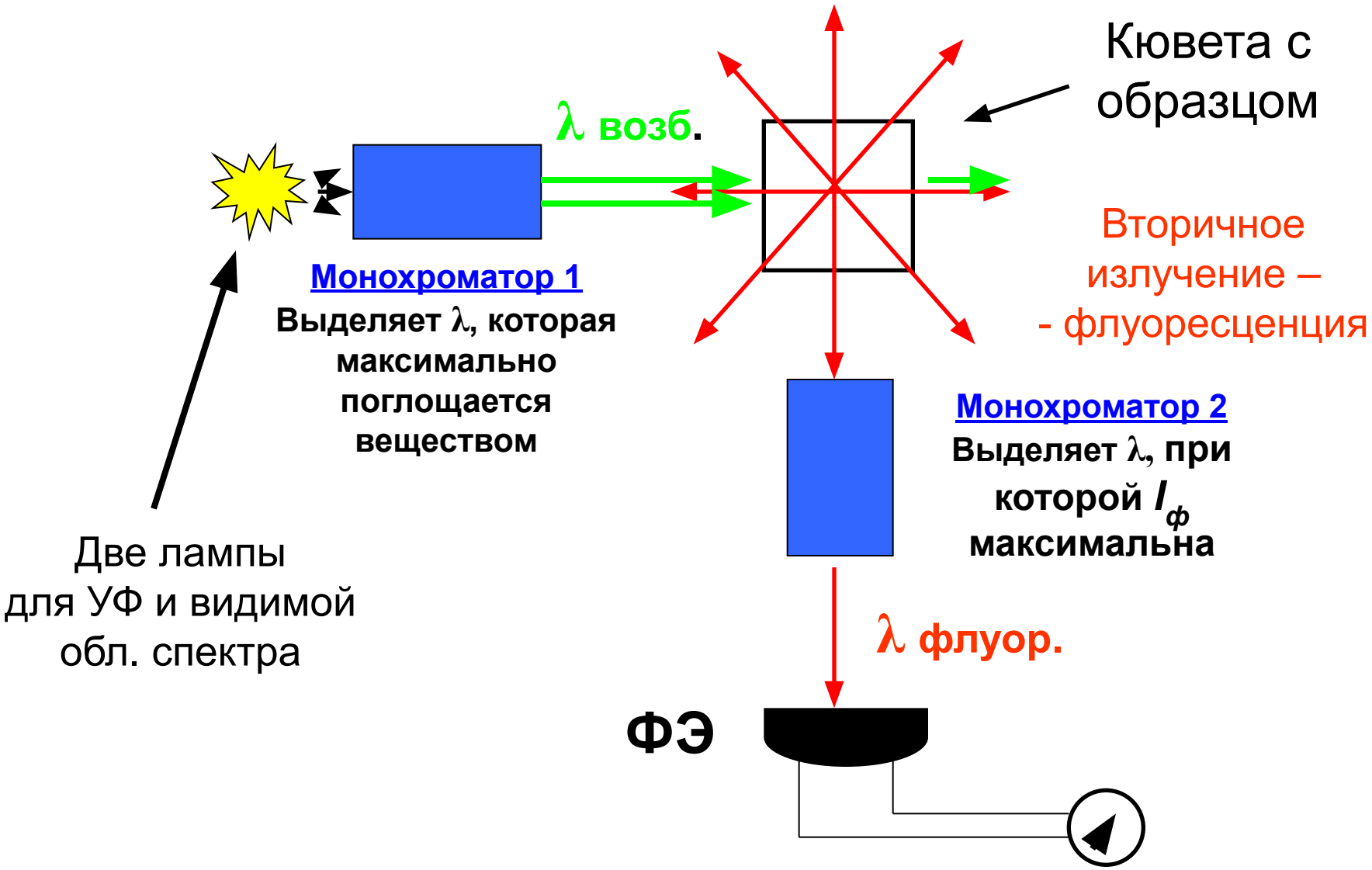
Флуоресцентный анализ на порядок чувствительней, чем спектрофотометрия. Для соблюдения линейной зависимости $I_ф$ от C, содержание флуорофора в кювете не должно превышать 5% от её объема.

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 ($I_ф$ от С) или раствор стандарта (раствор флуорофора с известной концентрацией).

Устройство спектрофлуорметра (вид сверху)



Применение флуориметрии

1. Высокочувствительный и высокоспецифичный количественный анализ (в том числе, в энзимологии).

2. Качественный анализ – спектры возбуждения и флуресценции 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.

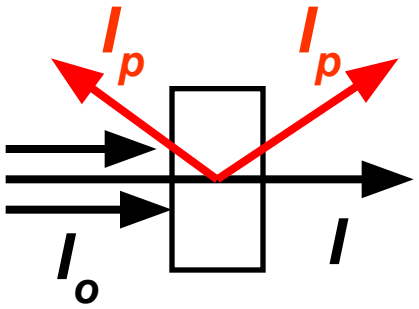
СВЕТОРАССЕИВАНИЕ

Методы, основанные на измерении светорассеивания

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

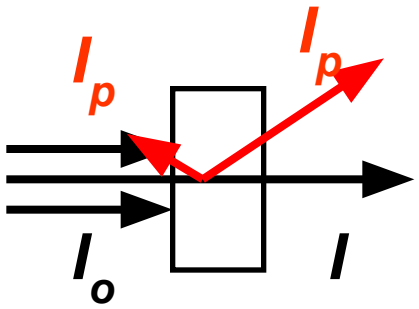
Теория светорассеивания разработана Рэлеем: $I_p = \frac{1}{\lambda^4}$

А. $D_{частицы} < 1/10\ \lambda$



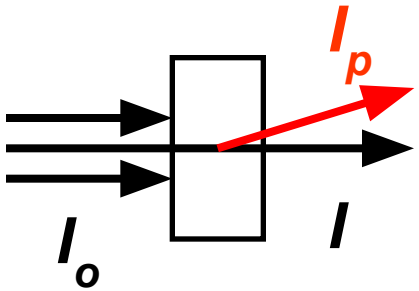
Рассеивание идет симметрично

Б. $D_{частицы} > 1/10\ \lambda$



Рассеивание идет не сим-метрично

В. $D_{частицы} > \lambda$



Рассеянный свет почти совпадает с прошедшим

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

Метод основан на измерении <u>интенсивности прошедшего</u> 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_o.

2. Нефелометрия.

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

Пламенная фотометрия

Эмиссионная пламенная фотометрия

Регистрация интенсивности излучения пламени при определенной λ

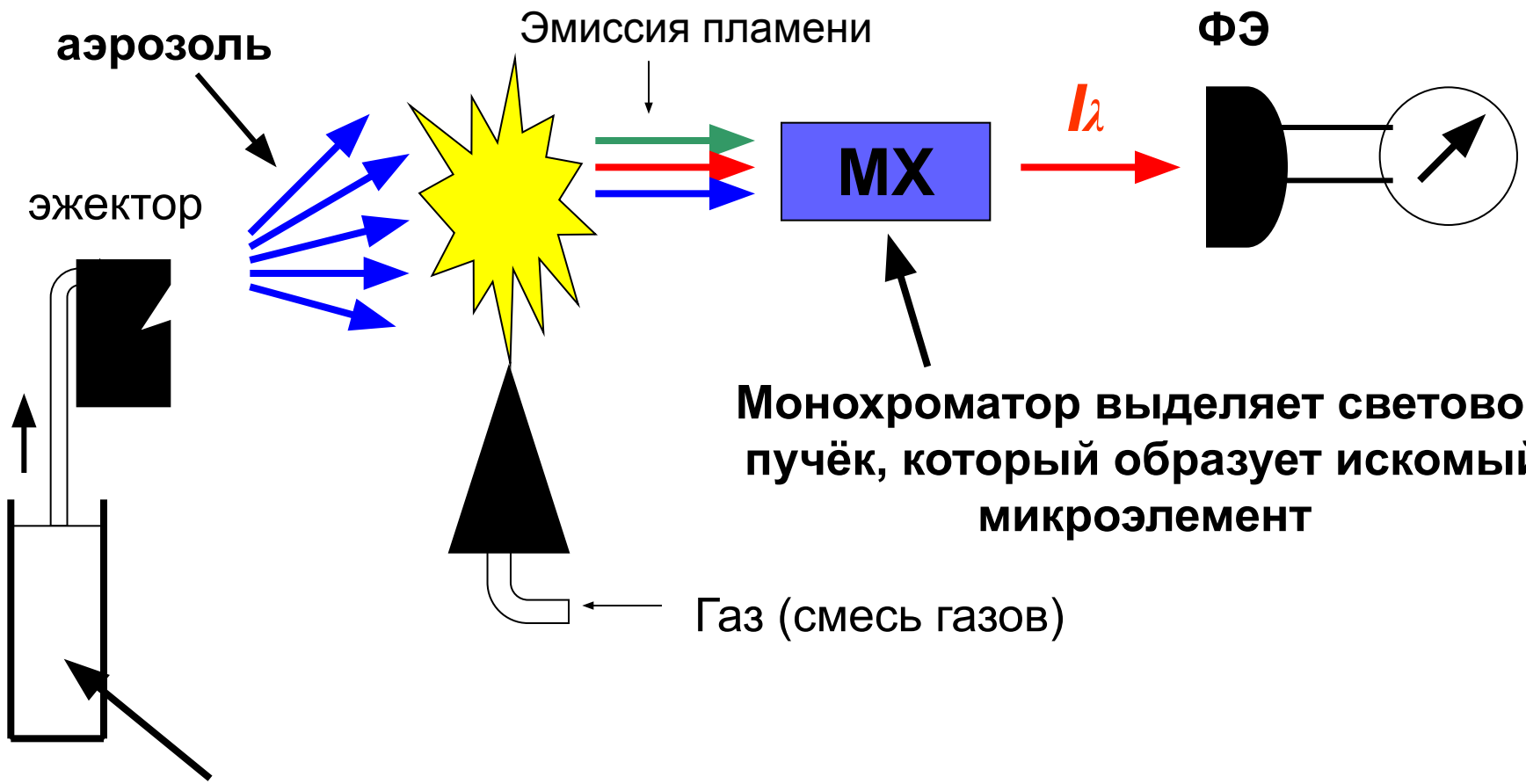
Абсорбционная фотометрия пламени

Регистрация поглощения пламенем проходящего через него излучения с определенной λ

Соли металлов, сгорая в пламени (T ≥1500° C), совершают переход: основное состояние □□ возбужденное состояние. Эти явления лежат в основе:

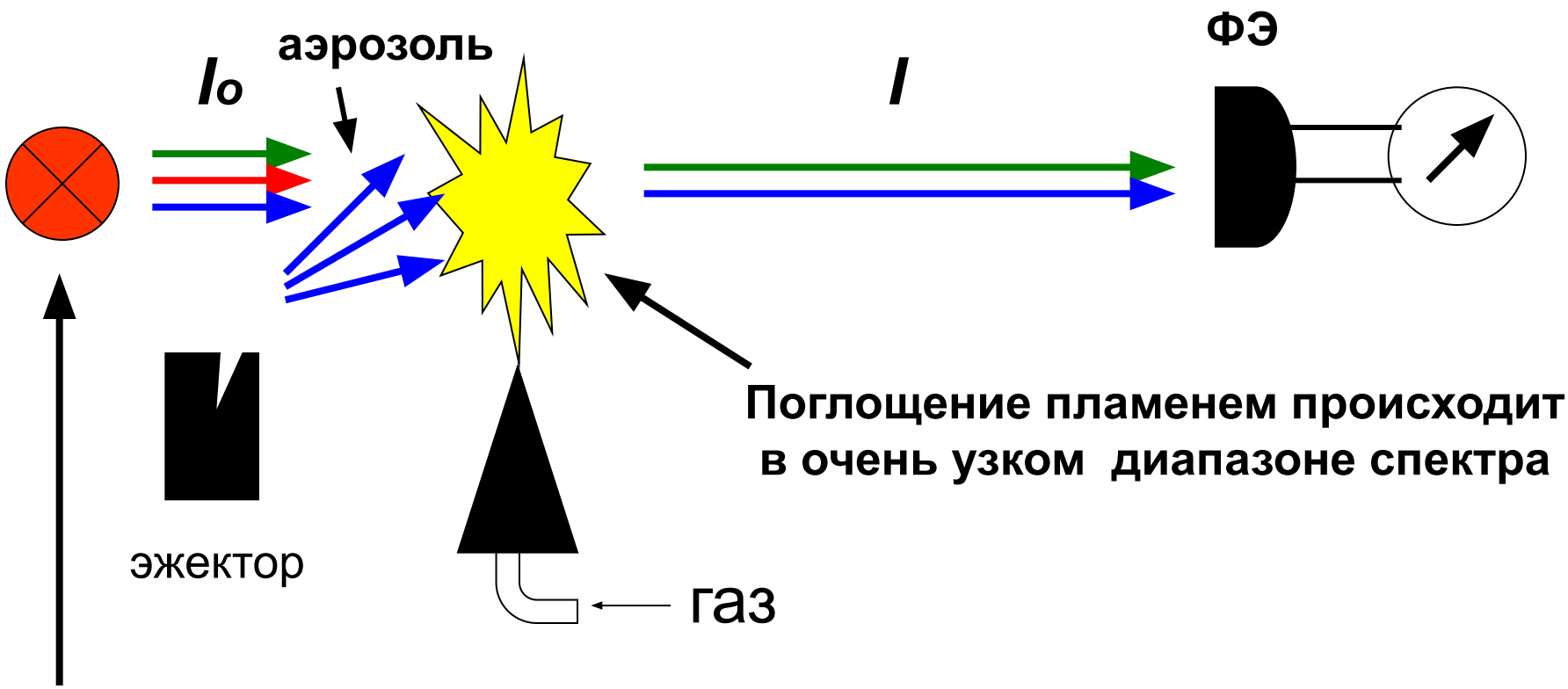
- **Испускания пламенем излучения с определенной λ.**
- **Поглощения пламенем проходящего через него излучения с определенной λ.**

Эмиссионная пламенная фотометрия – пламенный фотометр



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

Абсрбционная фотометрия пламени– <u>пламенный фотометр</u>



Лампа специальной конструкции - позволяет получать излучение с λ, характерной для искомого микроэлемента. Для каждого микро-элемента – 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° C (метан): Na, K

T > 2500° C (воздух + ацетилен): Mg, Fe, Ca

T > 3000° C (азот + ацетилен): Ti, V