

# 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**

**$\nu$ - частота, Гц**

**Энергия кванта прямо пропорциональна частоте ( $\nu$ ) и обратно пропорциональна длине волны ( $\lambda$ ).**

# 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:

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

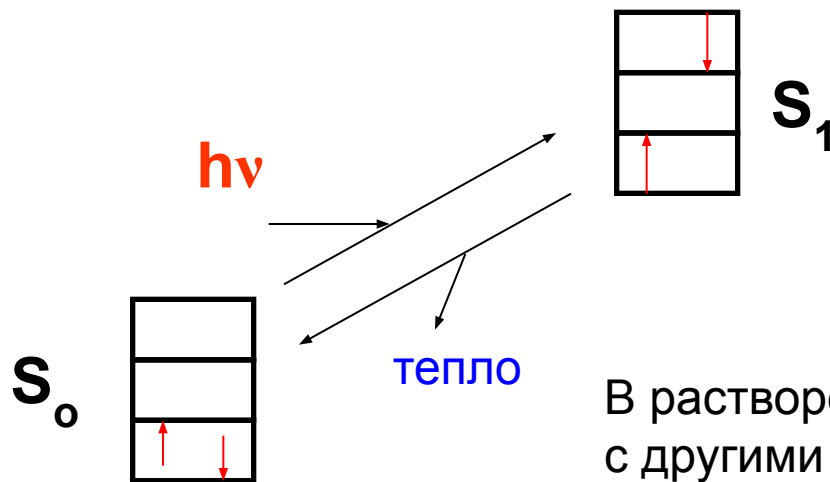
Этим объясняется феномен: разные вещества (хромофоры) поглощают световые излучения с разной длиной волны ( $\lambda$ ).

# 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)

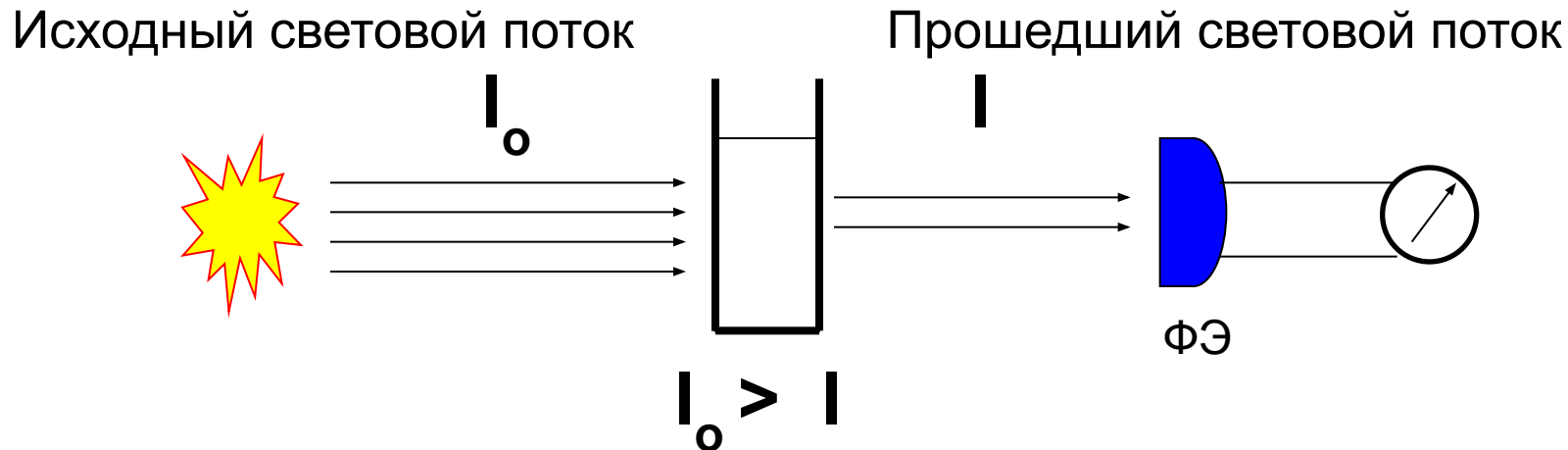


Электроны переходят с орбиталей нижних энергетических уровней на орбитали с высоким энергетическим уровнем (спин  $e^-$  сохраняется).

$S_1$  – 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?

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

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

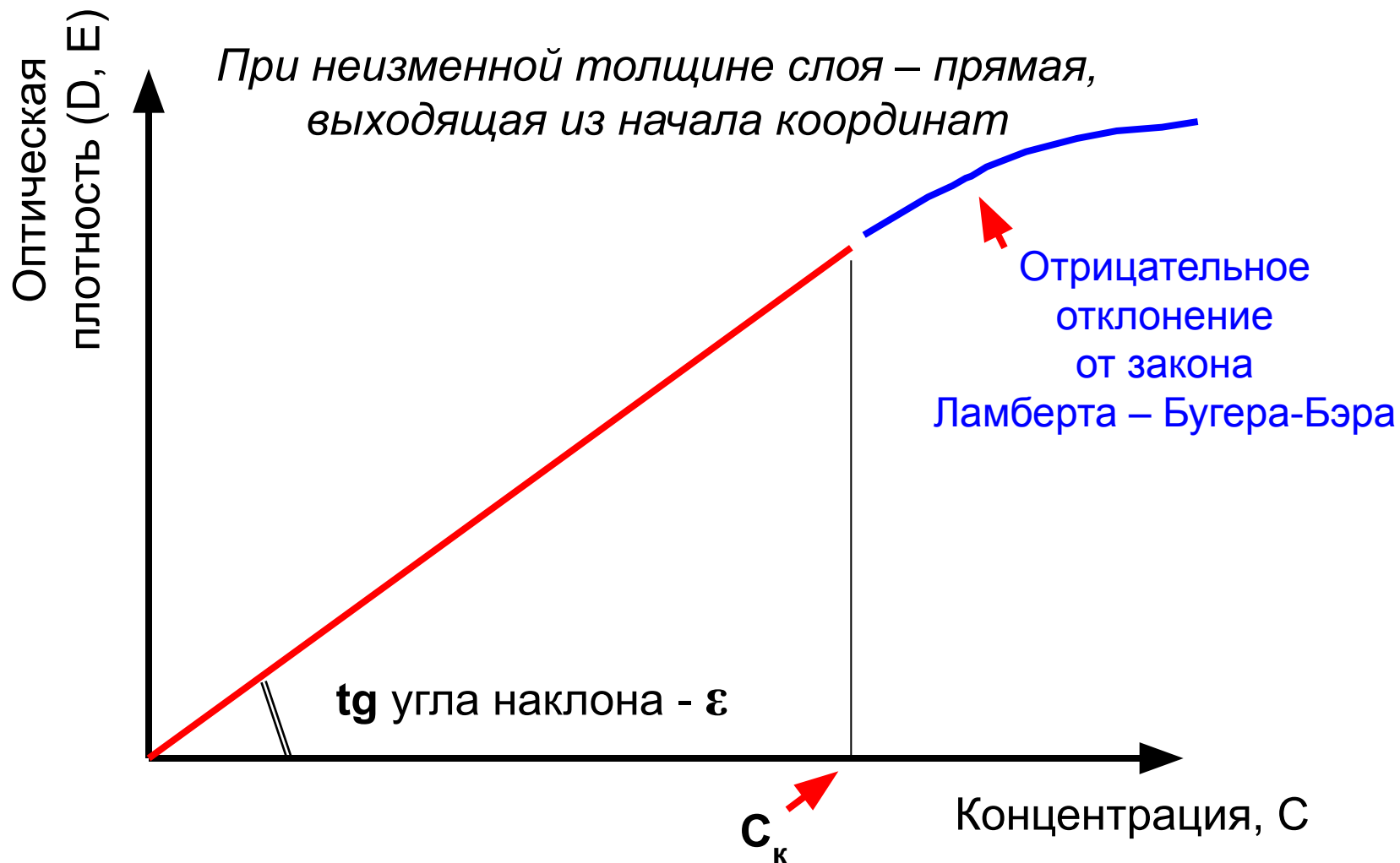
Закон выражает связь между E и C:

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

$C$  – *mol/l*;  $l$  – толщина слоя, см;  $\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции



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

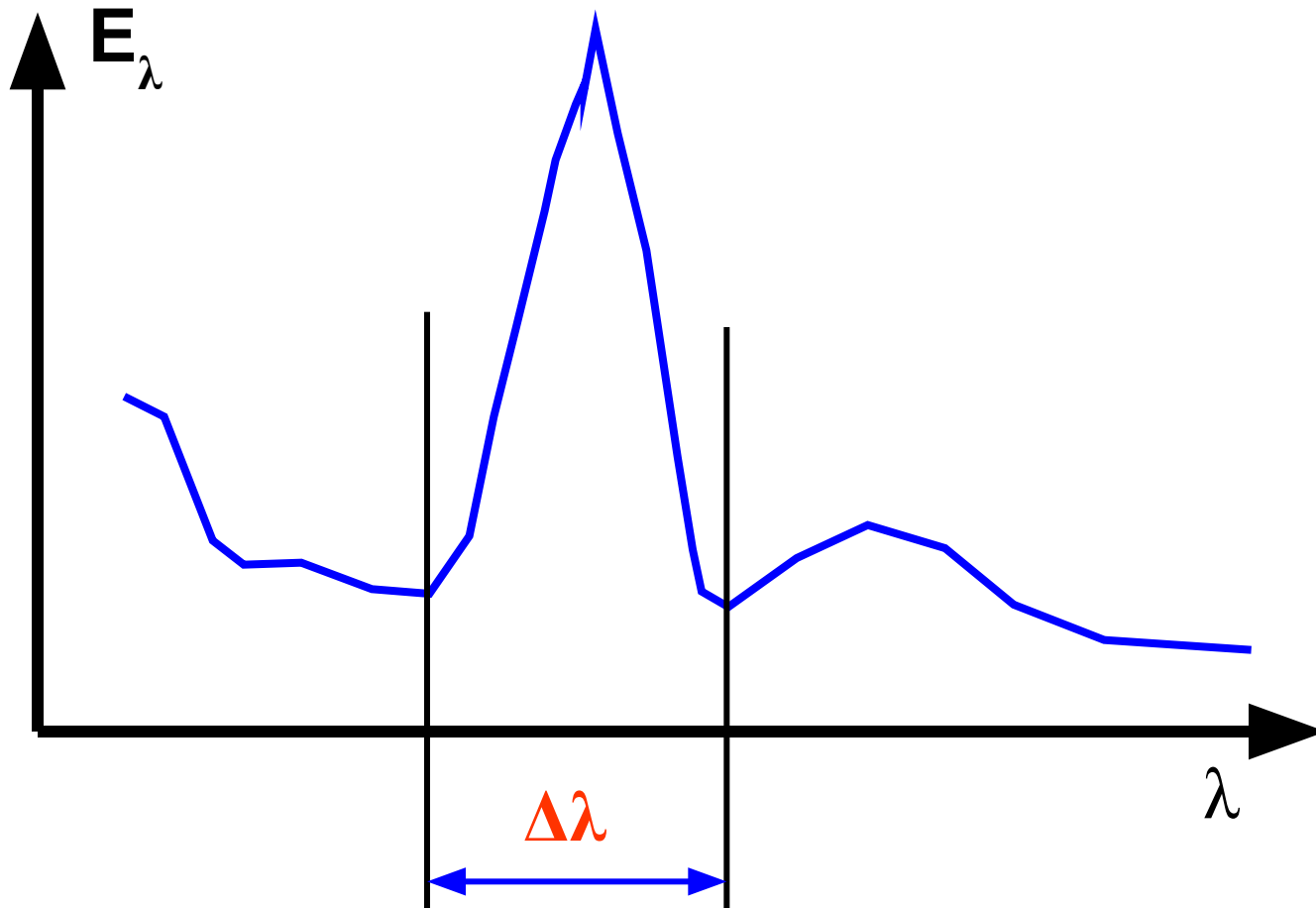


## Основные причины отклонений от закона Ламберта – Бугера-Бэра

- 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  $\lambda$ . 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

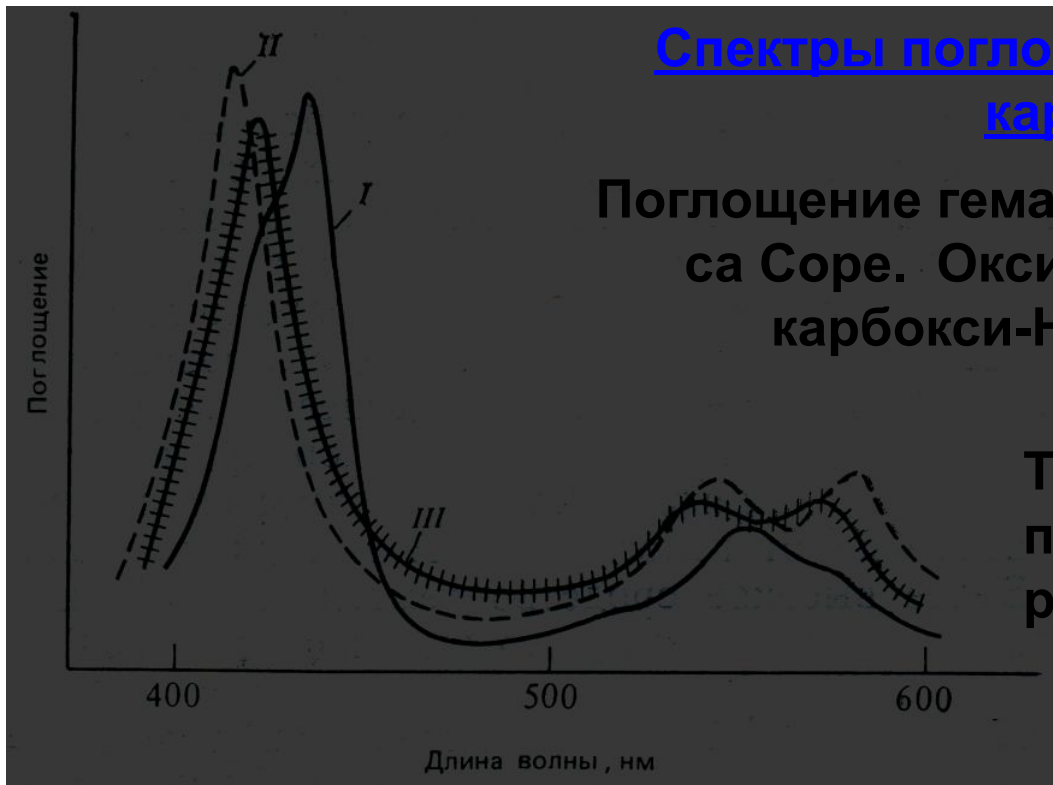
Спектр поглощения (абсолютный спектр поглощения) – зависимость количества поглощенного света от длины волны.

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

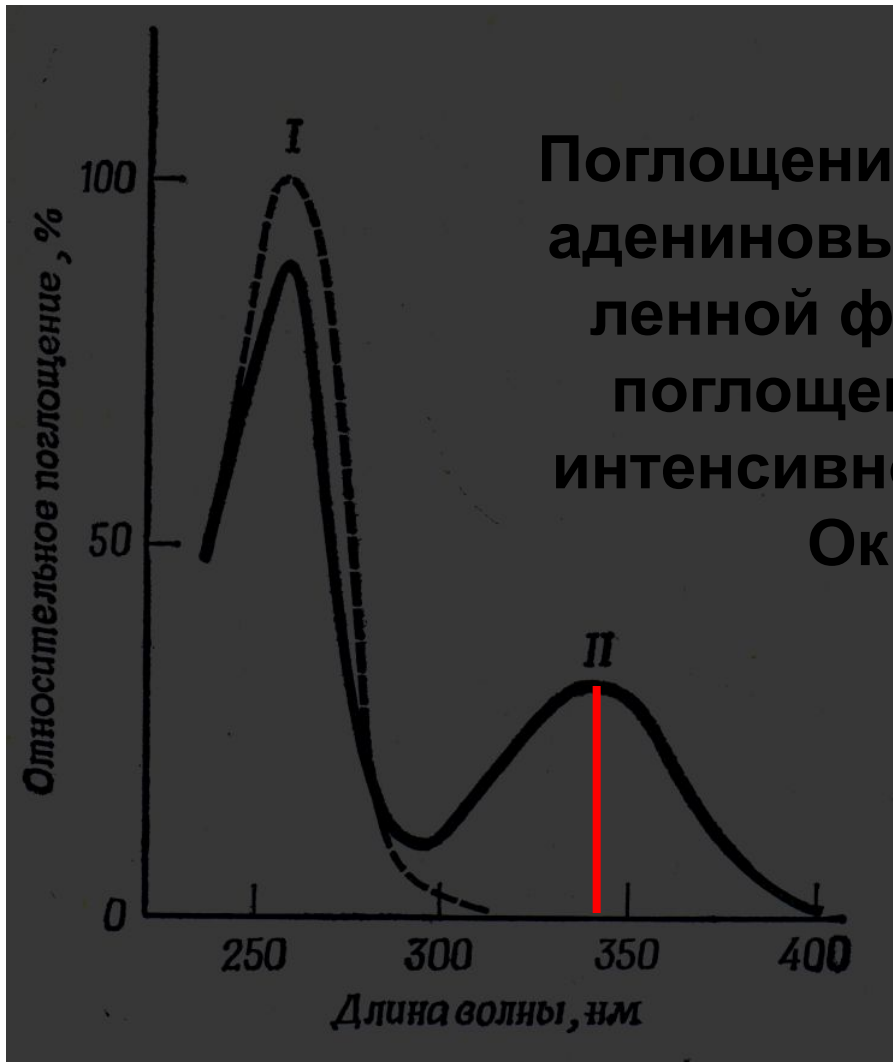
## Спектры поглощения Hb (I), окси-Hb (II) и карбокси-Hb (III)

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  $\lambda$  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:  $\lambda$  315 – 700 нм

$\lambda$  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:  $\lambda$  200 – 1000 нм

$\lambda$  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

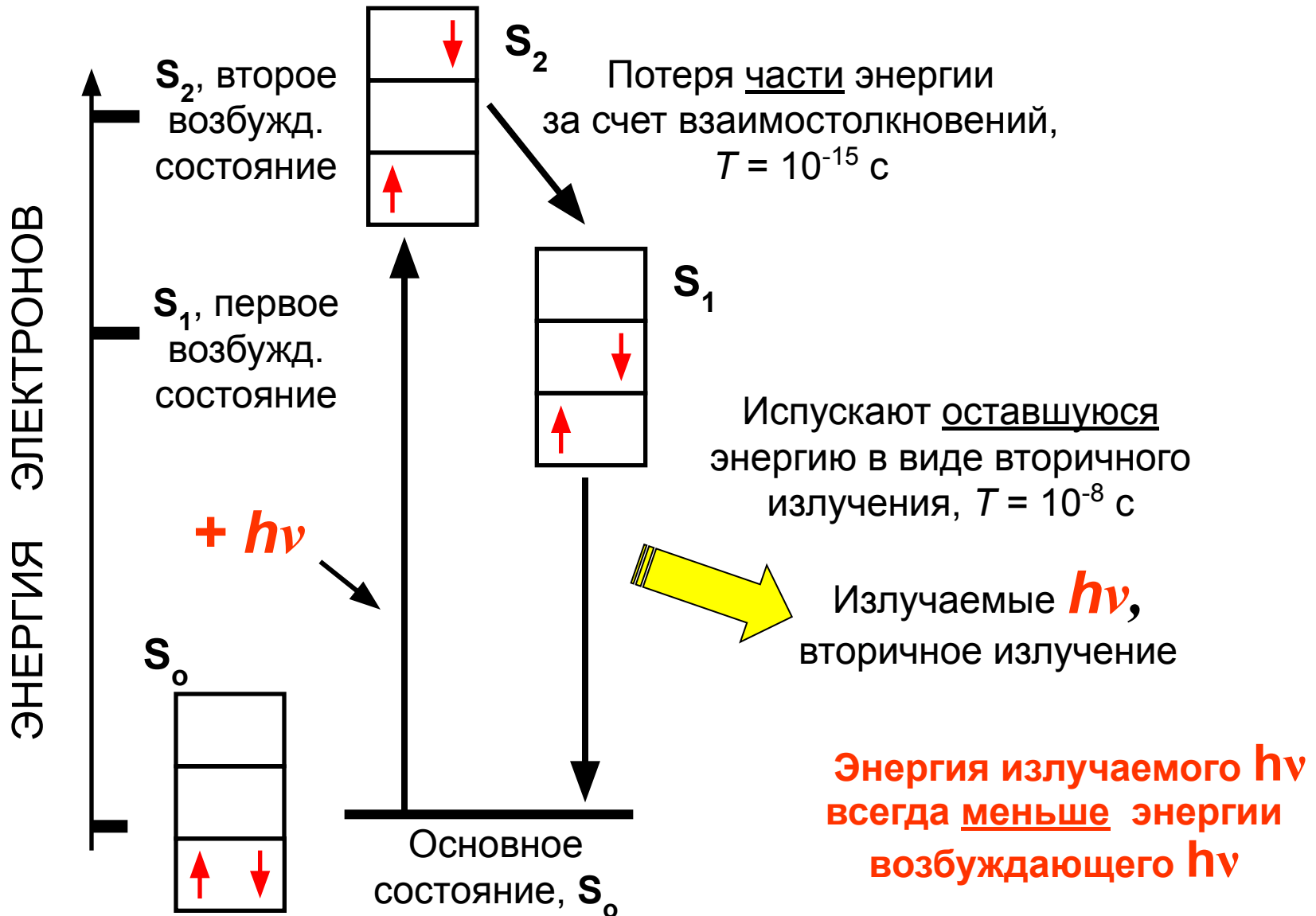
**Флуоресценция** – испускание света молекулой, возбужденной световым излучением. (Свечение молекул также можно инициировать химической реакцией – хемилюминесценция).

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).

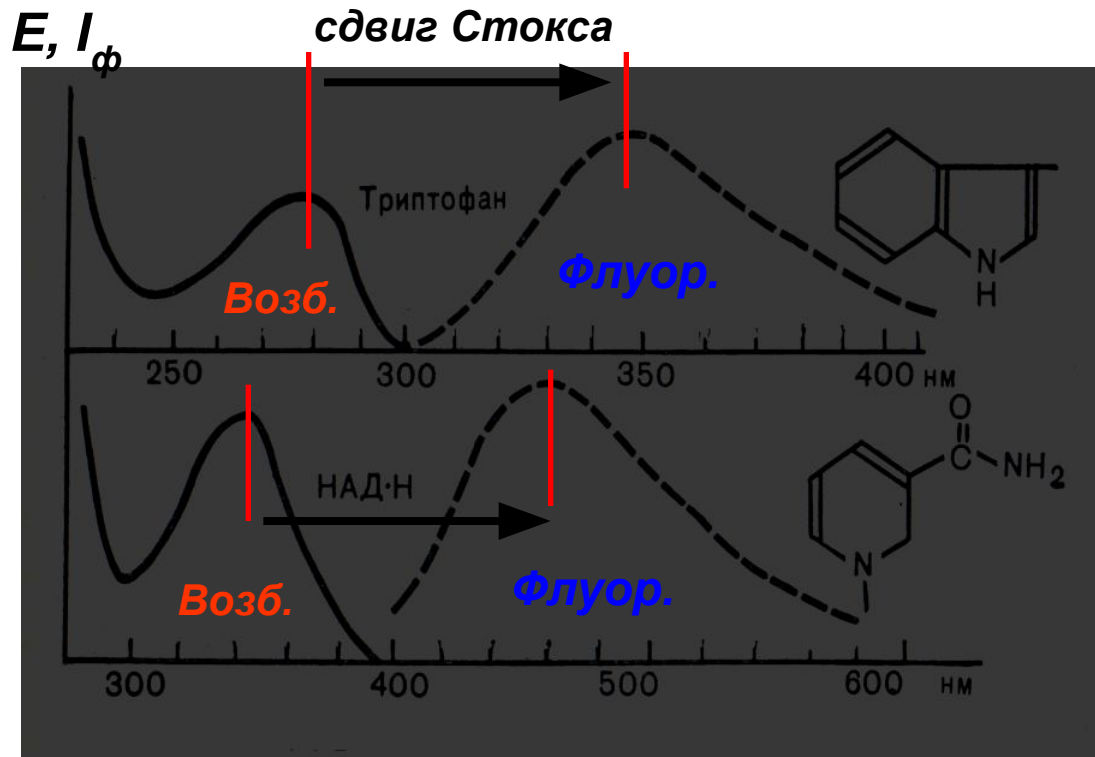
# Природа флуоресценции



# Спектры возбуждения и спектры флуоресценции

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

**Спектр флуоресценции** – интенсивность флуоресценции ( $I_{\phi}$ ), 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 $I_{\phi}$ от концентрации вещества

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

$I_o$  – интенсивность возбуждающего света;

$Q$  – квантовый выход;

$C$  – концентрация вещества

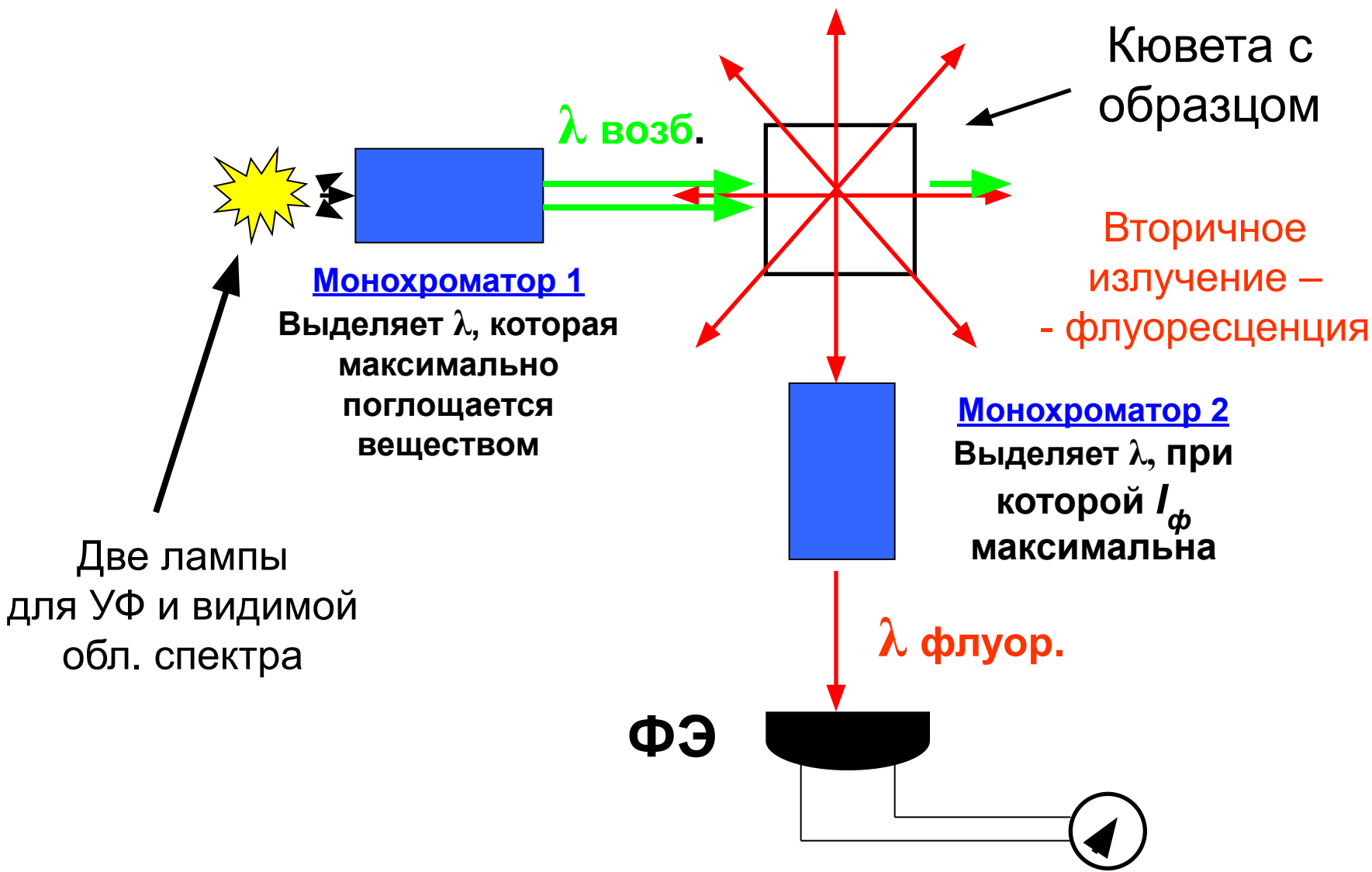
Флуоресцентный анализ на порядок чувствительней, чем спектрофотометрия. Для соблюдения линейной зависимости  $I_{\phi}$  от  $C$ , содержание флуорофора в кювете не должно превышать 5% от её объема.

**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. **Высококочувствительный 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.**

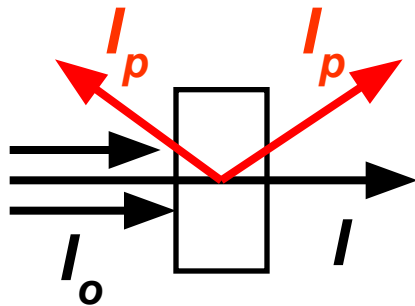
# **СВЕТОРАССЕИВАНИЕ**

# Методы, основанные на измерении светорассеивания

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

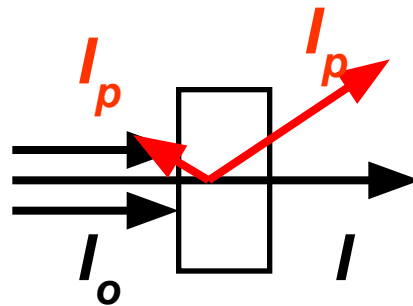
Теория светорассеивания разработана Рэлеем:  $I_p = \frac{1}{\lambda^4}$

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



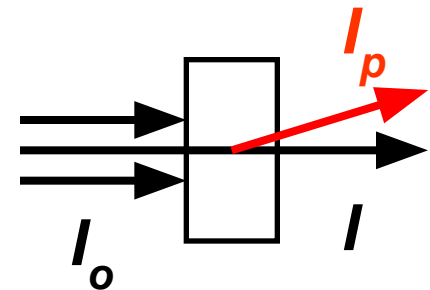
Рассеивание идет симметрично

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).

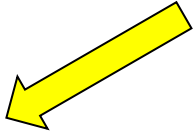
Метод основан на измерении интенсивности прошедшего через образец (не рассеянного) света.

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

## 2. Нефелометрия.

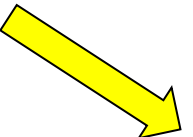
Метод основан на измерении интенсивности рассеянного образцом света. Метод более чувствителен, чем турбидиметрия, реализуется с помощью специального прибора – **нефелометра**. Через образец пропускают свет с  $\lambda = 600-700$  нм (при большой  $\lambda$  шире диапазон D частиц, рассеивающих свет).

# Пламенная фотометрия



Эмиссионная  
пламенная  
фотометрия

Регистрация интенсивности  
излучения пламени  
при определенной  $\lambda$



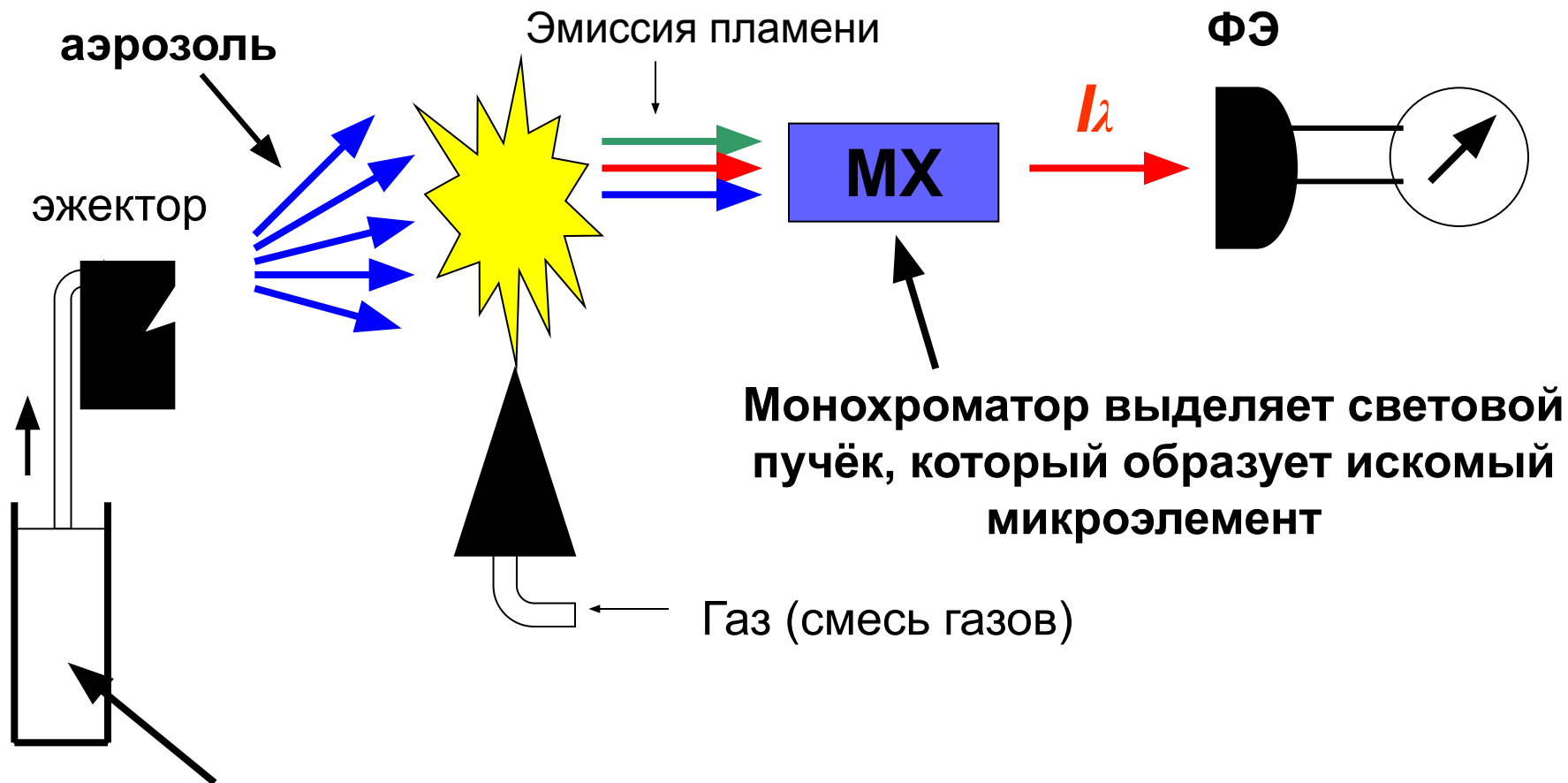
Абсорбционная  
фотометрия  
пламени

Регистрация поглощения  
пламенем проходящего  
через него излучения  
с определенной  $\lambda$

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

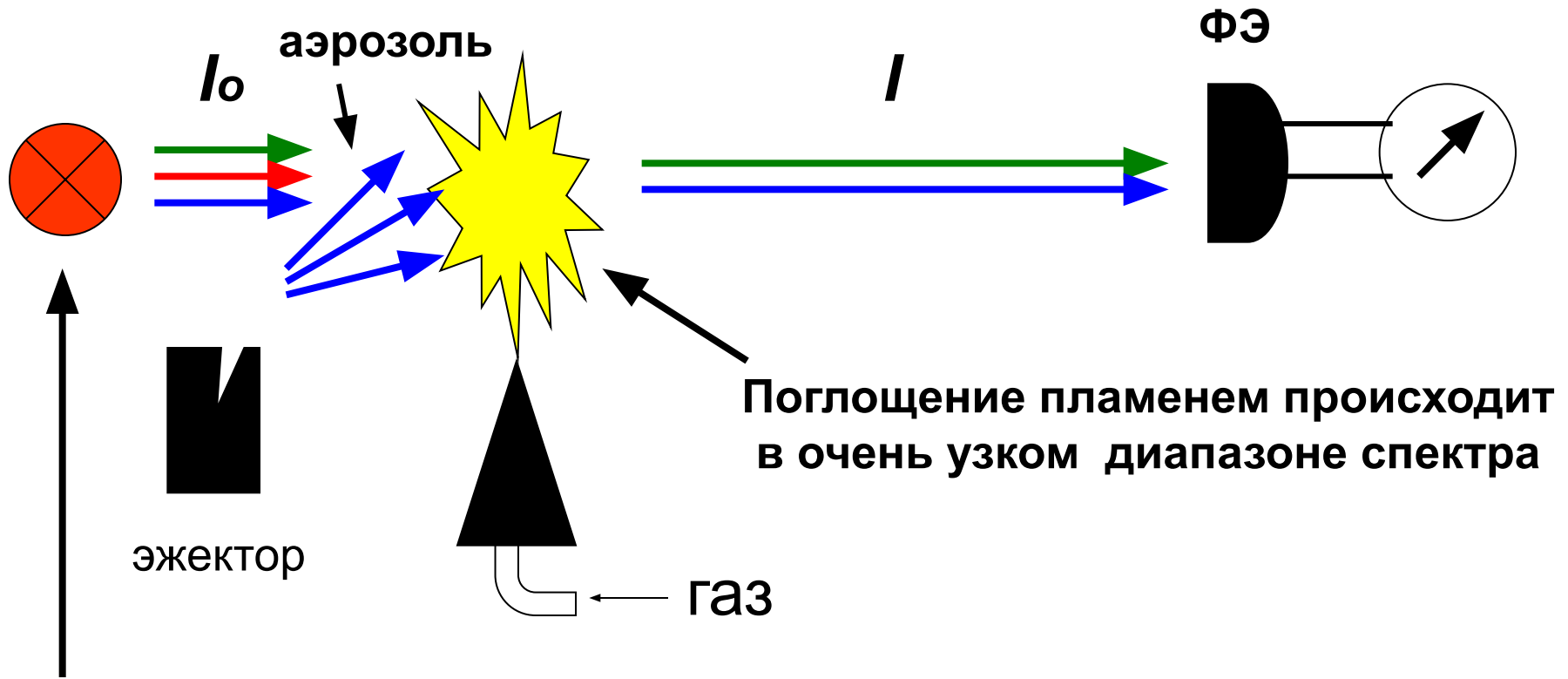
- Испускания пламенем излучения с определенной  $\lambda$ .
- Поглощения пламенем проходящего через него излучения с определенной  $\lambda$ .

# 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  $\lambda$ , 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, спинно-мозговая 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