

Р. П. ВИНОГРАДОВА
Б. А. ЦУДЗЕВИЧ
С. Н. ХРАПУНОВ

ФИЗИКО- ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИОХИМИИ

Допущено Министерством высшего
и среднего специального
образования УССР
в качестве учебного пособия
для студентов биологических
специальностей вузов

Киев

Головное издательство
издательского объединения
«Вища школа»

1983

28.072я73

В49

УДК 578.088(07)

Физико-химические методы в биохимии. Виноградова Р. П., Цудзевич Б. А., Храпунов С. Н. — Киев: Вища школа, Головное изд-во, 1983.— 287 с.

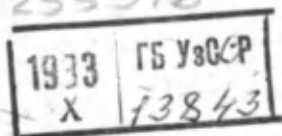
В пособии изложены теоретические основы наиболее распространенных в биохимии физико-химических методов исследования, описана аппаратура и примеры использования этих методов в практике. В частности, пособие знакомит с различными методами хроматографии, электрофореза, электрохимическими, а также оптическими методами исследования, которые все шире внедряются в практику биохимических исследований для определения количества и конформации биополимеров.

Для студентов биологических специальностей вузов. Может быть полезным для студентов химических факультетов университетов, медицинских, фармацевтических, сельскохозяйственных и педагогических институтов.

Табл. 17 Ил. 146 Библиогр.: 67 назв.

Рецензенты: проф. А. Д. Рева (Днепропетровский государственный университет) и проф. П. А. Калиман (Харьковский государственный университет)

Редакция литературы по химии, химической технологии, горному делу и металлургии
Зав. редакцией Т. С. Антоненко



2001040000—024

В _____ 149—83
М211(04)—83

© Издательское объединение
«Вища школа», 1983

ВВЕДЕНИЕ

Определяя основные задачи советской науки, Коммунистическая партия указывает, в частности, на необходимость усиления исследований в области познания механизма физиологических, биохимических, генетических и иммунологических процессов жизнедеятельности человека; выведения высокопродуктивных сортов растений, пород животных и культур полезных микроорганизмов, создания новых физиологически активных веществ; разработки биотехнологических процессов для производства продукции, используемой в медицине, сельском хозяйстве и промышленности.

В Продовольственной программе СССР на период до 1990 года также подчеркивается необходимость развития теоретических исследований по проблемам генной инженерии в селекции растений, микроорганизмов и животных, биотехнологии синтеза белка, биологически активных веществ; обеспечение создания новых эффективных средств защиты растений от вредителей, болезней и сорняков, регуляторов роста и других препаратов для сельского хозяйства.

Для решения этих фундаментальных задач необходимо в совершенстве владеть современными физико-химическими методами исследований. Эти методы непрерывно совершенствуются. В настоящее время они дают возможность разделять биополимеры, получать их чистые препараты, улавливать тонкие изменения формы биополимеров в растворе, определять расположение определенных структур в молекулах и др.

В биохимической практике наиболее распространены хроматографические, электрофоретические, электрохимические и оптические методы исследования. Первые два метода занимают ведущее место среди аналитических и препаративных методов исследования. С их помощью производится анализ и выделение препаратов индивидуальных биополимеров, клеточных структур, вирусов, а также таких низкомолекулярных соединений, как аминокислоты, моно-

сахариды, пурины, пиримидины и др. Данные хроматографических и электрофоретических исследований дают возможность характеризовать гомогенность препаратов различных соединений.

Кроме научных исследований, хроматографические методы применяют для автоматизации технологических процессов, все шире хроматография становится методом изучения различных физико-химических констант.

Из электрохимических методов широко используются полярография, кондуктометрия, амперометрическое и потенциометрическое титрование. В последнее время особенно большое внимание уделяется применению в полярографии твердых электродов для исследования процессов биологического окисления в изолированных митохондриях, изучения их метаболических состояний. Метод амперометрического титрования применяется для определения реакционноактивных белков, пептидов, аминокислот и других соединений. Методом потенциометрического титрования определяют редокс-потенциалы окислительно-восстановительных систем дыхательной цепи и др.

Важными методами исследования структурных особенностей биополимеров являются оптические, обладающие высокой чувствительностью и позволяющие работать с малыми концентрациями исследуемых веществ в физиологических условиях, а также определять структурные изменения биополимеров при различных воздействиях.

Глава I. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

§ 1. ТЕОРИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ

В основе хроматографических методов исследования лежит явление хроматографии, открытое в 1904 г. русским ученым М. С. Цветом при исследовании пигментов зеленого листа. М. С. Цвет разработал основные положения нового метода и правильно оценил его значение для разделения и анализа не только окрашенных, но и бесцветных веществ.

В 1931 г. Р. Кун, Е. Ледерер и А. Винтерштейн выделили в кристаллическом виде α - и β -каротины из сырого каротина, подтвердив предположение М. С. Цвета о том, что каротин состоит из нескольких гомологов, и тем самым продемонстрировали препаративную ценность хроматографии.

В настоящее время можно выделить следующие области применения хроматографии:

- 1) качественный и количественный анализ сложных смесей;
- 2) идентификация веществ и установление различий между ними;
- 3) разделение сложных смесей на отдельные компоненты с препаративной целью;
- 4) испытание веществ на однородность и чистоту;
- 5) очистка веществ от примесей;
- 6) концентрирование вещества и его выделение из разбавленных растворов или смесей;
- 7) контроль и автоматизация производственных процессов.

Все современные хроматографические методы исследования имеют ряд общих черт. Так, все виды хроматографического разделения в своей основе имеют перемещение исследуемого вещества через слой неподвижного вещества (твердый адсорбент либо жидкая неподвижная фаза, которая нанесена на твердый порошкообразный носитель или бумагу). Перемещение компонентов смеси осуществляется жидкостью или газом — подвижной фазой. Компоненты исследуемой смеси перемещаются на неподвижной фазе с различными скоростями, что приводит к

образованию отдельных зон или полос, каждая из которых содержит один компонент смеси. Задача исследователя заключается в том, чтобы выделить эти зоны и определить качественный и количественный состав. Во всех случаях хроматографирования компоненты исследуемой смеси распределяются между подвижной и неподвижной фазами, т. е. всегда имеет место двухфазная система.

Таким образом, хроматографический метод можно определить как физико-химический метод разделения и анализа смесей, при котором их компоненты распределены между двумя фазами — неподвижной и подвижной.

Для хроматографического метода характерна многократность повторения процессов сорбции и десорбции. Это обуславливает высокую эффективность хроматографии как метода разделения сложных смесей веществ с близкими свойствами.

Для выделения и очистки различных компонентов смесей хроматографический метод часто объединяют с методом электрофореза.

По сравнению с другими методами разделения веществ хроматографический метод имеет ряд преимуществ: им можно разделять газообразные и жидкие вещества любой природы и в любом количестве; применим для разделения смесей веществ, очень близких по химическому составу, строению и свойствам; обладает высокой степенью разделения веществ; прост в выполнении и применении несложной аппаратуры, доступной для любой лаборатории.

Наиболее распространено хроматографическое разделение в трубках, заполненных сорбентом, или колонках (колоночная хроматография).

В колоночной хроматографии используются различные типы колонок, которые заполняются сорбентом (неподвижной фазой) и растворителем (подвижной фазой). Для разделения компонентов смеси на сорбент наносится небольшой объем таким образом, чтобы он проник в верхний слой сорбента (загрузка колонки). Хроматограмма проявляется при протекании через колонку растворителя. Этот процесс называется элюированием с колонки. Перемещение веществ по колонке приводит к их разделению на отдельные зоны, а после пропускания растворителя исследуемые вещества появляются в элюате, выходящем из колонки. Объем твердой и жидкой фаз в колонке называется «мертвым». Объем подвижной фазы называется удерживаемым. Количество жидкости, необходимое для образования пика определенного вещества в элюате, называется объемом элюирования.

Заполнение колонки сорбентом и растворителем (насадкой) называется упаковкой (набивкой) колонки. Важно, чтобы насадка была гомогенной, свободной от пузырей, трещин или незаполненных пространств, особенно вблизи стенок. Процесс нарушения потока, являющийся результатом недостаточной гомогенности насадки, называется образованием каналов. В результате образования каналов искажается профиль элюирования, вплоть до того что индивидуальные вещества выходят в виде нескольких пиков.

Элюирование с колонки осуществляется тремя способами. Первый способ заключается в том, что один растворитель постоянно пропускается через колонку. Второй способ носит название ступенчатого, или периодического, элюирования, которое заключается в том, что колонку промывают определенным количеством одного растворителя, затем используют другой растворитель. Этот способ дает возможность более точно подобрать условия для получения определенных компонентов в малых объемах элюата и поэтому чаще всего используется для препаративных целей.

Третий способ называется градиентным элюированием. Он заключается в изменении соотношения между двумя растворителями либо в изменении концентрации одного или более компонентов в одном растворителе. Градиенты бывают линейными, выпуклыми или вогнутыми и получают их с помощью специальных устройств (рис. 1).

Для обеспечения четкости разделения больше значение имеет правильный выбор размеров колонки. Излишне длинные колонки могут чрезмерно затянуть время опыта, короткие — не обеспечить достаточное разделение смеси на составляющие компоненты. Важно соотношение между длиной и диаметром колонки. В жидкостной адсорбционной хроматографии отсутствуют теоретически обоснованные критерии для выбора оптимальных размеров и форм хроматографических колонок; выбор производится опытным путем. Как показывают многочисленные опытные данные, наилучшие результаты достигаются при отношении высоты к диаметру колонки от 40 до 100.

Применяются колонки цилиндрической, конической и телескопической форм. Высота их в зависимости от поставленных целей колеблется от нескольких сантиметров до 10—20 м, диаметр — от нескольких миллиметров до 8—20 см. В качестве материала чаще применяется стекло, реже сталь, алюминий, латунь. Использование металла дает возможность изготавливать колонки больших размеров.

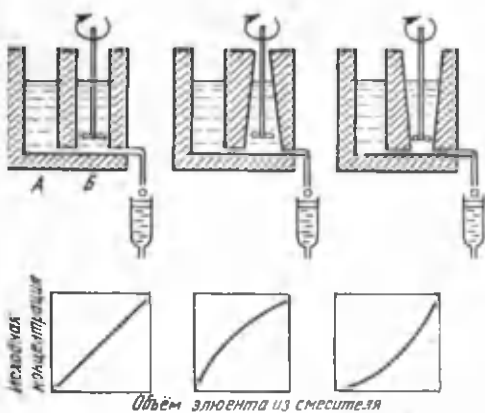


Рис. 1. Устройства для получения градиента и виды градиентов:

А — резервуар с добавляемым растворителем; В — смесительная камера с жидкостью исходной концентрации. При выходе жидкости из смесительной камеры жидкость из резервуара поступает в камеру для поддержания постоянного гидростатического давления. Если две жидкости имеют одну и ту же плотность, то высота в обоих камерах будет одинаковой. Если жидкость в смесительной камере В имеет большую плотность, чем в резервуаре А, уровень в смесительной камере В будет ниже, чем в резервуаре А. Линейный градиент получается только при равных объемах резервуара и смесительной камеры.

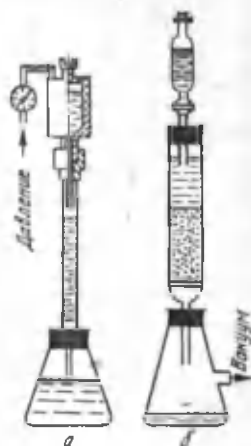


Рис. 2. Хроматографические колонки, работающие при повышенном давлении (а) и под вакуумом (б).

На качество разделения оказывает влияние состояние внутренней поверхности материала колонки. Шероховатая поверхность уменьшает так называемый стеночный эффект, т. е. проникновение анализируемой смеси вдоль стенки колонки без разделения. В этом отношении металлические колонки с необработанной поверхностью стенок более выгодны, чем стеклянные. Ни растворитель, ни анализируемая смесь не должны реагировать со стенками колонки.

Хроматографические колонки могут работать под давлением либо в вакууме. В первом случае подаваемая в качестве промывающего вещества жидкость находится под давлением выше атмосферного (рис. 2, а), а на выходе из колонки она находится при атмосферном давлении. Во втором случае вакуумный насос подключается к нижней части колонки, а подаваемая сверху жидкость находится при атмосферном давлении (рис. 2, б). Как показывают опытные данные, четкость разделения в колонках, работающих в вакууме, вследствие более полного удаления воздуха из пор адсорбента оказывается выше.

При хроматографии жидких веществ колонки необходимо устанавливать строго вертикально, так как наличие даже небольшого наклона увеличивает стеночный эффект.

Для разделения можно использовать простейшие колонки, состоящие из стеклянной трубки с краном на конце (типа бюретки), укрепленной на обычном штативе.

Контроль за хроматографическим разделением анализируемых смесей осуществляется тремя способами: а) определением компонентов разделяемой смеси непосредственно в слое адсорбента, без вымывания веществ из колонки (послойный способ); б) последовательным анализом отобранных порций раствора, вытекающих из колонки (фракционный способ); в) непрерывным определением изменения концентрации анализируемых веществ в вытекающем растворе химическими или физико-химическими методами.

В жидкостной адсорбционной хроматографии чаще пользуются вторым способом, так как непрерывные методы анализа требуют довольно громоздкой и сложной аппаратуры и трудно осуществимы, а послойный анализ возможен только в редких специальных случаях.

При фракционном способе контроля используются коллекторы фракций различных конструкций. Все коллекторы фракций работают по времени или по объему.

Непрерывный способ контроля требует приборов с проточными кюветами типа Увикорд.

В настоящее время хроматографические методы классифицируются по следующим признакам:

1. В зависимости от атомно-молекулярного взаимодействия компонентов смеси с неподвижной фазой различают адсорбционную (молекулярную), ионообменную, осадочную, распределительную, аффинную и гель-хроматографию. Это деление условно, так как практически разделение компонентов смеси осуществляется большей частью при одновременном действии сил различной природы. Примером может служить метод тонкослойной хроматографии.

2. По агрегатному состоянию фаз выделяют четыре группы (табл. 1).

3. По методике проведения эксперимента различают проявительную, или элюентную, фронтальную и вытеснительную хроматографию.

Проявительная хроматография. При работе этим методом заполненную сорбентом колонку промывают чистым растворителем, например *E*, после чего в верхнюю часть колонки вводят порцию анализируемого раствора веществ *A* и *B* в растворе *E*. Затем колонку непрерывно промывают растворителем *E*. Компоненты *A* и *B* перемещаются

Таблица 1. Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз

Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Наименование метода	Возможные варианты
Твердая	Жидкая	Адсорбционная хроматография жидкостей и растворов; ионообменная хроматография; осадочная	Окислительно-восстановительная хроматография; адсорбционно-комплексная, тонкослойная
Твердая	Газообразная	Газовая адсорбционная хроматография	Хроматермография, теплодинамический метод
Жидкая	Жидкая	Жидкостная распределительная хроматография	Колоночная, бумажная, двумерная, круговая, метод обращенных фаз, электрофоретическая, тонкослойная
Жидкая	Газообразная	Газожидкостная, распределительная	Хроматография газов, жидкостей, вакантная, ступенчатая, капиллярная

вдоль слоя сорбента с различными скоростями. При достаточной длине колонки происходит полное разделение зон. Между зонами более сильно адсорбированного компонента и менее сильно адсорбированного вещества будет находиться чистый растворитель (рис. 3).

Изменение концентрации вымываемых веществ в вытекающем растворе изображается кривыми, которые называются хроматограммами, или выходными хроматографическими кривыми (рис. 4). На оси

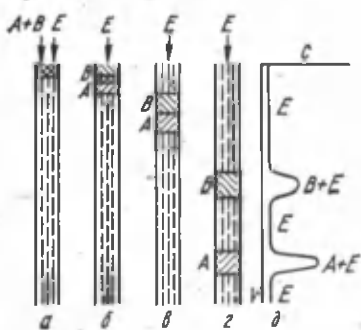


Рис. 3. Схема образования зон в проявительной хроматографии (а—г) и распределение концентрации в зонах (д).

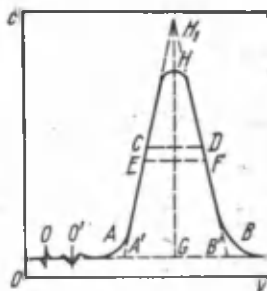


Рис. 4. Типичная хроматограмма в проявительной хроматографии.

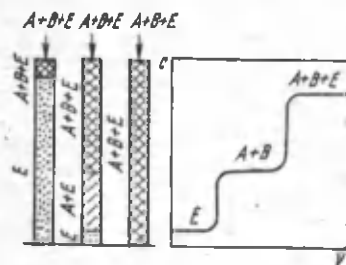


Рис. 5. Схема образования зон в фронтальной хроматографии и распределение концентраций в зонах.

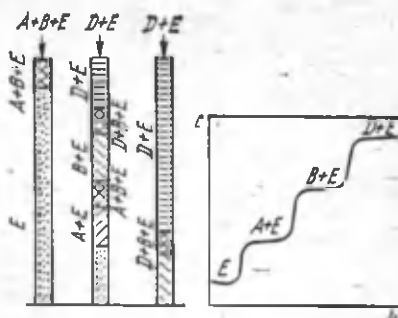


Рис. 6. Схема образования зон в вытеснительной хроматографии и распределение концентрации в зонах.

абсцисс откладывается объем V вытекающего из колонки раствора, по оси ординат — его концентрация c . Точка O соответствует вводу пробы, O' — появлению несорбирующегося в колонке вещества, например находившегося в колонке растворителя или воздуха; отрезок OO' соответствует незаполненному сорбентом объему колонки. Кривая AHB называется хроматографическим пиком данного вещества, а расстояние от нулевой линии AB до максимума пика H , т. е. GH — высотой пика. Отрезок AB составляет ширину пика у основания, CD — ширину в точке перегиба, а EF — ширину на расстоянии половины высоты. Отрезок $O'G$ соответствует удерживаемому объему V_R . Эта величина является важной в теории и практике хроматографии. Время t_R , соответствующее объему V_R , называют временем удерживания.

Проявительная хроматография — наиболее распространенный метод анализа. Преимуществом его является возможность разделения всех компонентов смеси, так как между вымываемыми компонентами образуется зона чистого растворителя.

Фронтальная хроматография. При использовании данного метода анализируемая смесь непрерывно пропускается через слой сорбента (рис. 5). Если смесь компонентов A и B растворена в растворителе E , то первым из колонки вследствие сорбции компонентов A и B начинает вытекать чистый растворитель. После насыщения сорбента менее сорбирующимся компонентом A из колонки вытекает раствор компонента A в растворителе E . Когда сорбент насытится компонентом B , наступает проскок вещества B , и из ко-

лонки вытекает раствор с компонентами *A* и *B*. Если третий компонент отсутствует, то через слой сорбента протекает раствор, содержащий исходные вещества. В случае более сложной смеси исходная концентрация всех компонентов будет достигнута после насыщения сорбента всеми компонентами смеси.

Фронтальная хроматография применяется реже, чем проявительная, так как только один из компонентов, наименее сорбирующийся, можно получить в чистом виде; остальные компоненты не разделяются. Применяется для очистки некоторых веществ от примесей, если примеси сорбируются лучше, чем очищаемые вещества, а также для определения некоторых физических констант, например изотерм сорбции из растворов.

Вытеснительная хроматография. При этом методе в колонку, промытую чистым растворителем *E*, вводят смесь компонентов *A* и *B* в растворителе *E*. Затем сорбент промывают веществом *D* — вытеснителем, элюентом, сорбирующимся сильнее из каждого компонента (рис. 6).

При промывании сорбента вытеснителем анализируемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и разделяется на зоны, каждая из которых соответствует одному компоненту. Все зоны движутся с одной и той же скоростью, равной скорости движения зоны вытеснителя. Компоненты выделяемой смеси выходят из колонки последовательно друг за другом. Компоненты смеси не разбавляются растворителем, так как их концентрация не уменьшается при хроматографии.

Данный метод применяется в жидкостно-адсорбционной и ионообменной хроматографии. Недостатком метода является возможное наложение зон веществ друг на друга. Этот недостаток особенно проявляется в газовой и газожидкостной хроматографии.

Хроматографический процесс, протекающий в колонке, описать с помощью математического уравнения в общем виде необычайно трудно, так как необходимо учитывать одновременное действие многих факторов. Все теоретические выкладки, с помощью которых пытались выявить зависимость эффективности разделения от отдельных переменных, носят приближенный характер. Математические соотношения получены лишь при некоторых допущениях, упрощающих решения. Принимая такие допущения, пришли к представлению об идеальной хроматографии, которую можно охарактеризовать следующими положениями:

1) соотношение обеих фаз в любой части колонки одинаково;

- 2) равновесная концентрация компонента в подвижной и неподвижной фазах устанавливается мгновенно;
- 3) продольной диффузией в газовой фазе колонки можно пренебречь;
- 4) поток подвижной фазы в любой части колонки равномерен.

Первая теория хроматографического разделения была разработана А. Мартином и Р. Синджем (1941), которые исходили из концепции теоретических тарелок. По этой теории хроматографическую колонку можно представить в виде секций, т. е. тарелок. Теоретическая тарелка соответствует части колонки, в которой происходит элементарный акт распределения между двумя фазами согласно соответствующей изотерме. Размер тарелки определяется ее высотой (в сантиметрах), а высота меняется в зависимости от характера компонента (т. е. зависит от коэффициента распределения).

Авторы рассматривали хроматографический процесс как дискретный, т. е. равновесие устанавливается по очереди в каждой тарелке.

Распределение двух компонентов по теоретическим тарелкам графически изображено на рис. 7. Для достаточно большого числа тарелок (свыше 100) кривая имеет сходство с кривой распределения Гаусса.

Количественные характеристики хроматографического разделения анализируемой смеси веществ зависят от эффективности колонки и селективности неподвижной фазы. Критерием степени разделения служат: высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), и R — разделительная способность. При описании разделения в колонке или тонком слое основной характеристикой является

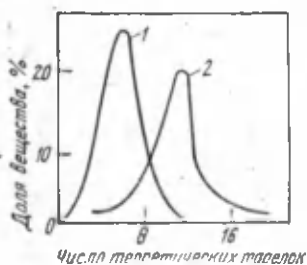


Рис. 7. Распределение двух компонентов по теоретическим тарелкам.

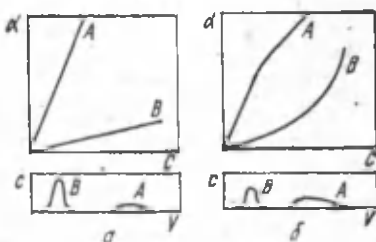


Рис. 8. Формы изотермы сорбции и соответствующие им контуры зон согласно различным теориям газовой хроматографии:

а — линейная; б — нелинейная.

ВЭТТ. Эффективность колонки (слоя) определяют числом теоретических тарелок.

Важной характеристикой хроматографической системы является объем подвижной фазы, необходимый для элюирования анализируемого вещества из слоя неподвижной фазы. Объем жидкой фазы, необходимый для перемещения анализируемого вещества через слой неподвижной фазы (удерживаемый объем V_R), как и время, за которое происходит перемещение анализируемого вещества через слой неподвижной фазы (время удерживания t_R), для данной хроматографической системы постоянны.

Для объема удерживания

$$V_R = V_0 + KV_s,$$

где V_0 — объем подвижной фазы, необходимый для насыщения неподвижной фазы; K — коэффициент равновесного распределения; V_s — объем неподвижной фазы.

Следует отличать коэффициент равновесного распределения

$$K = \frac{\text{Концентрация вещества в подвижной фазе}}{\text{Концентрация вещества в неподвижной фазе}}$$

от коэффициента емкости

$$R' = \frac{\text{Концентрация вещества в неподвижной фазе}}{\text{Концентрация вещества в подвижной фазе}}$$

Коэффициент распределения и коэффициент емкости связаны отношением:

$$R' = KV_s/V_0.$$

Время удерживания возрастает с увеличением длины колонки и уменьшается с увеличением линейной скорости подвижной фазы. Через коэффициент емкости R' время удерживания зависит от относительного количества подвижной и неподвижной фаз.

Коэффициент K безразмерен, если неподвижная фаза — жидкость. Если неподвижной фазой является адсорбент, то концентрация в ней относится к 1 г адсорбента. Коэффициент K может не зависеть от концентрации растворимого вещества или может меняться с изменением концентрации. График зависимости концентрации вещества в подвижной фазе от концентрации в неподвижной фазе называется изотермой распределения. Если коэффициент K не зависит от концентрации, то изотерма будет линейной (рис. 8, а), при изменении коэффициента K линейность

изотермы нарушается (рис. 8, б). По виду изотермы можно определять форму хроматографического пика или наоборот. Однако несимметричность кривой может быть вызвана нарушением стабильности условий анализа.

В плоскостной хроматографии широко используют параметр удерживания R_f , который определяют по отношению расстояния, пройденного анализируемым веществом за фиксированное время, к расстоянию, пройденному фронтом подвижной фазы.

Величины V_R , t_R (в колоночной хроматографии) и R_f (в плоскостной хроматографии) в зафиксированных условиях хроматографического эксперимента являются константами для данного анализируемого вещества. Поэтому их можно использовать для идентификации веществ по условиям хроматографического разделения.

§ 2. АДсорбционная (молекулярная) хроматография

Адсорбционная хроматография основана на разделении компонентов смеси за счет различий в их адсорбционных свойствах. Этот вид хроматографии в основном колоночный и используется для разделения макро- и полумикроколичеств веществ. В смеси, состоящей из нескольких компонентов, возможна конкуренция между компонентами и подвижной фазой за поверхность адсорбента. Основную роль при адсорбции играют дисперсионные силы, т. е. взаимное притяжение молекул адсорбента и адсорбируемого вещества. Компоненты пробы адсорбируются на матрице нековалентными связями, например вследствие образования водородных связей, неполярными взаимодействиями, силами Ван дер Ваальса. Адсорбционная способность является свойством не только твердого тела, но любой поверхности раздела двух фаз.

Согласно адсорбционной теории Ленгмюра, на поверхности адсорбента расположены активные участки, способные фиксировать молекулы растворенных веществ. Свойством каждого активного участка является способность взаимодействовать только с одной молекулой адсорбционного вещества. Таким образом, после образования мономолекулярного слоя на поверхности адсорбента скорость адсорбции пропорциональна концентрации вещества и доле незанятых активных участков:

$$u_{\text{адс}} = R_1 c(1 - \theta).$$

Скорость десорбции равна:

$$u_{\text{дес}} = R_2 c \theta.$$

где $u_{\text{адс}}$ — скорость адсорбции; $u_{\text{дес}}$ — скорость десорбции; R_1, R_2 — константы; c — концентрация вещества; θ — доля занятых мест.

В состоянии подвижного равновесия между процессами адсорбции и десорбции их скорости можно принять равными:

$$R_1 c (1 - \theta) = R_2 c \theta.$$

При условии, что $R_1/R_2 = b$,

$$\theta = bc/(1 + bc).$$

Обозначив максимальное число основных участков, которые могут быть заняты молекулами адсорбируемого вещества через a_∞ , а количество участков, занятых в состоянии равновесия, через a , получим:

$$a = a_\infty \theta.$$

Подставляя значение θ , можно получить уравнение изотермы Ленгмюра:

$$a = a_\infty (bc/1 + bc),$$

из которого следует, что адсорбция вещества на поверхности адсорбента имеет предел.

В области низких концентраций вещества изотермы адсорбции могут иметь три формы: выпуклую (L -изотерма), вогнутая (S -изотерма) и линейную (C -изотерма) (рис. 9).

Изотерму адсорбции можно принимать линейной только при очень малых нагрузках колонки или слоя. В этих условиях величины V_R и R_f остаются постоянными. Но с увеличением загрузки или перегрузки значения V_R и R_f убывают. Перегрузка характеризуется значительным размыванием зон и неполным разделением.

Максимально допустимая масса образца, приходящаяся на 1 г адсорбента, при котором коэффициент K , объем удерживания V_R и R_f применяют в пределах 10%, называется линейной емкостью адсорбента. Для



Рис. 9. Форма хроматографических пиков (2) и пятен (3) для тонкослойной хроматографии в зависимости от формы изотермы (1) адсорбции:

а — выпуклая; б — вогнутая; в — линейная.

большинства адсорбентов значение линейной емкости меньше 10^{-4} г/г.

Растворители. В адсорбционной хроматографии важное значение имеет правильный выбор растворителя, особенно в проявительном анализе, в котором растворитель является проявляющим веществом. Выбор растворителя тесно связан как с природой адсорбента, так и со свойствами компонентов анализируемой смеси.

Растворители должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- 1) хорошо растворять все компоненты анализируемой смеси;
- 2) минимально адсорбироваться на выбранном адсорбенте;
- 3) не вступать в химические реакции ни с анализируемыми веществами, ни с адсорбентом.

Часто практикуется последовательное вымывание веществ рядом растворителей с постепенно увеличивающейся десорбционной способностью. При этом отдельные компоненты смеси десорбируются и вымываются из колонки последовательно. Представляет интерес элюотропный ряд Траппа, в котором наиболее часто применяемые в хроматографии растворители расположены в порядке убывания их десорбирующей способности с полярных адсорбентов.

Десорбирующая способность растворителей, за немногими исключениями, зависит от величины их диэлектрической постоянной. Для аполлярных адсорбентов десорбирующая способность растворителей изменяется в обратном порядке.

При выборе растворителей следует обращать серьезное внимание на их чистоту. Особенно важно, чтобы неполярные растворители не содержали примесей полярных веществ (воды, спирта и т. п.), резко снижающих адсорбцию из растворителя. Применение в качестве вымывающего растворителя чистого индивидуального вещества желательно также в том случае, когда наблюдение за ходом разделения компонентов смеси производится путем измерения какого-либо физического параметра растворителя, изменяющегося в ходе процесса (показатель преломления, плотность и др.). Ниже приведен элюотропный ряд растворителей:

Растворитель	Диэлектрическая постоянная	Растворитель	Диэлектрическая постоянная
Вода	81,0	Хлористый метилен	—



Метанол	31,2	Бензол	2,3
Этанол	25,8	Толуол	2,3
n-Пропанол	22,3	Трихлорэтилен	3,4
Ацетон	21,5	Четыреххлористый углерод	2,2
Дихлорэтан	10,4	Циклогексан	2,0
Этилацетат	6,4	Петролейный эфир	
Амилацетат	—	(фракция 35—50°C)	1,9
Этиловый эфир	4,4	Диоксан	—
Хлороформ	5,2		

Адсорбенты. В качестве адсорбента может быть использовано любое твердое вещество при соответствующем измельчении и активации. Однако применяется ограниченное количество адсорбентов, дающих наиболее эффективные результаты хроматографического разделения.

Основными требованиями, предъявляемыми к адсорбентам, являются:

1) отсутствие химического взаимодействия между адсорбентом и анализируемым веществом. Адсорбент не должен также оказывать каталитическое воздействие как на растворитель, так и на вещество разделяемой смеси. Нередко при хроматографическом разделении имеют место процессы изомеризации, полимеризации, окисления и другие химические превращения, что приводит к образованию новых веществ, которых не было в исследуемой смеси;

2) избирательность адсорбента, т. е. возможно большее различие в адсорбируемости веществ в разделяемой смеси. Одним из возможных критериев такого различия может служить величина теплоты адсорбции или смачивания;

3) выбор определенной степени дисперсности адсорбента. Чем меньше частицы адсорбента, тем быстрее устанавливается адсорбционное равновесие и тем лучше работает колонка. Увеличение степени дисперсности влечет за собой возрастание сопротивления колонки течению жидкости. Поэтому желательно применение адсорбента с одинаковыми по размеру частицами, т. е. изодисперсных адсорбентов. Изодисперсные порошки обладают значительно меньшим сопротивлением течению, чем полидисперсные;

4) постоянство, стандартность свойств, иначе при воспроизведении или сопоставлении опытов могут возникнуть затруднения вследствие неодинаковости условий экспериментов.

Адсорбенты делят на две группы: неполярные, например активированный уголь, и полярные, например силикагель, алюмогель, искусственные и природные силикаты.

На неполярном адсорбенте энергия адсорбции возрастает с увеличением размеров молекул адсорбированного ве-

щества, а на полярном энергия адсорбции тем больше, чем больше полярность или ненасыщенность адсорбируемого вещества. В соответствии с энергией адсорбции выходят и отдельные фракции из колонки.

На активированном угле время вымывания зависит от величины энергии связи углерод — углерод. В хроматографии применяют различные марки активированных углей: древесные, костные, лигниновые, каменные и др.

Силикагели являются чрезвычайно полярными адсорбентами, их сорбционные свойства зависят от способа приготовления. Они используются для хроматографирования смесей углеводов, смолистых веществ, высших жирных кислот и их сложных эфиров, нитро- и нитрозосоединений, ароматических аминов и других органических соединений.

Оксид алюминия часто применяется для хроматографического разделения многих смесей веществ из полярных и неполярных растворителей, так как он обладает амфотерными свойствами.

§ 3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимый стехиометрический обмен ионов, содержащихся в хроматографическом растворе, на подвижные ионы, входящие в состав веществ, называемых ионитами, или ионообменниками. Разделение смеси ионов, содержащихся в растворе, основано на неодинаковой способности их к обмену с ионами ионита.

В адсорбционной хроматографии вымывание веществ из колонки проводят чистым растворителем, а в ионообменной хроматографии — растворами электролитов.

Четкой границы между адсорбционной и ионообменной хроматографией провести нельзя, так как обычные адсорбенты часто действуют так же, как иониты, а на ионитах имеет место физическая адсорбция.

Ионит можно представить в виде каркаса, связанного силами межмолекулярного притяжения. Каркас обладает положительным или отрицательным зарядом, который компенсируется зарядом ионов противоположного знака, так что в целом ионит нейтрален. Ионы, компенсирующие заряд каркаса, называются *противоионами*. Способность ионита к обмену обуславливается тем, что противоионы обладают подвижностью в пределах каркаса (рис. 10).

Если ионит, содержащий противоионы только одного вида *A*, поместить в раствор с ионами другого вида *B*, то ио-

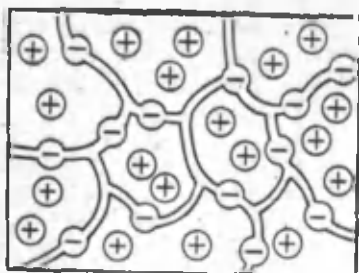


Рис. 10. Схематическое изображение структуры ионообменной смолы.

воренные вещества. Поэтому наряду с обменом ионов в ионите происходят: набухание, вызываемое поглощением растворителя, и адсорбция растворенных веществ, при которой вместе с противоионами в ионит может проникнуть эквивалентное количество подвижных ионов того же знака, что и заряд каркаса. Такие ионы называются **к о и о н а м и**. Следовательно, содержание противоионов в ионите определяется не только величиной заряда каркаса, но и содержанием коионов. Описанная модель полно отражает основные свойства ионитов, показывает, что ионный обмен основывается на статическом распределении противоионов между ионитом и раствором, в котором не участвует ни вещество каркаса, ни коионы.

По знаку зарядов обмениваемых ионов иониты разделяются на катиониты, или катионообменники, и аниониты, или анионообменники. Существуют амфотерные иониты, способные осуществлять одновременный обмен катионов и анионов — **а м ф о л и т ы**.

К а т и о н и т ы — полизарядные нерастворимые аниониты (многоосновные кислоты, у которых ионогенные группы насыщены катионами, т. е. противоионами у них являются катионы).

Схема катионного обмена:



А н и о н и т ы — полизарядные нерастворимые катионы (многоосновные основания, у которых ионогенные группы насыщены растворимыми анионами, т. е. противоионами у них являются анионы).

Схема анионного обмена:



ны *A* с ионита будут переходить в раствор, а ионы *B* в строго эквивалентном количестве переходить из раствора в ионит. При достижении равновесия ионит и раствор будут содержать ионы *A* и *B* в определенном количественном соотношении, определяемом константой ионообменного равновесия.

В порах ионита содержатся также растворитель и растворенные вещества.

Поэтому наряду с обменом ионов в ионите происходят: набухание, вызываемое поглощением растворителя, и адсорбция растворенных веществ, при которой вместе с противоионами в ионит может проникнуть эквивалентное количество подвижных ионов того же знака, что и заряд каркаса. Такие ионы называются **к о и о н а м и**. Следовательно, содержание противоионов в ионите определяется не только величиной заряда каркаса, но и содержанием коионов. Описанная модель полно отражает основные свойства ионитов, показывает, что ионный обмен основывается на статическом распределении противоионов между ионитом и раствором, в котором не участвует ни вещество каркаса, ни коионы.

По знаку зарядов обмениваемых ионов иониты разделяются на катиониты, или катионообменники, и аниониты, или анионообменники. Существуют амфотерные иониты, способные осуществлять одновременный обмен катионов и анионов — **а м ф о л и т ы**.

К а т и о н и т ы — полизарядные нерастворимые аниониты (многоосновные кислоты, у которых ионогенные группы насыщены катионами, т. е. противоионами у них являются катионы).

Схема катионного обмена:



А н и о н и т ы — полизарядные нерастворимые катионы (многоосновные основания, у которых ионогенные группы насыщены растворимыми анионами, т. е. противоионами у них являются анионы).

Схема анионного обмена:



Если противоионом катионита являются ионы H^+ , то катионит находится в водородной форме, если какой-либо катион, то в солевой форме. Анионит, для которого противоионом является хлорид, находится в хлоридной форме (Cl-форма).

Статическое распределение противоионов различных видов между ионитом и раствором должно было бы обусловить одинаковые соотношения между концентрациями этих ионов в обеих фазах после установления равновесия. На практике же это условие не выполняется по следующим причинам:

1) силы электростатического взаимодействия между заряженным каркасом и различными противоионами не одинаковы, а зависят от заряда ионов;

2) кроме электростатических сил проявляются и другие силы взаимодействия между ионами и окружающей средой, в ионите и растворе эти силы могут значительно различаться;

3) противоионы крупных размеров по стерическим причинам не могут проникать в тонкопористые иониты.

Таким образом, путем ионного обмена можно практически полностью извлечь какой-нибудь ион из раствора.

Преимущественное поглощение ионом противоионов одного вида определяет селективность ионита. Это свойство зависит от природы ионита и условий проведения эксперимента: температуры, рН среды и др.

Основной характеристикой ионитов является их обменная емкость. Полная обменная емкость ионита — постоянная величина, и определяется числом фиксированных ионов, т. е. ионов, от которых зависит заряд каркаса, так как их электрический заряд в любой момент времени и на любом участке ионита должен компенсироваться зарядом противоионов. В идеальных условиях полная обменная емкость ионита не зависит от состояния ионита и природы противоиона. В действительности она зависит от ряда факторов, в частности от рН раствора, что усложняет однозначное определение этого понятия. Поэтому, характеризуя обменную емкость, необходимо указывать условия, при которых она определена. Эта величина указывается изготовителем и имеет важное значение, так как при перегрузке колонки ионы анализируемого образца будут проходить через колонку без связывания.

Динамическая обменная емкость до проскока (ДООЕ), емкость ионита, определяемая до появления данного иона в вытекающем из колонки растворе. Графически ДООЕ находят по площади заштрихованного

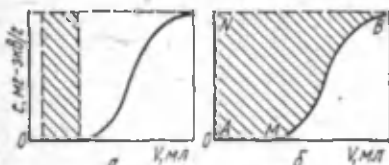


Рис. 11. Обменная емкость ионов.

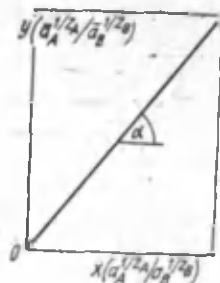


Рис. 12. Изотерма ионного обмена.

прямоугольника, у которого высота равна исходной концентрации определяемого иона, а основание — объему раствора, вытекающего из колонки до проскока этого иона (рис. 11, а).

Полная динамическая обменная емкость (ПДОЕ) определяется по полному извлечению данного иона из раствора, как площадь $AMBN$ над хроматографической кривой (рис. 11, б).

Последние две величины обменной емкости дают возможность выяснить, в каком объеме будет выходить определяемый компонент. Обменную емкость обычно выражают в миллиграмм-эквивалентах сорбируемого иона на грамм отмытого от сорбированных веществ сухого ионита, находящегося в водородной (для катионитов) и хлоридной (для анионитов) форме. Отнесение обменной емкости к хлоридной форме анионита обусловлено тем, что массу сухого анионита в ОН-форме непосредственно определить нельзя.

Равновесия, устанавливающиеся при ионообменных процессах, представляют большой практический и теоретический интерес. В первом приближении ионообменное равновесие может быть описано законом действующих масс.

Из уравнения реакции обмена двух одновалентных ионов A^+ и B^+



согласно закону действующих масс следует:

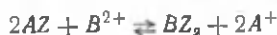
$$\frac{[BZ][A^+]}{[AZ][B^+]} = K_{A, B} \text{ или } \frac{[BZ]}{[AZ]} = K_{A, B} \frac{[B^+]}{[A^+]}$$

Если твердую фазу обозначить черточкой сверху, то

$$\frac{[B^+]}{[A^+]} = K_{A, B} \frac{[B^+]}{[A^+]}$$

где $[A^+]$ и $[B^+]$ — концентрации ионов в твердой фазе; $K_{A, B}$ — коэффициент избирательности, или константа ионного обмена.

Аналогично для реакции обмена двухвалентного иона на одновалентный



применение закона действующих масс даст соотношение

$$\frac{[B^{2+}]}{[A^+]^2} = K_{A, B} \frac{[B^{2+}]}{[A^+]^2}$$

Более точно условие ионообменного равновесия описывается уравнением Никольского:

$$\frac{\bar{a}_A^{-1/z_A}}{a_A^{1/z_A}} = K_{A, B} \frac{\bar{a}_B^{-1/z_B}}{a_B^{1/z_B}}$$

где \bar{a}_A , \bar{a}_B — активность соответствующих ионов в ионите; a_A , a_B — активность ионов в растворе; z_A , z_B — заряды обменивающихся ионов.

Из уравнений следует, что равновесное отношение концентраций или активностей ионов в твердой фазе является линейной функцией такого же отношения в жидкой фазе с учетом величины зарядов ионов.

Если на графике по оси абсцисс откладывать равновесные отношения ионов в растворе, а по оси ординат — равновесные отношения в твердой фазе, то можно получить изотермы ионного обмена (если равновесие достигнуто и измерения произведены при постоянной температуре). Прямолинейность изотермы свидетельствует о соблюдении закона действующих масс (рис. 12), если же она представляет собой кривую, то имеются отклонения от нормы. Для разбавленных растворов закон действующих масс выполняется удовлетворительно.

Константа ионного обмена равна тангенсу наклона кривой, изображающей изотерму ионного обмена, к оси абсцисс. Физический смысл константы ионного обмена заключается в том, что она дает возможность получить количественную характеристику способности ионита к обмену с различными ионами из раствора.

Таким образом, различие в величинах констант ионного обмена является важнейшим фактором, обуславливаю-

щим применение ионообменников для разделения смеси ионов.

Ионитами, или ионообменными сорбентами, называются твердые, нерастворимые в воде и органических растворителях, природные или искусственные материалы, способные к ионному обмену.

По химическому составу иониты делят на минеральные и органические.

Свойствами ионитов обладают многие природные и синтетические вещества. Важнейшими из них являются синтетические смолы, угли и некоторые минеральные иониты.

Природные минеральные иониты, как правило, кристаллические силикаты, жесткая решетка которых несет избыточный заряд. Наиболее важными представителями этой группы ионитов являются цеолиты, способные к обмену катионов, такие как анальцит, шабазит, гармотом, гейландит, натролит.

Единственным минеральным анионом, применяющимся в качестве анионообменника, является гидроксипатит $[Ca_5(PO_4)_3]OH$.

Синтетические неорганические иониты представлены двумя группами: плавленными и гелеобразными пермутитами. Плавленные пермутиты получают сплавлением смеси соды, поташа, полевого шпата и каолина. Хотя они имеют неправильную форму, их свойства сходны с цеолитами.

В качестве неорганического ионита может применяться специально активированный оксид алюминия.

Органические иониты получают на основе синтетических смол. Они обладают большой физической и механической прочностью, высокой обменной емкостью и избирательностью. Основой таких адсорбентов являются высокомолекулярные соединения, состоящие, например, из *n*-сульфофенола и формальдегида, полимеров полистирола и дивинилбензола.

Синтетические ионообменные смолы представляют собой типичные гели. Их каркас-матрица состоит из неправильной высокополимерной пространственной сетки углеродородных цепочек. В матрице закреплены группы, несущие заряд, так называемые фиксированные ионы. У катионитов это чаще всего группы $-SO_3^-$, $-COO^-$, $-PO_3^{2-}$, $-AsO_3^{2-}$, у анионитов $-NH_2$, $>NH_2$, $\equiv N^+ -$, $\equiv S^+$.

Матрицы ионита гидрофобны. Введение фиксированных ионов означает введение в гидрофобную матрицу гидрофильных групп, вследствие чего матрица приобретает способность к набуханию, а смола превращается в полиэлек-

тролит. Зерно ионита по сути является гигантской молекулой. Чтобы ее растворить, нужно разорвать С—С-связи. Поэтому иониты нерастворимы во всех тех растворителях, которые не разрушают сам ионит.

Свойства синтетических ионитов в основном определяются числом и типом фиксированных ионов, а также строением матриц, особенно количеством поперечных связей в ней. Число гидрофобных групп и количество поперечных связей в матрице определяют степень набухания, подвижность и другие параметры.

В последнее время в биохимической практике все шире используются иониты на целлюлозной основе: диэтиламиноцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза), триэтиламиноцеллюлоза (ТЭАЭ-целлюлоза), карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза). Иониты на целлюлозной основе сильно гидрофильны, целлюлоза выполняет роль водяной колонки, что дает возможность разделять лабильные высокополимерные соединения, также как белки, нуклеиновые кислоты и др.

ДЭАЭ-целлюлоза синтезируется при действии на целлюлозу хлористого β -хлорэтилдиэтиламмония в щелочной среде и приобретает свойства анионообменника.

КМ-целлюлозу получают при обработке щелочной целлюлозы монохлоруксусной кислотой, в результате чего целлюлоза обогащается карбоксильными группами, придающими ей свойства катионообменника.

Кроме целлюлозы в качестве матрицы применяют декстран, сополимер стирола и дивинилбензола, полиакриламид.

В зависимости от химического состава и степени диссоциации иониты делятся на четыре группы:

1. Сильнокислые катионы, характеризующиеся легкостью вытеснения из них противоионов водорода другими катионами, т. е. они проявляют свойства сильных кислот. Фиксированными ионами очень кислых катионитов являются сульфогруппы $-\text{SO}_3^-$ или фосфогруппы $-\text{PO}_4^{2-}$. Представителями этой группы являются катиониты КУ-4 и КУ-2, вофатиты.

2. Слабокислые катиониты, которые характеризуются незначительной обменной способностью при низких значениях рН. Фиксированными ионами являются в основном карбоксильные группы $-\text{COO}^-$. Примеры слабокислых катионитов: КБ-4, амберляйт, Дауэкс-50, КМ-целлюлоза.

3. Сильноосновные аниониты, характеризующиеся хорошей диссоциацией в кислой, нейтральной и щелочной средах. Они содержат фиксированные группы четвертичного

аммония ($-\text{N}=\text{N}$) или пиридиновые группы. Примером может быть анионит АВ-16 и АВ-17, некоторые виды вофатита, пермутит.

4. Слабоосновные аниониты, которые характеризуются хорошей диссоциацией в кислой среде. Они содержат вторичные ($\text{N}=\text{N}$) или третичные ($-\text{N}=\text{N}$) аминогруппы. Это ДЭАЭ-целлюлоза и ТЭАЭ-целлюлоза.

Кроме ионогенных групп на обмен ионов влияет также структура матрицы ионита. Наилучшая форма зерна ионита — сферическая.

Сорбционные свойства ионообменных смол могут быть в некоторой мере заданы в процессе их изготовления. Ионогенные группы вводятся в выходящее вещество до процесса самообразования или присоединяются потом к высокомолекулярной структуре.

Общепринятой рациональной системы маркировки ионитов пока нет.

Основными свойствами ионитов должны быть: 1) нерастворимость в воде и органических растворителях; 2) механическая прочность; 3) химическая стойкость к кислотам, щелочам, окислительно-восстановительным веществам; 4) высокая ионообменная емкость, которая определяется числом активных групп (в миллиграмм-эквивалентах) на единицу массы ионита (в граммах); 5) способность ионообменников легко регенерироваться; 6) хорошие кинетические свойства, т. е. достаточная скорость ионного обмена.

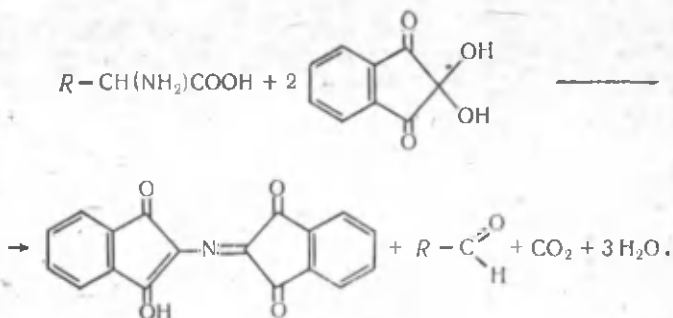
В ионообменной хроматографии разделение компонентов смеси возможно благодаря многократному обмену ионами между ионитом и раствором.

Ионообменная хроматография широко используется в промышленности для очистки различных веществ, например для обессоливания воды, при получении антибиотиков, ионитного молока и др. В биохимии этим методом пользуются для получения и очистки белков, в том числе ферментов, нуклеиновых кислот и других веществ.

Ионообменная хроматография используется для качественного и количественного определения аминокислот при помощи анализатора аминокислот.

Принцип работы аминокислотного анализатора

Аминокислотный анализатор представляет собой комплексный прибор для хроматографического анализа смеси аминокислот или более сложных смесей на ионообменных колонках с колориметрической оценкой после нингидриновой реакции:



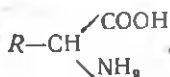
Принцип работы этого прибора состоит в том, что аминокислоты сорбируются на определенном адсорбенте, в качестве которого используют ионообменную смолу сульфополистирол с ионогенными группами SO_3H (сильнокислый катионит).

Для постоянства pH исследуемых растворов смолу используют в форме натриевой соли. Для этого перед работой колонку промывают щелочью, переводя функциональные группы в форму $-\text{SO}_3\text{Na}$. При сорбции аминокислот происходит их обмен с ионами Na^+ , поэтому аминокислоты должны быть катионами. Этого можно достигнуть, если сорбцию аминокислот проводить из буферных растворов с $\text{pH}=2$, при котором диссоциация карбоксильных ионов угнетена, а все аминогруппы будут иметь положительный заряд.

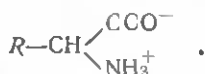
Далее проводят медленную (скорость движения жидкости 30 мл/ч через площадь с сечением колонки 5 см) элюцию аминокислот. Аминокислоты при этом разделяются благодаря разнице их электрохимических (кислотно-основных) свойств.

Поскольку каждая аминокислота имеет не менее двух групп, способных к электролитической диссоциации (NH_2 - и COOH -группы), то для них характерны две константы диссоциации. Диссоциация карбоксильной группы характеризуется константой K_1 . Обычно пользуются величиной $-\lg K_1 = \text{p}K_1$, которая является основной характеристикой слабого электролита. Диссоциация аминогруппы определяется константой диссоциации K_2 и, соответственно, $-\lg K_2 = \text{p}K_2$.

У разных аминокислот обе величины $\text{p}K_1$ и $\text{p}K_2$ варьируют в зависимости от свойств бокового радикала R в аминокислоте:



Кроме того, у некоторых аминокислот в самом радикале есть группы, которые способны диссоциировать и которые определяют третью константу K_3 и pK_3 . Значения pK_1 для различных аминокислот лежат в пределах $pH = 2,5-4,5$; pK_2 — в пределах $pH = 7-9$. Для каждой аминокислоты существует три критических области pH . При $pH < pK_1$ аминокислота заряжена положительно (катион), при $pH > pK_2$ аминокислота заряжена отрицательно (анион). При $pK_1 < pH < pK_2$ аминокислота имеет одновременно два заряда, являясь биполярным ионом, или цвиттер-ионом:



В этом состоянии аминокислоты имеют значительный дипольный момент. В форме двухзарядного иона аминокислота уже не может сорбироваться на катионите, и по мере того, как pH раствора будет приближаться к pK_1 аминокислоты, начнется элюция аминокислоты из катионитной колонки.

Аминокислоты в катионной форме стремятся вытеснить из частиц смолы некоторые из связанных ими ионов Na^+ ; степень вытеснения для разных аминокислот слегка варьирует в зависимости от небольших различий в степени их ионизации. При $pH = 3,0$ наиболее прочно связываются со смолой за счет электростатических сил основные аминокислоты (лизин, аргинин и гистидин) и наименее прочно — кислые (глутаминовая и аспарагиновая кислоты). При постепенном повышении pH и концентрации $NaCl$ в элюирующем водном растворе аминокислоты перемещаются вниз по колонке с различными скоростями и могут быть собраны в виде многочисленных фракций небольшого объема. Все аналитические операции — элюция, сбор фракций, анализ каждой фракции и регистрация данных выполняются автоматически с помощью сервомеханизмов в приборе.

Поскольку pK_1 у аминокислоты варьируется в пределах двух единиц pH , то можно смыть всю серию аминокислот последовательно с помощью двух буферных растворов: одного — с $pH = 3,5$, другого — с $pH = 5,5$. Отдельно необходимо смывать диаминокислоты (лизин, аргинин), которые сорбируются своей ионизированной аминогруппой, находясь в радикале.

Когда ионизируется карбоксильная группа, никакой сорбции не наблюдается, и аминокислоты остаются на поверхности. Чтобы смыть их, необходимо разредить боко-

вую NH_3^+ группу буферным раствором с $\text{pH}=11$, который снимает с поверхности катионита все аминокислоты.

При определении аминокислот очень маленькие и очень точные насосы-дозаторы пропускают буферный раствор через колонку, причем в определенные промежутки времени по заданной программе происходит переключение одного элюирующего буферного раствора на другой. После колонки жидкость, которая содержит аминокислоты, автоматически смешивается с нингидриновым реактивом (0,1%) в тонкой (1 мм в диаметре) пластмассовой трубке длиной 30 мм, которая находится в термостате при 100°C . В этой трубке в течение 15 мин происходит цветная реакция нингидрина с аминокислотами. Нингидриновое окрашивание проявляется почти одинаковым на 1 моль любой аминокислоты (кроме пролина и оксипролина). Поэтому фотокolorиметры обычно калибруют при помощи одной из аминокислот, а потом вводят только небольшие поправки (на 1—2%) для каждой следующей аминокислоты. Пролин и оксипролин фотометрируются отдельно. Аминокислотный анализатор — очень совершенный прибор, который позволяет определить аминокислоты с точностью до 0,1%.

В анализаторе аминокислот стандартного типа используют четыре ионообменные колонки. Из них две большие, например по 150 см, и одна маленькая, например 15 см, составляют классическую тройку колонок, которые предназначены для анализа смеси обычных аминокислот. Четвертая — средняя колонка предназначена для анализа щелочных компонентов более сложных смесей. Более кислые компоненты таких смесей разделяются в одной из больших колонок.

Колонки имеют внутренний диаметр 0,9 см, а их номинальная длина зависит от количества ионообменника. Все колонки имеют стеклянные термостабилизированные кожухи, в которых циркулирует вода, температура воды поддерживается отдельным термостатом.

В больших колонках проводится хроматографическое разделение кислых и нейтральных аминокислот вначале 0,2 н. дитратным буферным раствором с $\text{pH}=3,25$, а затем тем же раствором, но с $\text{pH}=4,25$. Этим буферным раствором и заканчивается элюция нейтральных аминокислот. Процесс разделения аминокислот в зависимости от марки прибора происходит от 4 до 16 ч (это же время необходимо для регенерации колонки). Щелочные аминокислоты после окончания разделения кислых и нейтральных аминокислот реадсорбируются из колонки элюцией при помощи 0,2 н. раствора NaOH .

После регенерации колонка снова стабилизируется буферным раствором, которым начинается элюция кислых аминокислот, т. е. 0,2 н. цитратным буферным раствором с $pH = 3,25$.

Элюент, имеющий кислые и нейтральные аминокислоты, подается на отсчетное устройство. Элюент, вытекающий из колонки при регенерации и повторной стабилизации, идет в отходы.

Разделение щелочных аминокислот проводится в маленькой колонке 0,35 н. цитратным буферным раствором с $pH = 5,28$. Для этого в колонку необходимо внести другую aliquоту анализируемого материала.

Сначала кислые и нейтральные аминокислоты выходят из колонки в неразделенном виде и выводятся в отходы, а затем, когда элюент вымывает щелочные аминокислоты (лизин, аргинин, а также остатки триптофана и гистидина), он подается в отсчетное устройство.

Окрашенный раствор аминокислот поступает в кювету фотометра. Фотометр реагирует на присутствие окрашивания переменной величиной тока, которая регистрируется автоматически в форме кривых. Площади, ограниченные записанными кривыми, количественно отвечают содержанию отдельных компонентов в аминокислотных смесях. Регистрация происходит при помощи трех показателей в виде кривых, отличающихся цветом и отмечающих трех режимам в трех фотометрических единицах.

Основная кривая соответствует измерению в спектральном диапазоне 570 нм, другая — 440 нм для анализа пролина и оксипролина, а третья однотипна с первой, но соответствует измерению с чувствительностью, сниженной на одну треть, что является полезным в тех случаях, когда содержание некоторых аминокислот очень высокое и анализ с помощью кривой был бы недостаточно точным.

Спектрофотометрическое определение величины поглощения при 570 нм фиолетово-синего продукта реакции позволяет количественно определить очень низкие концентрации α -аминокислот. Но точность и воспроизведение этого метода в большей мере зависят от условий проведения реакции, чистоты реактивов, полноты очистки растворов от перекисей.

Таким образом, автоматическим анализатором можно проводить полный аминокислотный анализ любого из изучаемых материалов в малых количествах за короткий промежуток времени с высокой степенью точности.

Особенности работы с ионообменниками

В первую очередь следует выбрать, какой ионообменник нужен для решения данной задачи — анионит или катионит. Если вещества, которые должны связываться на колонке, имеют один заряд, выбор не представляет труда. Однако многие вещества (например, белки) несут как отрицательный, так и положительный заряд одновременно, и их общий заряд зависит от рН среды. В таких случаях решающим фактором служит стабильность вещества при различных значениях рН. Большинство белков стабильно в таких пределах значений рН (т. е. при которых они не денатурируют), когда они заряжены либо положительно, либо отрицательно. Следовательно, если белок стабилен при значении рН выше изоэлектрической точки, требуется анионит, если же он стабилен при рН ниже изоэлектрической точки, нужно использовать катионит. Выбор между сильным и слабым ионообменником также основан на влиянии рН на заряд и стабильность. Например, если вещество слабо ионизовано и требует при ионизации очень низких или очень высоких значений рН, для хроматографирования необходимо выбирать сильный ионообменник, поскольку он работает при экстремальных значениях рН. Однако, если вещество лабильно, следует предпочесть слабый ионообменник. Слабые ионообменники очень эффективны для отделения молекул с высоким зарядом от молекул с низким зарядом, поскольку слабо заряженные ионы обычно не связываются в таких условиях. Слабые ионообменники обычно обеспечивают лучшее разделение веществ с малыми различиями в зарядах.

Ионообменники типа сефадекса и биогеля очень хороши для макромолекул, нестабильных при низкой ионной силе. Так как поперечные связи в этих материалах увеличивают нерастворимость матрицы даже при ее высокой полярности, можно добиться в несколько раз большей плотности ионизирующихся групп, чем это достижимо в ионообменниках на основе целлюлозы. Увеличение плотности заряда означает увеличение сродства, т. е. связывание может осуществляться при более высокой ионной силе. С другой стороны, эти ионообменники обладают некоторыми свойствами молекулярных сит, поэтому иногда различия в молекулярных массах могут аннулировать распределение, вызванное различием в зарядах.

Поскольку буферные системы сами по себе состоят из ионов, они также принимают участие в ионном обмене, в результате чего значение рН может изменяться. Для реше-

ния этой проблемы катионные буферные растворы используются с анионитами, а анионные — с катионитами. Поскольку связывание зависит от ионной силы, выбранный буферный раствор должен иметь большую буферную емкость, но при этом ионная сила не должна быть слишком высокой. Более того, для улучшения разрешения принято использовать для элюирования ионные условия, близкие к тем, которые были в пробе при нанесении его на колонку (так называемые стартовые условия). Принципиальной основой ионообменной хроматографии является то, что сродство вещества к ионообменнику зависит от электрохимических свойств его самого и относительного сродства других заряженных веществ, находящихся в растворителе. Следовательно, связанное вещество можно элюировать с помощью изменения рН до значения, изменяющего заряд вещества, или добавлением конкурирующего вещества. Поскольку различные вещества обладают разными электрохимическими свойствами, условия элюирования будут меняться для каждого вида связанных молекул. Для получения хорошего разделения следует выбрать либо непрерывное элюирование в градиенте ионной силы, либо ступенчатое элюирование. При хроматографии на анионитах постоянно повышают рН и ионную силу или только ионную силу элюента. Хроматографию на катионитах проводят как в градиенте рН, так и в градиенте ионной силы элюирующего буферного раствора. На практике выбор условий элюирования проводится методом проб и ошибок с учетом условий стабильности анализируемого вещества. Например, при хроматографии нестабильных соединений желательнее соблюдать постоянное значение рН.

Для разделения очень сходных веществ элюирование можно проводить без изменений рН или ионной силы. Например, предположим, что ионные условия выбраны таким образом, что связывание молекулы со многими центрами связывания настолько слабо, что существует определенная вероятность диссоциации всех связей в течение заданного времени. Таким образом, молекула находится с ионообменником в равновесии и будет перемещаться по колонке с определенной скоростью. Скорость движения будет соответствовать вероятности диссоциации, поэтому молекулы с мало отличающимся сродством к ионообменнику будут двигаться по колонке с различной скоростью, т. е. произойдет их разделение. Простой вариант этого метода называется он в том, что проба адсорбируется и элюируется в одном и том же растворителе. В общем разрешение улучшается, ес-

ли скорость тока очень мала, однако с уменьшением скорости тока появляется проблема диффузионного размывания, в результате которого разрешение может ухудшаться. Оптимальная скорость тока обычно определяется эмпирически.

При выборе условий элюирования важно представить себе, как элюируемая жидкость будет влиять на анализ вещества. Например, при использовании спектрального анализа буферный раствор не должен обладать поглощением в выбранном диапазоне длин волн. Если же образец анализируется по его радиоактивности с использованием счетчика Гейгера, то полезно использовать нелетучие буферные растворы для предотвращения включения радиоактивности в кристаллы, образующиеся в результате высыхания буферного раствора. В случае применения сцинтилляционного счетчика важно, чтобы элюируемая жидкость не содержала примесей, вызывающих тушение.

§ 4. ОСАДОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Осадочная хроматография — самая молодая и менее изученная отрасль хроматографического анализа, разработанная советским ученым В. Н. Гапоном (1948).

Основным фактором, определяющим разделение смеси веществ в осадочной хроматографии, является образование труднорастворимых осадков в определенном порядке.

Множественность элементарных актов образования и закрепления осадка в определенном месте колонки, а также его растворения, наряду с различием в растворимости получающихся осадков, определяют направление процесса.

Успех разделения смеси веществ, во-первых, определяется различием растворимости образующихся осадков; во-вторых, закреплением осадков в месте их образования, обеспечивающим множественность процесса. Считается, что равновесие между раствором и веществом, образующим осадки и находящимся в твердой фазе, устанавливается фактически мгновенно. При рассмотрении процесса хроматографирования пренебрегают наличием продольной диффузии.

Теория осадочной хроматографии развита К. М. Ольшановой (1963, 1965). Порядок расположения зон, образующихся в колонке осадков, зависит от способа получения хроматограмм. Различают два способа: 1) раствор хроматографируемых веществ вводится в колонку, в твердой фазе которой содержится осадитель; 2) раствор осадителя вводится в колонку, твердая фаза которой содержит опре-

деляемые вещества. Второй способ имеет меньшее практическое значение.

Образование осадков при хроматографии может происходить в жидкой фазе без прямого участия твердой фазы и в результате взаимодействия жидкой фазы с твердой. В связи с этим осадочную хроматографию делят на два вида.

К первому виду относятся те случаи, когда формирование осадка происходит только при участии компонентов, находящихся в жидкой фазе. Оно может обуславливаться различными причинами: малой растворимостью отдельных компонентов смеси, изменениями величины рН раствора в процессе хроматографирования, химическим взаимодействием компонентов смеси друг с другом. В любом случае образование осадков происходит без участия специального осадителя, находящегося в твердой фазе, а связано с изменениями условий существования компонентов в растворе. Так, при соприкосновении раствора определяемых компонентов с колонкой из оксида алюминия при $\text{pH} = 8-9$ происходит подкисление раствора и могут выпадать ионы Fe^{3+} , Cr^{3+} , Sb^{3+} ; образуются гидроксиды этих металлов, выпадающие в осадок.

Другим примером могут служить хроматограммы, образующиеся в колонках, в которых содержатся малорастворимые в применяемом растворителе вещества, образующие с ионами хроматографируемого раствора трудно растворимые осадки. Например, хроматограммы, получаемые на 8-оксихинолине или диметилглиоксиме. Часть твердого вещества, находящегося в колонке, переходит в жидкую фазу и вступает в реакцию с хроматографируемым раствором, а другая часть остается в твердой фазе и служит носителем образующихся осадков.

К этому же виду хроматограмм относят осадочные хроматограммы, образуемые ионообменниками, обменивающими ион, который способен давать малорастворимые осадки с ионами хроматографируемого раствора.

Роль носителя сводится, во-первых, к изменению условий, а следовательно, и свойств раствора; во-вторых, к достаточно прочному удерживанию образующихся осадков на своей поверхности.

Ко второму виду относят те случаи, когда формирование осадков происходит в колонках, состоящих из двух химически взаимодействующих фаз: жидкой, содержащей растворенные вещества, и твердой, вещества которой, вступая в химическое взаимодействие с компонентами раствора, образуют нерастворимые осадки. Кроме осадки-

теля, в твердую фазу должен еще входить носитель. Носителем может быть практически нерастворимое в применяемом растворителе высокодисперсное вещество, химически инертное ко всем составным частям хроматографируемого раствора и хорошо удерживающее на своей поверхности образующиеся осадки. Образование осадков происходит на поверхности носителя в результате взаимодействия адсорбированных молекул носителя с ионами раствора. Осадочная хроматография проводится в колонках, заполненных носителем и осадителем. Осадитель смешивается с носителем в сухом виде или добавляется в виде раствора. Второй вид осадочной хроматографии наиболее распространен.

§ 5. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Распределительная жидкостная хроматография основана на разных коэффициентах распределения компонентов смеси между двумя не смешивающимися жидкостями. Иногда ее рассматривают как разновидность адсорбционной хроматографии, так как степень разделения зависит от эффектов адсорбции, однако основным процессом является распределение.

Различие в коэффициентах распределения компонентов разделяемой смеси между двумя не смешивающимися жидкостями может быть использовано для хроматографического разделения и анализа. Такой вид хроматографии назван жидкостно-жидкостной хроматографией.

Как правило, в распределительной жидкостной хроматографии необходимо иметь подвижный и неподвижный растворители. В качестве неподвижного растворителя чаще всего используется вода, иногда и другие жидкости, например буферные растворы. Подвижным растворителем является менее полярная жидкость.

Вещество, содержащее неподвижный растворитель, называется носителем. В качестве носителя используются силикагель, порошкообразная целлюлоза, фильтровальная бумага, крахмал и другие вещества.

В распределительной хроматографии вода как неподвижная фаза иммобилизована носителем — веществом, с которым она соединяется или которым адсорбируется. Подвижной фазой может быть любое органическое вещество, например хлороформ — бутанол или фенол, которое содержит некоторое количество воды (часто до насыщения).

В зависимости от природы твердого носителя, жидкой подвижной фазы и способа проведения эксперимента в распределительной хроматографии выделяют колоночную и

плоскостную, к которой относят хроматографию на бумаге и тонкослойную.

В колоночной хроматографии в качестве твердого носителя неподвижной жидкой фазы может быть любое вещество, которое плотно удерживает неподвижную фазу, легко пропускает подвижную жидкую фазу и не вызывает дополнительных явлений (адсорбции веществ, каталитического действия на компоненты смеси и др.).

Наилучшим носителем в колоночной распределительной хроматографии является силикагель вследствие его способности задерживать без намокания определенное количество воды, что составляет иногда половину массы силикагеля.

Хроматография на бумаге

Одним из наиболее распространенных методов распределительной хроматографии является хроматография на бумаге, которая дает возможность выделить и охарактеризовать очень малое количество веществ. Распределительная хроматография на фильтровальной бумаге предложена в 1944 г. А. Мартином и сотр. Преимущество метода состоит в том, что он прост по технике исполнения, высокочувствительный (для некоторых аминокислот меньше 0,5 мкг вещества) и дает возможность определять одновременно большое количество различных аминокислот, пептидов, углеводов и других веществ, находящихся в сложной смеси.

Принцип метода состоит в том, что воздушно-сухая бумага задерживает некоторое количество влаги и таким образом выполняет роль водяной колонки. Скорость движения зоны исследуемого компонента зависит от соотношения между его растворимостью в органическом растворителе и растворимостью в воде. Чем больше его растворимость в органическом растворителе, тем быстрее (ближе к фронту растворителя) будет перемещаться этот компонент; чем больше его растворимость в воде, тем больше он будет удерживаться влагой, содержащейся в бумаге, и тем медленнее он будет двигаться.

Распределение отдельных компонентов смеси веществ на хроматограмме таким образом происходит вследствие наличия разных величин коэффициентов распределения этих веществ между двумя фазами растворителя, которые не смешиваются. Практически рассчитать коэффициент распределения очень трудно.

Для распределения веществ имеет значение даже небольшая их растворимость. Вместе с тем на распределение веществ между двумя фазами влияет адсорбция и ионный

обмен, которые имеют меньшее значение в хроматографическом разделении веществ на бумаге.

Скорость движения веществ в растворителе различна, зависит она от природы растворителя, молекулярной природы вещества и адсорбционных свойств бумаги.

В распределительной колоночной хроматографии движение зон разделяемой смеси количественно описывается величиной R_F , названной Фуксом подвижностью:

$$R_F = \frac{S}{S_n - K_D S_n}$$

где S — поперечное сечение колонки; S_n — поперечное сечение подвижной жидкой фазы; S_n — поперечное сечение неподвижной фазы; K_D — коэффициент распределения.

$$K_D = \frac{\text{Количество вещества в 1 мл неподвижной фазы, г}}{\text{Количество вещества в 1 мл подвижной фазы, г}}$$

В бумажной хроматографии величину R_F измерить невозможно, поэтому для характеристики поведения зон на бумаге вводят величину R_f , которую также называют подвижностью:

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, которое прошел исследуемый компонент, см}}{\text{Расстояние, которое прошел фронт растворителя, см}}$$

Величину R_f можно выразить через смещение зоны при промывании чистым растворителем.

Если величину смещения фронта растворителя обозначить x_f , то R_f определяется равенством:

$$R_f = x/x_f$$

Рассмотрим пример разделения двух компонентов смеси. На рис. 13 x_1 и x_2 — это путь, пройденный первым и вторым компонентами разделяемой смеси от начального положения; x_f — путь, пройденный фронтом растворителя. Если $x_1 \neq x_2$, то величины их R_f не будут равны и зоны компонентов смеси разделяются. Поэтому величина R_f может характеризовать способность двух несмешивающихся жидкостей к разделению смеси веществ.

В идеальном случае R_f характеризует скорость перемещения зоны компонента по бумаге и не зависит от присутствия других веществ, а зависит только от природы выбранных подвижной и неподвижной фаз и определяется только коэффициентом распределения и параметрами бумаги. На практике вследствие взаимодействия веществ смеси с носителем, отклонения процесса от равновесия и

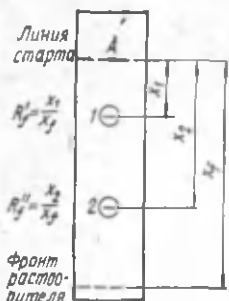


Рис. 13. Определение компонентов на бумажной хроматограмме:

x_1 , x_2 , x_3 — путь, пройденный соответственно компонентами 1, 2 и растворителем; R_f^1 , R_f^2 — коэффициенты распределения компонентов.

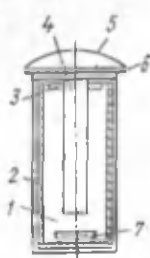


Рис. 14. Камера для нисходящей хроматографии:

1 — стеклянная камера; 2 — подставка для кюветы; 3 — кювета; 4 — бумажная полоска; 5 — крышка камеры; 6 — шлиф; 7 — сосуд с растворителем.

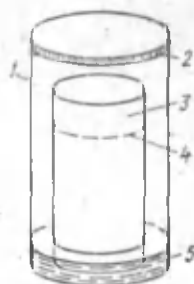


Рис. 15. Камера для восходящей хроматографии:

1 — стеклянная камера; 2 — крышка камеры; 3 — хроматографическая бумага; 4 — фронт растворителя; 5 — растворитель.

других причин R_f зависит от природы и качества носителя, техники эксперимента, температуры, чистоты исследуемых веществ и растворителей и других факторов.

Величины R_f и K_p можно определить экспериментально из хроматографических данных. Для этого следует измерить на хроматограмме величины смещения зон веществ и фронта растворителя:

$$K_p = S_{\text{п}}/S_{\text{н}}(1/R_f - 1).$$

Вместо значения $S_{\text{п}}/S_{\text{н}}$ можно использовать величину $V_{\text{п}}/V_{\text{н}}$ — отношение объемов подвижного растворителя к неподвижному в 1 см бумаги.

Величины R_f для компонентов разделяемой смеси должны быть очень большими, но и не слишком малы. В первом случае смесь не будет двигаться вместе с фронтом растворителя, во втором — смесь останется на месте старта. Для водорастворимых веществ обычно используют органические растворители, которые содержат влагу, а для веществ, которые растворяются в органических растворителях, — водные растворы, насыщенные органическими растворителями.

Различают следующие виды бумажной хроматографии: нисходящую, когда разделение веществ осуществляется движением растворителя вниз по бумаге (рис. 14), и восходящую, когда движение растворителя по бумаге происходит снизу вверх (рис. 15). В нисходящей хрома-

тографии можно использовать длинные полоски бумаги, что дает возможность большего разделения отдельных компонентов смеси. Преимущество восходящей хроматографии в том, что она чрезвычайно проста и не требует сложного оборудования.

Хроматографию на бумаге делят также на одномерную и двумерную. Одномерной хроматографию называют тогда, когда используется растворитель в одном направлении. Для одномерной хроматографии чаще всего используются полоски бумаги шириной 1,5—5 см, длиной 20—50 см.

При разделении многокомпонентных смесей одномерной хроматографией не удастся четко идентифицировать отдельные компоненты, так как величина R_f для ряда компонентов при использовании определенного растворителя очень близка. В таких случаях применяют двумерную хроматографию. Она состоит в том, что к одной хроматограмме используют два различных растворителя в разных направлениях. Для этой цели пригодны квадратные листы бумаги размером 45×45 см или 50×50 см. На расстоянии 2—3 см от обоих концов листа бумаги наносят исследуемый раствор и одним растворителем проводят хроматографирование в одном направлении. Используется как нисходящая, так и восходящая хроматография. Затем хроматограмму высушивают, поворачивают на 90° и пропускают новый растворитель. Таким образом, компоненты в различных растворителях движутся с разной скоростью и распределяются по всему листу бумаги.

Одним из видов бумажной хроматографии является радиальная, или круговая, хроматография. Для получения хроматограммы из хроматографической бумаги вырезают круг диаметром на 1 см больше хроматографической камеры. Круг простым карандашом делят на секторы (не более 8 см), затем радиусом 2—4 см вычерчивают другой круг, на котором в середине каждого сектора ставят крестик (или точку) для нанесения раствора. С одной стороны вырезают полоску («хвост») для того, чтобы опустить ее в растворитель (рис. 16).

Можно в центре круга сделать небольшой прорез, куда вставляется плотный фитиль из фильтровальной бумаги.

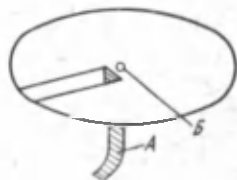


Рис. 16. Форма хроматографической бумаги для разделения методом круговой хроматографии: А — фитиль; Б — точка нанесения разделяемой смеси.

Фитиль нужно вставлять в прорез плотно, чтобы не нарушить силы сцепления в растворе. Фитиль опускают в растворитель так, чтобы он не доходил до дна камеры. Края фильтровальной бумаги должны удерживаться на стенках камеры. Хроматографию можно проводить даже в эксикаторе.

С помощью бумажной хроматографии можно разделять сложные смеси, проводить очистку веществ от примесей, концентрировать вещества и идентифицировать их.

В настоящее время распределительная хроматография на бумаге широко используется для разделения аминокислот и пептидов, углеводов и гормонов, пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеиновых кислот, для разделения и очистки антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, aureомицина и др.).

Для получения бумажных хроматограмм в распределительной хроматографии используется любой сорт высококачественной фильтровальной бумаги, которая имела бы одинаковую толщину и минимальное содержание зольных и других примесей. Кроме того, хроматографическая бумага должна быть достаточно плотной и пропускать растворитель со скоростью около 1 см/ч, не адсорбировать анализируемые вещества и в то же время хорошо удерживать на своей поверхности жидкости, не смешивающиеся с подвижным растворителем.

Фильтровальная бумага для хроматографии изготавливается из различных видов клетчатки (целлюлозы) и не обрабатывается клеем. Волокна бумаги очень гигроскопичны, т. е. способны задерживать влагу на поверхности волокон целлюлозы (капиллярная влага), причем эта влага стационарна, так как удаляется очень трудно. Эта способность как раз имеет большое значение для распределения веществ, которые растворены в воде.

Водонасыщенная бумага является концентрированным полисахаридом, который обладает свойствами геля и не является совершенно нейтральной средой. В процессе получения бумаги в ней неизбежно образуются карбоксильные группы, обуславливающие отрицательный заряд и слабые катионообменные свойства. Всегда присутствующие в бумаге альдегидные группы реагируют с аминокислотами, усиливая их флуоресценцию в УФ-свете.

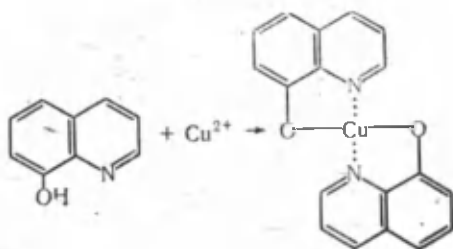
Часто на хроматограммах, полученных с фенолом, бутиловым и бензиловым спиртами, пятна аминокислот имеют «хвосты». Это явление вызывается соединением аминокислот с медью и его можно устранить добавлением в атмосферу камеры или к растворителю веществ, образуя-

щих с медью более прочный комплекс, чем с аминокислотами.

Отечественные сорта бумаги изготавливаются марок «быстрая» (Б) и «медленная» (М). Бумага различных номеров имеет различную плотность, а следовательно, и скорость движения растворителя в ней неодинакова. С увеличением номера бумаги плотность возрастает. Бумага № 1 и 2 называется «быстрой», № 3 и 4 — «медленной». Из импортных сортов широко применяют бумагу Ватман № 1 или Шлейхер и Шульц № 598.

При хроматографии сложной смеси веществ необходимо учитывать расположение волокон бумаги и вдоль этих волокон направлять движение растворителя. Поскольку бумага для анализа недостаточно чистая, ее перед работой промывают 1—2 мин 0,15%-м раствором оксихинолина в смеси *n*-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5), высушивают и снова промывают этим раствором в течение 36—48 ч.

8-Оксихинолин связывает ионы двухвалентных металлов по схеме:



Очищать бумагу можно 1%-м раствором версена (трилон Б, ЭДТА). Во время хроматографирования колебания температуры не должны превышать $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$.

К растворителям, используемым в распределительной хроматографии, предъявляются следующие требования:

1. Растворитель выбирают так, чтобы компоненты смеси имели малую, но определенную подвижность. Константа распределения их должна быть больше единицы, т. е. растворимость в неподвижном растворителе должна быть больше, чем в подвижном. Растворимость компонентов должна быть различной.

2. Состав растворителя должен быть постоянным в процессе хроматографирования.

3. Отдельные компоненты смеси должны быть легко доступны и достаточно чисты для непосредственного применения.

4. Растворы должны быть стойкими на воздухе и при смешивании с небольшими количествами кислых и щелочных паров.

5. Растворители должны быть такими, чтобы из них можно было готовить требуемую смесь простым смешиванием перед употреблением или их можно было заготавливать для дальнейших исследований в большом количестве.

6. Растворители должны быть малоподвижными или их подвижность должна быть примерно одинаковой, тогда бумага будет пропитываться парами отдельных компонентов с одинаковой скоростью.

7. Должна существовать возможность быстрого и полного удаления растворителя после окончания хроматографирования. Следы неудалившегося или неудаляемого растворителя не должны взаимодействовать с реактивом, применяемым для проявления хроматограммы.

8. Растворитель должен оставаться гомогенным при всех колебаниях температуры.

9. Растворитель не должен вступать в реакцию ни с одним из разделяемых веществ.

10. Разделяемые вещества должны распределяться по всему бумажному листку от исходной точки и до фронта растворителя. Если фронт сошел с бумаги, то наиболее подвижный компонент должен находиться у нижнего края бумажного листа.

Ни один из растворителей не обладает всеми перечисленными свойствами, преимущества и недостатки каждого из растворителей должны учитываться в каждом случае отдельно.

§ 6. ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ

При хроматографии в тонком слое используется недорогое оборудование. Оно отличается простотой исполнения и эффективностью разделения, которая в тонком слое составляет порядка 1000 теоретических тарелок. Жидкая фаза, продвигающаяся по слою за счет капиллярных сил, перемещает с различными скоростями компоненты разделяемой смеси.

Тонкослойная хроматография в зависимости от условий эксперимента и задач разделения может быть адсорбционной, распределительной, ионообменной, молекулярно-ситовой.

Впервые этот метод был описан в 1938 г. Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер, которые в тонком, не закрепленном на покровном стекле, слое оксида алюминия раздели-

ли алкалоиды из вытяжек лекарственных растений. Метод хроматографии на закрепленных слоях сорбента был разработан благодаря работам Э. Штала (1956—1961). Этот метод более чувствителен, чем хроматография на бумаге, и дает возможность определять очень малые количества веществ (от 0,1 до 0,005 мкг).

При использовании тонкослойной хроматографии на одну сторону небольшой стеклянной пластинки наносят тонкий слой адсорбента. На стартовую линию такого слоя, как и на бумагу в бумажной хроматографии, наносят пробы веществ и их смеси. Край пластинки ниже стартовой линии погружают в систему растворителей в каком-нибудь герметически закрытом сосуде. Благодаря перемещению растворителя по пластинке происходит разделение смеси веществ на отдельные компоненты. Отмечают фронт растворителя, пластинку высушивают и окрашивают необходимым красителем для обнаружения веществ в виде окрашенных пятен. Отмечают положение пятна, а затем определяют R_f соединений.

Адсорбент можно использовать без связывающего вещества или же с ним. Однако пластинки, покрытые адсорбентом без связывающего вещества, имеют недостаточно плотный слой. Этот недостаток можно устранить тем, что к адсорбенту добавляю связывающее вещество в определенной пропорции. Наиболее часто в качестве адсорбентов используются силикагель, оксиды алюминия, магния или кальция, карбонаты и сульфаты, целлюлоза, ДЭАЭ-целлюлоза, ионообменные смолы. В качестве связывающего вещества используются гипс, крахмал, коллодий, раствор ацетилцеллюлозы в ацетоне и др.

Для нанесения адсорбента на пластинку готовится сметаноподобная масса, которая при помощи аппликатора наносится слоем 0,3—0,2 мм на пластинку.

Растворителями могут быть бензол, дихлорэтан, бензол — ацетон, хлороформ — бутанол, циклогексан и т. д. Двукратная хроматография часто применяется для очистки исследуемого вещества от примесей, если R_f его равно 0 и оно остается на месте старта.

В последнее время в биохимической практике широко используются готовые пластинки, такие как фиксион и силуфол. Фиксион — готовые хроматографические пластинки для тонкослойной хроматографии на алюминиевой фольге. Фиксион 50×8 имеет сильный катионообменный слой в натриевой форме. Фиксион 2×8-УФ₂₅₄ имеет анионообменный слой в ацетатной форме, содержащий флуоресцентный индикатор. Силуфол УФ₂₅₄ — готовые пластинки для тонко-

слойной хроматографии на алюминиевой фольге. Сорбентом является широкопористый силикагель с люминесцентным индикатором для УФ₂₅₄. Связывающим веществом является крахмал.

§ 7. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газовая хроматография — это метод разделения летучих соединений, основанный на распределении веществ между двумя фазами, причем подвижной фазой является газ.

Если неподвижная фаза твердая, то говорят о газодсорбционной хроматографии. Разделение в этом случае определяется адсорбционными свойствами наполнителя колонки по отношению к разделяемым компонентам. Наиболее употребляемые наполнители — силикагель, молекулярные сита, активированный уголь.

Если неподвижная фаза жидкая, то говорят о газожидкостной хроматографии. В этом случае жидкая фаза распределяется в виде тонкой пленки на поверхности инертного твердого носителя, и основой разделения служит распределение веществ пробы между пленкой жидкости и газовой фазой. Широкий выбор жидких фаз с рабочими температурами до 400°C делает этот метод наиболее гибким и селективным. Он применяется для разделения газов, жидких и твердых соединений, которые могут быть переведены в газообразное состояние без изменения структуры. Благодаря сравнительно низкой вязкости и плотности газов сопротивление разделительной колонки газовому потоку невелико. Это максимально сокращает продолжительность анализа при достаточно высокой эффективности разделения, обеспечиваемой интенсивным массообменом на поверхности неподвижной фазы.

Газовую хроматографию осуществляют преимущественно в виде проявительного варианта. Фронтальный анализ и вытеснительная хроматография применяются главным образом для препаративных целей.

Хроматографическое разделение веществ связано с двумя факторами: эффективностью колонки и эффективностью фазы (или селективностью фазы, что определяется различием удерживаемых объемов). Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок.

Силы взаимодействия, которые принимают участие в процессе газохроматографического разделения, следующие:

1. Ориентационные силы (силы Кизома), возникающие при взаимодействии двух диполей. Водородная связь явля-

ется наиболее важным типом ориентационных сил. Это специфический вид взаимодействия, в котором наряду с электростатическим существенную роль играет электронное взаимодействие.

2. Индукционные силы (силы Дебая), возникающие при взаимодействии постоянного диполя одной молекулы и наведенного диполя соседней молекулы. Как правило, они очень малы.

3. Дисперсионные, или неполярные, силы (силы Лондона), возникающие при синхронных колебаниях мгновенных диполей двух взаимодействующих молекул. Они проявляются во всех случаях и являются единственным источником энергии для двух неполярных соединений. По сравнению с двумя предыдущими эти силы гораздо слабее. Соотношение энергий дисперсионного и ориентационного взаимодействия зависит от числа валентных электронов и величины дипольного момента.

4. Специфические силы взаимодействия, возникающие при образовании химической связи или при комплексообразовании между растворенным веществом и растворителями.

Все перечисленные силы взаимодействия определяют достигаемое разделение. Их суммарный эффект выражается коэффициентом распределения K :

$$K = \frac{\text{Концентрация анализируемого вещества в единице объема жидкой фазы}}{\text{Концентрация анализируемого вещества в единице объема газовой фазы}}$$

Величина K сильно возрастает, если большая часть веществ задерживается жидкой фазой. При этом скорость перемещения веществ вдоль колонки мала, поскольку перемещение в жидкой фазе незначительно, и по колонке движется только та малая часть вещества, которая находится в газовой фазе.

Если процесс газожидкостной хроматографии рассматривать как процесс растворения и выделения газа или пара в пленке жидкой фазы, то для нее справедливо уравнение:

$$u_c = \omega / (V_1^0 + V_2^0 \Gamma),$$

где u_c — линейная скорость перемещения компонента разделяемой смеси; ω — объемная скорость газовой фазы; V_1^0 — объем газовой фазы; V_2^0 — объем газовой фазы, растворенной в жидкой фазе в единице длины колонки; Γ — коэффи-

коэффициент Генри, который определяет растворимость газовой фазы в жидкой. Скорость перемещения компонентов разделяемой смеси вдоль колонки тем больше, чем меньше коэффициент Генри, т. е. чем труднее растворяется газовая фаза в жидкой.

Газовая хроматография — довольно простой метод; необходимое для него оборудование относительно недорогое по сравнению с оборудованием для некоторых иных инструментальных методов, надежно в работе. Для анализа достаточно несколько миллиграммов вещества. Результаты анализа автоматически регистрируются в удобном для количественной оценки виде, а при наличии соответствующей аппаратуры количественное определение может быть полностью автоматизировано. Обычно для этого надо знать качественный состав образца, но возможен также анализ смесей и с неизвестным составом.

Газовую хроматографию можно применять вместо других аналитических методов изучения структуры вещества. Для нее характерна исключительно высокая разрешающая способность; практически нет такой пары веществ, которые нельзя было бы разделить с помощью газовой хроматографии, если даже это не удастся сделать другими методами. Основное преимущество газовой хроматографии заключается в скорости выполнения анализа. За несколько минут или даже секунд результат анализа можно получить в виде колонки цифр, либо качественной или полуколичественной хроматограммы. Газовая хроматография — быстрый аналитический метод, пригодный для исследования всех летучих веществ. Для таких веществ с помощью данного метода анализа можно получить как качественные, так и количественные характеристики.

Газовую хроматографию используют прежде всего для анализа смесей. Исследуя чистые вещества, можно выявить степень их чистоты, определить количество и тип примесей, а также установить химические, физико-химические и физические свойства.

Преимущества метода в том, что колонка непрерывно регенерируется инертным газом-носителем. Кроме того, компоненты смеси разделяются полностью и смешиваются только с инертным газом-носителем, что облегчает их выделение и количественное определение. Время анализа невелико.

Недостатком метода является то, что компоненты, сильно удерживаемые в колонке, выходят из нее очень медленно, а иногда совсем не выходят. Это затруднение можно преодолеть при использовании программированного изме-

нения температуры колонки, что уменьшает время элюирования компонента. Программирование температуры — это повышение температуры колонки во время анализа для ускорения и обеспечения большей гибкости анализа.

Применение газа в качестве подвижной фазы дает то преимущество, что между неподвижной и подвижной фазами быстро устанавливается равновесие, благодаря чему возможно использование больших скоростей газа-носителя. Продолжительность анализа чаще всего измеряется минутами, например время анализа при разделении метилового эфира стеариновой, олеиновой и линолевой кислот около 23 мин. В отдельных случаях, при разделении препаративных количеств или сложных смесей с широким интервалом температур кипения компонентов время анализа может увеличиться до нескольких часов.

Газовая хроматография дает возможность разделять соединения с практически одинаковыми температурами кипения. Использованием селективных неподвижных фаз можно достичь такого разделения, которое невозможно при использовании перегонки и других методов.

В колонке происходит разделение по принципу различного удельного давления паров компонентов и их различной растворимости в разделяющей жидкости, т. е. соединения разделяются в соответствии не только с полярностью, но и с температурами кипения. Различные скорости миграции компонентов обусловлены также различными коэффициентами распределения между газовой и жидкой фазами. В силу этих причин время миграции через колонку различно.

Качественной характеристикой метода является время удерживания — время от момента ввода пробы до выхода максимума пика. При данной температуре эта величина является характеристикой системы вещество пробы — жидкая фаза. При контроле температуры термостата и скорости потока воспроизводимость времени удерживания достигает 1%. Величины времени удерживания можно использовать для идентификации каждого пика. Несколько соединений могут иметь одинаковое или близкое время удерживания, однако каждое соединение имеет только одно определенное значение данного параметра. Оно не зависит от присутствия других компонентов.

Метод дает возможность осуществлять и количественный анализ. Площадь каждого пика хроматограммы пропорциональна концентрации соответствующего компонента, и ее можно использовать для точного определения этой концентрации. Точность, достигаемая в газовой хромато-

графии, зависит от методики проведения опыта, конструкции детектора, метода концентрирования и от концентрации пробы. Относительная ошибка определения площадей основных пиков хроматограммы, измеренных вручную, может составлять 1—2%.

Вследствие высокой чувствительности метода простейшие конструкции детектора по теплопроводности дают возможность определить около 0,01% вещества.

Пламенно-ионизационный детектор определяет миллионные доли компонента, а селективный детектор по электронному захвату и фосфорный детектор — миллиардные доли и пикограммы (10^{-12}) веществ.

Газовая хроматография применяется для идентификации и определения любого вещества, имеющего достаточное давление пара (1—1000 мм рт. ст.) при температуре колонки 70—400°C. Многие твердые вещества были проанализированы по характерным продуктам их пиролиза, образующимся при более высоких температурах. Легко определяются также физические свойства, такие как поверхность адсорбента, изотермы адсорбции, теплота растворения, коэффициенты активности, коэффициенты распределения, молекулярные массы и давление паров.

Принцип работы газового хроматографа

Для анализа веществ используется газовый хроматограф (рис. 17), состоящий из баллона с газом-носителем 1, регулятора расхода 2, испарителя (место ввода пробы) 3, термостатов для испарителя, колонки и детектора 4, колонки (термостатированная) 5, детектора (с соответствующим электронным устройством) 6 и самописца 7.

Метод газожидкостной хроматографии был предложен А. Джеймсом и А. Мартином в 1952 году. Высокая чувствительность, скорость, точность и простота этого метода привели к стремительному прогрессу при разделении, идентификации и определении летучих соединений.

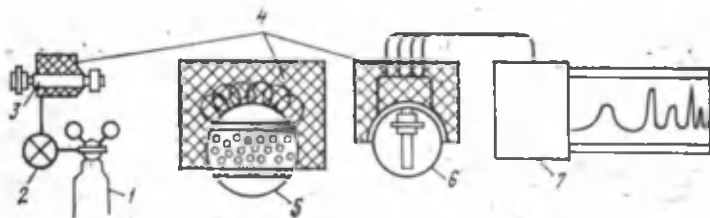


Рис. 17. Схема устройства газового хроматографа.

В газожидкостной хроматографии компоненты разделяемой смеси перемещаются по колонке с потоком инертного газа (газа-носителя). Разделяемая смесь распределяется между газом-носителем и нелетучим растворителем (неподвижной жидкой фазой), нанесенным на инертный твердый материал (твердый носитель) определенной зернистости. Компоненты смеси в соответствии со своими коэффициентами распределения селективно удерживаются неподвижной фазой до тех пор, пока не образуют отдельных зон в газе-носителе. Эти зоны выносятся из колонки с потоком газа-носителя и регистрируются детектором в виде сигналов, зависящих от времени.

Газ-носитель, как правило, поступает в колонку хроматографа из баллона со сжатым газом. При термическом виде анализа сопротивление колонки не изменяется во время анализа. Для поддержания постоянного давления на входе в колонку и, следовательно, для сохранения постоянной скорости газа используется регулятор давления. При данной температуре постоянная скорость газа-носителя обеспечивает постоянство времени удерживания анализируемых веществ. Поскольку скорость газа-носителя постоянна, для характеристики компонентов можно воспользоваться объемом газа-носителя, прошедшего за время от начала анализа до момента выхода пика (т. е. удерживаемым объемом).

Обычно в качестве газа-носителя используют водород, гелий и азот. Газ-носитель должен удовлетворять следующим требованиям: быть инертным, чтобы исключить возможность взаимодействия с пробой или жидкой фазой; обеспечить необходимые диффузионные характеристики анализируемых веществ; быть легко доступным и чистым; иметь сравнительно низкую стоимость; подходить для используемого детектора.

Проба вводится в колонку в виде «пробки». Газы обычно вводятся при помощи газовых герметических шариков или пробоотборных кранов, а жидкость — шприцами.

Набивная колонка для газожидкостной хроматографии — это стеклянная или металлическая трубка обычно с внутренним диаметром около 0,5 см и длиной 1—10 м, плотно наполненная тонко измельченным, легко продуваемым порошком, который готовят пропитыванием инертного твердого вещества малолетучей жидкостью — неподвижной фазой.

Одним из вариантов хроматографических колонок в газожидкостной хроматографии являются капиллярные колонки, в которых неподвижная жидкая фаза нанесена не-

посредственно на внутреннюю поверхность капилляра, т. е. стенка трубки служит инертным носителем. Общая длина капиллярных колонок может достигать нескольких тысяч метров при диаметре 0,01—0,1 см.

Области применения капиллярных и обычных набивных колонок почти не перекрываются. Набивные колонки изготовляют, применяя разнообразные неподвижные жидкости. На таких колонках можно выделять фракции чистых веществ в количествах, достаточных для идентификации их обычными химическими и физическими методами. Для капиллярных колонок используют меньшее количество неподвижных жидкостей, причем труднее приготовить колонки с одинаковыми свойствами, а выделенные количества веществ слишком малы для последующей идентификации обычными методами.

Колонки изготовляют из прямой, согнутой или свернутой в спираль трубки (нейлоновой, медной, алюминиевой, стеклянной или из нержавеющей стали). Чаще всего применяют колонки из нержавеющей стали; для обеспечения равномерной набивки трубки сначала наполняют, а затем скручивают в спираль для увеличения длины колонок. Чем больше длина колонки, тем больше теоретических тарелок и тем лучше разделение. Однако скорость газа-носителя изменяется при протекании его через длинную колонку, поэтому при оптимальных условиях работает только небольшая часть колонки. Кроме того, при работе с длинными колонками необходимо создавать очень высокие давления на входе, что вызывает затруднения при вводе пробы и обеспечении герметичности. Поэтому длина обычных аналитических колонок составляет 1—4 м.

Назначение твердого носителя — обеспечение большой, однородной и инертной поверхности для распределения жидкой фазы.

Носители должны быть инертными (для исключения адсорбции и химического взаимодействия), иметь большую механическую прочность, огромную поверхность, однородную форму и равномерный размер частичек.

Твердая фаза (носитель) обычно представляет собой гладкую или шероховатую поверхность из чистого металла. Ею может служить поверхность трубки, модифицированная каким-либо неорганическим соединением, на котором в виде пленки сконцентрирована жидкая фаза. В последнем случае говорят о разделяющем капилляре, а методику называют капиллярной.

В качестве твердого носителя можно использовать какой-либо неорганический пористый материал, например ди-

атомовую землю, которую необходимо тщательно дезактивировать. В газовой хроматографии часто применяют хромсорб различных марок, например хромсорб G. При анализе аминокислот применяют твердые органические соединения, например хромсорб T, на котором получают абсолютно симметричные пики для сильно полярных веществ.

Огромное значение имеет правильный выбор неподвижной фазы.

Идеальная жидкая фаза должна обладать следующими свойствами: коэффициенты распределения в ней анализируемых веществ различны; анализируемые вещества должны иметь определенную растворимость в ней; упругость пара в жидкой фазе при температуре анализа невелика.

Универсальность и селективность метода газожидкостной хроматографии связаны с возможностью широкого выбора жидких фаз.

Температура испарителя должна быть достаточно высокой для обеспечения большой скорости испарения и достаточно низкой, чтобы исключить термическую деструкцию или изменение строения анализируемых соединений. Температура колонки должна быть достаточно высокой, чтобы время анализа было небольшим, и достаточно низкой, чтобы обеспечить требуемое разделение.

Процесс разделения, избирательность и время удерживания зависят от температуры. Практически невозможно осуществить полный анализ смеси аминокислот при одной температуре, так как в смеси присутствуют как высоко-, так и низкомолекулярные соединения с различной степенью полярности. Метод с программированием температуры является разновидностью многоколоночного метода, в котором, например, три колонки используются при трех различных температурах, а детектор присоединен к каждой колонке. В таком ступенчатом температурном методе добавляются преимущества изотермического метода программирования температуры.

Величины удерживаемых объемов полярных соединений особенно чувствительны к температуре. Колебания неустановившейся температуры в разделяющей системе снижают четкость, а, следовательно, и эффективность разделения.

Детекторы регистрируют присутствие каждого компонента и дают возможность измерять его количество в потоке, выходящем из хроматографической колонки. Характеристиками детектора являются: хорошая чувствительность ко всем соединениям, низкий уровень шумов, широкий диапазон линейности показаний, нечувствительность к

изменениям скорости потока и температуре, простота конструкции.

Наиболее распространены детектор по теплопроводности и пламенно-ионизационный. В детекторе по теплопроводности используется в качестве чувствительного элемента вольфрамовая нить, нагреваемая от источника постоянного тока. Газ-носитель, непрерывно протекая над ней, отводит тепло с постоянной скоростью. Если в смеси с газом-носителем над нагретой нитью находятся молекулы анализируемого вещества, то скорость отвода тепла изменяется, что вызывает изменение сопротивления нити. Это изменение можно измерить с помощью моста Уитстона. Сигнал поступает на самописец, где и регистрируется в виде пика. Принцип работы основан на том, что теплопередача от нагретой нити зависит от молекулярной массы газа.

В детекторе по теплопроводности в качестве газа-носителя используются гелий или водород, в газовом детекторе — азот или гелий, в пламенно-ионизационном — высокоочищенный азот.

§ 8. ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Гель-проникающая, или молекулярно-ситовая, хроматография представляет собой особый вид хроматографии, в котором разделение основано на размерах молекул разделяемых веществ.

В 1952 г. Г. Дьюэль и Г. Ньюком впервые описали хроматографическое разделение на молекулярных ситах.

Широкое использование в практике метод получил после опубликования в 1959 г. работы Дж. Пората и Б. Флодина, посвященной обессоливанию и хроматографическому разделению соединений на гелях декстрана.

Гель-проникающая хроматография незаменима для разделения молекул, отличающихся молекулярными массами, по следующим причинам:

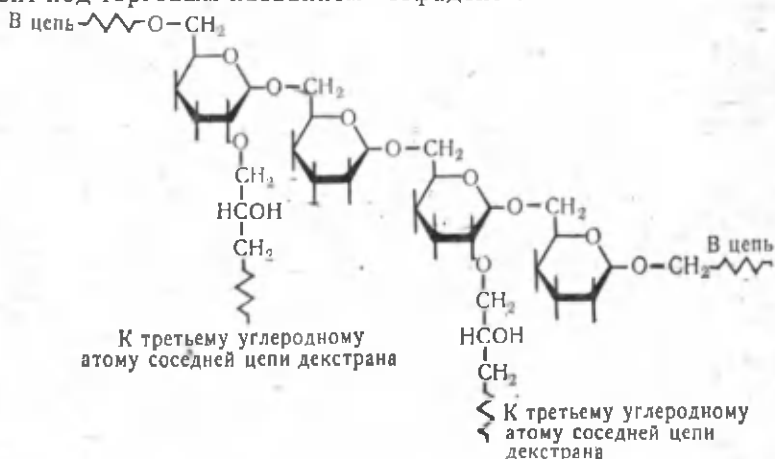
1. Хроматографическое поведение практически всех веществ в геле не зависит от температуры, рН, ионной силы и состава буферного раствора; разделение можно проводить почти в любых условиях. Для очень лабильных веществ, таких как ферменты, это означает возможность соблюдения условий максимальной их стабильности.

2. Лабильные вещества не изменяются в результате хроматографирования, так как практически отсутствует адсорбция. Это имеет важное значение, поскольку некоторые ферменты изменяют свои свойства при связывании с адсорбирующей поверхностью или ионообменной смолой.

3. Объем элюирования находится в прямой зависимости от молекулярной массы.

Гели, используемые в качестве молекулярных сит, — это сшитые полимеры, которые в общем инертны, не связываются и не реагируют с анализируемыми веществами и не имеют заряда. Они представляют собой трехмерную сетку, обычно со статически расположенными узлами. Пространство внутри геля заполнено жидкостью, которая занимает большую часть объема геля. Широкое распространение получили гели на основе декстрана, агарозы или полиакриламида.

Декстран — полисахарид, продуцируемый микроорганизмами *Leuconostoc mesenteroides*, выращенными на сахарозе. Молекула декстрана состоит из сравнительно коротких полиглюкозидных цепочек по 10—12 остатков α -D-глюкопиранозы. При обработке декстрина эпихлоргидрином получают сетчатую, прекрасно набухающую структуру, которая используется в качестве молекулярных сит под торговым названием «сефадекс».



Сефадекс представляет собой нерастворимую в воде неионизирующую сетку, обладающую, однако, высокой гидрофильностью благодаря наличию в структуре большого числа гидроксильных групп. Гидрофильность матрицы дает возможность пропускать через колонки с сефадексом высоколабильные белки. В последнее время сефадекс используют как матрицу для ионообменников. Выпускаются препараты ДЭАЭ-сефадекс, КМ-сефадекс и др.

Можно считать, что колонка с сефадексом содержит два вида объемов воды — внутренний и наружный. Внутрен-

ний объем V_B равен сумме содержания воды во всех гранулах геля в колонке (его можно рассчитать, если известна масса сухого препарата сефадекса и величина так называемого «набухания»). Часть внутреннего объема занята водой гидратации, которая сильно связана с матрицей и поэтому реактивна как растворитель. Под наружным объемом V_H понимают объем, занимаемый водой, окружающей гранулы. Объем, занимаемый матрицей, обозначается V_M . Объем колонки можно представить как сумму всех объемов:

$$V = V_B + V_H + V_M.$$

Коэффициент распределения растворенного вещества между водой в гранулах геля (т. е. V_B) и окружающей гранулы водой (т. е. V_H) обозначается как K_p . Вещества с $K_p=0$ совершенно не проникают в гранулы геля; вещества с K_p , имеющими значение между 0 и 1, лишь частично проникают в гранулы. Вещество с $K_p=1$ равномерно распределяется внутри и вне гранул; вещества с $K_p > 1$ частично адсорбируются матрицей. Наиболее важным фактором, который определяет коэффициент распределения, является размер растворенных молекул.

Очень большие молекулы, например белков или нуклеиновых кислот, имеют K_p порядка 0 при использовании мелкопористых сефадексов. Вещества с небольшими по размерам молекулами имеют K_p между 0,7 и 1 (рис. 18).

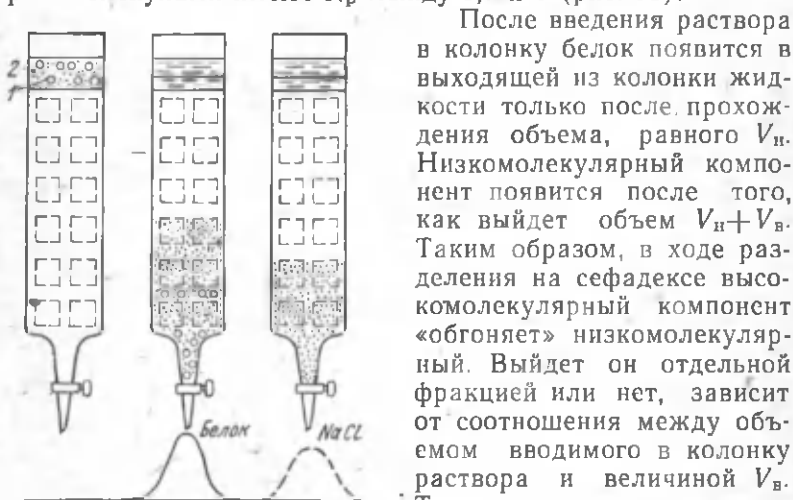


Рис. 18. Схема разделения белка и NaCl на колонке с сефадексом: 1 — молекулы белка; 2 — молекулы NaCl.

После введения раствора в колонку белок появится в выходящей из колонки жидкости только после прохождения объема, равного V_H . Низкомолекулярный компонент появится после того, как выйдет объем $V_H + V_B$. Таким образом, в ходе разделения на сефадексе высокомолекулярный компонент «обгоняет» низкомолекулярный. Выйдет он отдельной фракцией или нет, зависит от соотношения между объемом вводимого в колонку раствора и величиной V_B . Теоретически полное разделение возможно, если вводимый объем меньше V_B .

Если вещество характе-

ризуется величиной K_p , отличающейся от нуля, то величину объема, после которого оно выйдет из колонки, или (при малом объеме вводимой пробы) величину объема, в котором оно выйдет, рассчитывают по формуле:

$$V = V_n + K_p V_v.$$

Разделение смеси веществ при фильтровании через гель сефадекса тем эффективнее, чем больше различаются разделяемые вещества по величине K_p . Условием полного разделения смеси двух веществ в общем случае является введение их в колонку в объеме, не превышающем величины $K_p^2 + K_p^1 V_v$, где K_p^1 и K_p^2 — коэффициенты распределения разделяемых веществ. Практически, вследствие того что не всегда достигается равновесное распределение, а также из-за неоднородности наполнения колонки, для достижения полного разделения следует вводить в колонку объем раствора меньший, чем следует по теории.

Сефадекс имеет выраженное сродство к воде. При помещении в воду гранулы сефадекса значительно набухают. Степень набухания определяется числом поперечных связей. При набухании в воде гель с определенным числом поперечных связей впитывает определенное количество воды, что обозначается термином «вода набухания» и соответствует количеству воды в граммах, поглощенной 1 г сухого вещества.

Гель сефадекса совершенно нерастворим в воде и солевых растворах. Он стабилен в щелочных растворах и слабых кислотах. В сильно кислых растворах, особенно при повышенной температуре, может произойти гидролиз гликозидных связей матрицы. Кроме того, гель может потерять свои свойства при взаимодействии с сильными окислителями.

Возможности использования сефадексов велики. Фильтрование через гель сефадекса, как и диализ, используется для обессоливания белков и смены буферного раствора. Для смены буферного раствора колонку с сефадексом предварительно уравнивают новым буферным раствором, затем вводят в колонку раствор белка в прежнем буферном растворе и начинают пропускать через колонку новый буферный раствор. Из колонки белок выходит в новом буферном растворе после вытекания объема V_n . Вещества исходного буферного раствора выходят после объема $V_n + K_p V_v$. В опытах с белками необходимо быть уверенным в том, что емкость нового буферного раствора, находящегося в колонке, достаточна для титрования белка до значения рН этого буферного раствора. По сравнению с

методом диализа процесс обессоливания и смены растворов осуществляется гораздо быстрее. Для обессоливания 1 мл белкового раствора на колонке объемом 5 мл требуется около 10 мин.

На сефадексе можно осуществлять фракционирование полимеров в соответствии с их молекулярными массами, а также определять молекулярные массы белков, пептидов и других биополимеров.

С помощью сефадексов можно осуществлять концентрирование растворов высокомолекулярных веществ. Для этого в концентрируемом растворе суспендируют сухой сефадекс до образования густой суспензии. Набухая, гранулы впитывают воду в объеме, определяемом величиной набухания. Высокомолекулярные вещества остаются вне гранул. Низкомолекулярные вещества распределяются относительно равномерно внутри и вне гранул. Процедуру концентрирования можно повторить, добавляя новую порцию сефадекса. Эту простую и быструю процедуру выдерживают даже очень лабильные белки.

Сефадекс выпускается в виде крошечных гранул. Гранулярная форма обеспечивает продвижение и разделение хроматографических веществ. Внешние размеры гранул могут меняться, поэтому сефадекс бывает крупный, средний, тонкий и тончайший (супертонкий), с той же величиной пор. Типы сефадексов различаются по степени набухания. Гели, в которых матрица является меньшей составной частью, используются для фракционирования высокомолекулярных веществ, а более компактные гели (от G-10 до G-75) — для разделения низкомолекулярных соединений (табл. 2).

Кроме гелей на основе декстрана, применяются гели на основе агарозы. Агароза получается из некоторых морских водорослей и представляет собой линейный полисахарид, состоящий из чередующихся остатков *D*-галактозы и 3,6-ангидро-*L*-галактозы. Характерной особенностью агарозы является способность образовывать прочный гель, который стабилизирован водородными связями без поперечных связей. Агароза растворяется в кипящей воде и образует гель при охлаждении. Концентрация полисахарида в геле определяет размер пор, которые больше, чем в сефадексе. Гель агарозы полезен при анализе или разделении высокомолекулярных глобулярных белков или длинных линейных молекул, таких как ДНК. Агарозу почти не используют в виде сплошного геля, так как скорость тока жидкости через него крайне низка; поэтому ее, как правило, выпускают в виде влажных гранул.

Таблица 2. Физико-химические свойства сефадексов

Тип сефадекса	Диаметр частичек, мкм	Вода набухания, мл/г сухого сефадекса	Объем слоя, мл/г сухого сефадекса	Пределы фракционирования для пептидов и глобулярных белков
G-10	40—120	1,0±0,1	2—3	700
G-15	40—120	1,5±0,2	2,5—3,5	1500
G-25 крупный	100—300	2,5±0,2	4—6	1000—5000
G-25 средний	50—150	2,5±0,2	4—6	1000—5000
G-25 тонкий	20—80	2,5±0,2	4—6	1000—5000
G-50 крупный	100—300	5,0±0,3	9—11	1500—30000
G-50 средний	50—150	5,0±0,3	9—11	1500—30000
G-50 тонкий	20—80	5,0±0,3	9—11	1500—30000
G-50 тончайший	10—40	5,0±0,3	9—11	1500—30000
G-75	40—120	7,5±0,5	12—15	3000—70000
G-75 тончайший	10—40	7,5±0,5	12—15	3000—70000
G-100	40—120	10,0±1,0	15—20	4000—150000
G-100 тончайший	10—40	10,0±1,0	15—20	4000—150000
G-150	40—120	15,0±1,5	20—30	5000—400000
G-150 тончайший	10—40	15,0±1,5	20—30	5000—400000
G-200	40—120	20,0±2,0	30—40	5000—800000
G-200 тончайший	10—40	20,0±2,0	30—40	5000—800000

Полиакриламидные гели получают при сшивании молекул акриламида с N, N'-метилена-бис-акриламидом. Здесь размер пор также определяется степенью сшивания. Эти гели отличаются от гелей декстрана и агарозы числом полярных карбоксиамидных групп на некоторых атомах углерода, однако их разделительные свойства очень схожи с гелем декстрана. Полиакриламидные гели, известные как биогель Р, применяются для тех же целей, что и декстран, хотя и несколько реже. Преимущество их перед декстраном состоит в возможности получения более широкого спектра размеров пор.

В последнее время для водных растворов используются стеклянные шарики с пористой поверхностью (биоглас), однако данные по их применению пока еще слишком ограничены.

Описанные выше гели набухают в воде и некоторых органических растворителях: этиленгликоле, формалине и диметилсульфоксиде. Однако набухание не происходит в чистых спиртах, углеводородах и большинстве полярных и неполярных органических растворителей. Известно, что такие вещества, как липиды, стероиды и некоторые витамины, легче растворяются именно в таких растворителях. Для работы в этих условиях разработаны специальные ге-

ли. Для гель-проникающей хроматографии в неполярных органических растворителях хорошо подходит сшитый полистирол (стирагель, биобедс S). При использовании полярных органических растворителей хорошим материалом является метилированный сефадекс. Оксипропильное производное сшитого декстрана (сефадекс LH) можно применять для работы как в полярных, так и в неполярных растворителях.

В настоящее время иностранные фирмы выпускают следующие типы гелей: а) сшитый декстран под торговым названием «сефадекс» и агароза под торговым названием «сефароза» (фирма «Famacia Fine Chemical, Inc», г. Упсала, Швеция); б) сшитый полиакриламид под торговым названием «биогель Р» и агароза под торговым названием «биогель А» (фирма «Bio-Rad Laboratories», г. Ричмонд, штат Калифорния, США). Агароза выпускается также в Англии под торговым названием «сагавак» (фирма «Sevavac Laboratories Ltd», г. Мейденхед) и в Дании под торговым названием «гелароза» (фирма «Litex», г. Глоstrup). Все перечисленные материалы, исключая сагавак, выпускаются в виде сферических гранул.

Область применения сефадексов и биогелей Р ограничивается веществами с молекулярной массой около 500 000. Для фракционирования более высокомолекулярных соединений рекомендуется использовать гели на основе агарозы (сефарозу, биогель А, сагавак и геларозу).

В Венгерской Народной Республике выпускается на основе декстрана молселект, а на основе акриламида — акрилекс.

Определение молекулярной массы

Для различных типов гелей зависимость параметра K от $\lg M$ (M — молекулярная масса) представляет собой прямую линию для всех молекул, кроме очень больших и очень маленьких (рис. 19). Исключение составляют низкомолекулярные ароматические соединения, молекулы с большим зарядом при низкой ионной силе ($\ll 0,01$) и некоторые линейные молекулы, например коллаген и фибрино-

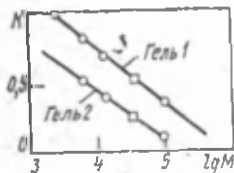


Рис. 19. Типичные результаты, полученные при определении приблизительной молекулярной массы M белков с помощью гель-проникающей хроматографии с использованием трех известных белков (светлые кружки) и двух различных типов геля (гель 1 и гель 2). Квадратик обозначена проба.

ген. Параметр K определяется как $(V_p - V_0)/V_n$, где V_p — объем растворителя, требуемый для элюирования интересующего соединения; V_0 — нулевой, или холстой, объем, необходимый для элюирования соединения, которое не проникает в неподвижную фазу; V_n — объем неподвижной фазы. В гель-проникающей хроматографии V_n — объем геля (большую часть которого составляют поры), а величине V_0 отвечает объем, необходимый для элюирования вещества, которое совершенно не проникает в поры. Для определения V_0 обычно через колонку пропускают вещество с исключительно высокой молекулярной массой, например голубой декстран. Величину V_n измеряют как разность между V_k и V_0 , где V_k — общий объем колонки.

Для глобулярных белков и многих углеводов эта методика дает очень надежные результаты при использовании различных типов сефадекса и биогеля Р. Очень важно, что величину M можно определить на нефракционированных экстрактах клеток при условии, что анализируемый белок известен; почти все другие методы требуют хорошо очищенных препаратов.

Таким образом, для определения M достаточно пропустить через колонку несколько молекул с известной молекулярной массой, по полученным данным построить прямую линию, после чего молекулярную массу пробы найти интерполяцией. Относительная погрешность такого определения составляет 10%.

Определение молекулярной массы биополимеров методом гель-проникающей хроматографии является более простым по сравнению с таким методом, как ультрацентрифугирование.

Тонкослойная гель-проникающая хроматография

Преимуществами тонкослойной хроматографии являются быстрое разделение, высокая чувствительность, простое оборудование, легкое элюирование и способность заменять хроматографию на бумаге в качестве аналитического метода. Тонкослойная гель-проникающая хроматография соединяет в себе преимущества обоих методов. Как и в тонкослойной хроматографии, в этом методе материал также наносится тонким слоем на стеклянную пластинку, проба вводится в виде точки, а подвижная фаза движется вдоль слоя. Однако есть и существенные различия:

1. В тонкослойной хроматографии сорбент высушивается перед нанесением пробы. Гель сушить нельзя, более того, он легко дегидратируется, поэтому в тонкослойной гель-

проникающей хроматографии проба наносится на влажный гель, уравновешенный требуемым растворителем.

2. Тонкослойная хроматография осуществляется восходящим методом, в тонкослойной гель-проникающей хроматографии применяется нисходящий метод. Пластинку помещают в герметичную камеру, причем оба ее конца соединяют с сосудами мостиками из фильтровальной бумаги.

Жидкость движется через слой сорбента, скорость ее определяется углом наклона пластинки (обычно 20°). Как и в тонкослойной хроматографии, движение жидкости прекращается до того, как нужное вещество перейдет в нижний сосуд. Однако здесь применяется проток жидкости, т. е. в отличие от тонкослойной хроматографии в этом случае отсутствует фронт растворителя. Поэтому в тонкослойной гель-проникающей хроматографии не измеряют значения R_f , а положения пятен определяют относительно выбранного стандарта.

Если тонкослойная хроматография используется в первую очередь для разделения низкомолекулярных соединений (аминокислот, сахаров, олигосахаридов, липидов, стероидов и других небольших молекул), тонкослойная гель-хроматография применяется для разделения высокомолекулярных соединений (белков, пептидов, нуклеиновых кислот, нуклеотидов и других гидрофильных веществ с высокой молекулярной массой).

Наибольшую ценность тонкослойная гель-проникающая хроматография представляет для определения молекулярной массы белков и пептидов. Для этого строят график, аналогичный рис. 19, где по оси y откладывают относительную подвижность. Метод дает возможность получить точные значения, особенно в тех случаях, когда проводится несколько определений.

Тонкослойная гель-проникающая хроматография применяется в клинической диагностике для определения патологических белков в сыворотке крови, спинномозговой жидкости и моче. Метод используется для проверки чистоты белков, ферментов и т. д. На его основе разработаны такие модификации, как иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и изоэлектрофокусирование.

§ 9. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Аффинная хроматография — эффективный метод выделения и очистки биополимеров, клеточных структур, а также отдельных клеточных популяций, нашедших за послед-

нее время широкое применение в различных биологических исследованиях. В отличие от обычных методов выделения и очистки биологически активных веществ, основанных на физико-химических различиях (размер молекул, молекулярная масса, заряд и т. д.), в аффинной хроматографии используется уникальное качество биополимеров — их биологическая функция, т. е. способность специфически и обратимо взаимодействовать с определенными веществами, такими как субстраты, ингибиторы, рецепторы, коферменты и др. Эти вещества, называемые лигандами, ковалентно связанные с твердым носителем, образуют биоспецифический адсорбент, который может избирательно удерживать из разделяемой смеси биополимер, имеющий к нему сродство. Изменение условий последующей элюции приводит к выделению адсорбированного на колонке биополимера в чистом виде.

Таким образом, аффинная хроматография использует специфическое сродство между выделяемым веществом и специфически связывающейся с ним молекулой.

Свое начало как метод очистки биополимеров аффинная хроматография берет с 1968 года, когда Р. Кватреказасом и др. была описана биоспецифическая очистка нуклеазы стафилококков, химотрипсина, карбоксипептидазы А на колонке с соответствующими ингибиторами, ковалентно связанными с агарозой. От англ. *affinity chromatography* (хроматография по сродству) и происходит название метода.

В этом виде хроматографии употребляются следующие термины:

иммобилизация — переводение веществ в нерастворимое состояние связыванием с твердым носителем, чаще всего это ковалентное связывание;

групповой лиганд — лиганд, имеющий сродство не к одному биополимеру, а к целой группе растворенных биополимеров, например к ферментам дегидрогеназам, киназам и т. д.;

вставка — соединение, отделяющее лиганд от поверхности носителя с целью уменьшения влияния стерических факторов на взаимодействие лиганда с выделяемым биополимером;

биоспецифический адсорбент — адсорбент, способный избирательно взаимодействовать с выделяемым биополимером; состоит, как правило, из твердого носителя, вставки и лиганда.

Функция носителя в аффинной хроматографии заключается в создании твердой матрицы, к которой присоеди-

ется тот или иной лиганд (через вставку или без нее). Носители должны удовлетворять следующим требованиям: 1) быть инертными, что исключает неспецифические взаимодействия с выделяемым биополимером; 2) иметь механическую и химическую прочность, что предполагает устойчивость носителя как в условиях элюции биополимера, так и в более жестких условиях регенерации биоспецифического адсорбента; 3) быть достаточно пористыми, что увеличивает в конечном итоге емкость адсорбента; 4) обладать легкостью химической активации (модификации) для последующего присоединения лигандов или вставки; 5) быть доступными в виде единообразных специфических частиц («шариков»), обеспечивающих необходимую скорость тока элюента через колонку.

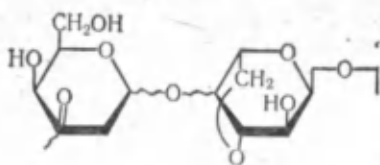
В некоторых случаях носители выполняют функцию лигандов, так как биополимер имеет биоспецифическое сродство к самому носителю — их называют биоспецифическими носителями. К ним относятся нерастворимый крахмал (для очистки амилаз, крахмалсинтетазы, гликогенфосфоорилазы), целлюлоза (для очистки целлюлазы), хитин (для очистки лизоцима, агглютинина из зерен пшеницы). Целлюлоза, покрытая хитином, применяется для биоспецифической очистки ферментов, подобных лизоциму. Поперечно-связанный маннан применяется для выделения антител, так как маннан — основной антиген на поверхности дрожжевых клеток.

Сефадекс используется для очистки фитоагглютини-на — конкавалина А (коп А) и глюкоамилазы кролика, агароза — для очистки фитоагглютининов, связывающих галактозу, и для выделения α -глицерофосфатдегидрогеназы.

В качестве первых носителей были использованы производные целлюлозы и полистирола. Эти носители имеют ряд недостатков и не соответствуют перечисленным выше требованиям. Недостаточные пористость и однородность целлюлозы затрудняют достижение удовлетворительной скорости жидкости через колонку. Значительное количество карбоксигрупп приводит к неспецифическому взаимодействию целлюлозы с белками. Применение макропористой целлюлозы и предварительное набухание ее в диметилсульфоксиде может улучшить свойства этого носителя. Порошок целлюлозы является удобным носителем для хроматографической системы ДНК — комплементарная РНК.

Полистирольные носители недостаточно пористы, что ограничивает их применение.

В настоящее время наиболее широко употребляются в качестве носителей агароза



полиакриламид и пористое стекло.

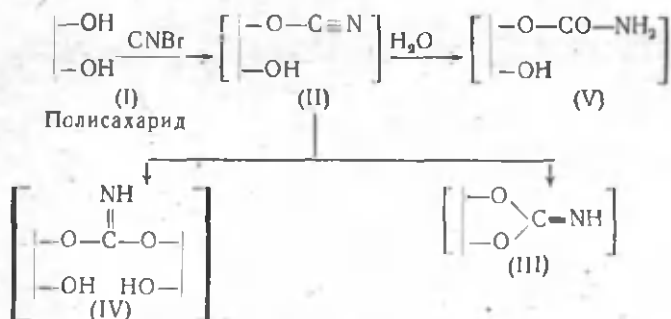
Шарики агарозы менее устойчивы, чем сефадекса, из-за отсутствия ковалентного поперечного связывания. Пористость геля зависит от процентного содержания агарозы в шариках. Наибольшее распространение получила сефароза 4В (содержит 4% агарозы).

Преимущество полиакриламидных носителей в том, что они содержат большее число карбоксимидных групп, удобных для модификации и последующего присоединения лиганда, чем агароза. Недостатком полиакриламида является малая пористость, особенно уменьшающаяся после присоединения лиганда. Аминоэтил-биогель Р-300 был использован при получении растительных лектинов. Полимер полиакриламидного типа с боковыми цепями, содержащими ароматическую NH_2 -группу, экзакрил АА применяется для очистки стероидсвязывающих веществ. Он устойчив по отношению к органическим растворителям и не требует предварительной активации для присоединения лиганда.

Шарики из пористого стекла удобны для препаративных целей вследствие их механической прочности и химической устойчивости. Их недостатками являются малая пористость и способность неспецифически сорбировать многие белки.

Гидрофильные оксиалкилметакрилатные гели (торговое название «сферон», СССР), сохраняя преимущества агарозных носителей, отличаются высокой химической и механической прочностью.

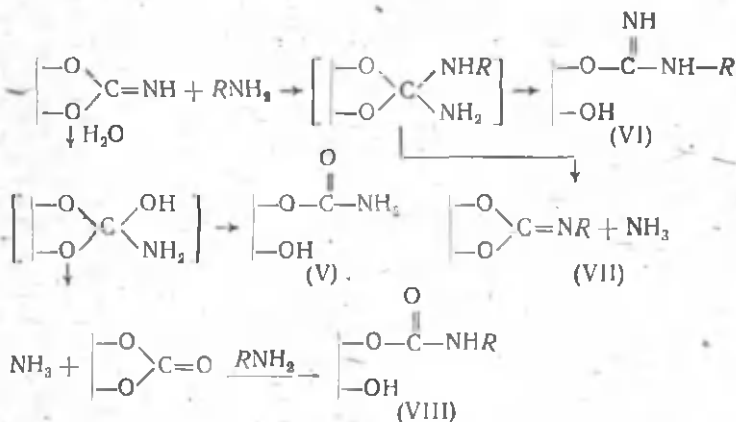
Самым распространенным процессом для присоединения лигандов к носителям полисахаридной природы (агарозе, сефадексу, целлюлозе) является активация бромистым цианом, органическими цианатами или изоцианатами. Считают, что образующийся при активации бромистым цианом лабильный цианат (II) превращается при взаимодействии со свободной гидроксильной группой носителя в циклический имидокарбонат (III), ациклический имидокарбонат (IV), а также неактивный карбонат (V):



Аналогично протекает активация органическими цианатами. Активными промежуточными соединениями являются имидокарбонаты (IV) и соответствующие имидоэфир.

В экспериментальном отношении процесс активации довольно сложен: необходимы меры предосторожности при работе с бромистым цианом, контроль pH (обычно в пределах 10—11), быстрая обработка активированного геля из-за образования неустойчивых промежуточных продуктов. Делаются попытки упростить методику активации. Так, предложен метод активации агарозных гелей бромистым цианом в концентрированном фосфатном буферном растворе; использование раствора бромистого циана в ацетонитриле с концентрированным буферным раствором.

Присоединение лигандов, содержащих первичную NH₂-группу, к носителю, активированному бромистым цианом (CNBr—AA), осуществлено при pH=7—10 (NH₂-группа не протонирована). При этом протекают следующие реакции:



Основным продуктом реакции присоединения являются производные изомочевины (IV), в меньшем количестве об-

разуются N-замещенные имидокарбонаты (VII) и карбаматы (VIII).

Одним из методов активации носителей является периодатное окисление целлюлозы, сефадекса, акриламида, а также триазиновый метод, заключающийся в активации целлюлозной матрицы S-триазинтрихлоридом.

Дж. Порат и сотр. предложили новый активированный поперечносвязанный агарозный гель — дивинилсульфонилсефарозу 6В.

При подборе лиганда следует помнить, что он должен обладать способностью взаимодействовать с выделяемым биополимером биоспецифически и обратимо. Этому требованию удовлетворяют ингибиторы, эфффекторы и кофакторы (для ферментов), субстраты и их аналоги (для белков и рецепторов), антитела (для антигенов), комплементарные олигонуклеотиды (для нуклеиновых кислот), ферменты (для ингибиторов ферментов) и другие соединения.

Сила взаимодействия лиганда и выделяемого биополимера выражается константой диссоциации K_d . Для реакции



$$K_d = \frac{[\text{Лиганд}][\text{Биополимер}]}{[\text{Комплекс}]}$$

Низкие значения K_d ($\leq 10^{-4}$ моль · л⁻¹) обеспечивают эффективную адсорбцию биополимера на матрице. Иногда в качестве лигандов применяют некоторые красители. Так, способность альбумина плазмы крови связываться с голубым декстраном использована для выделения альбумина из плазмы.

Особый случай представляют так называемые «необратимые лиганды», которые образуют ковалентные связи с выделяемым биополимером.

Большой интерес представляют лиганды, общие для групп биополимеров, т. е. один биоспецифический адсорбент может быть пригоден для очистки различных биополимеров. Например, в колонке с ФМН-целлюлозой можно очистить многие ФМН-зависимые ферменты; на целлюлозе с ковалентно связанными НАД и НАДФ можно выделить и очистить НАД- и НАДФ-зависимые ферменты.

Для уменьшения стерических препятствий, влияющих на биоспецифическое связывание, часть лиганда, ответственная за взаимодействие с выделяемым биополимером, должна находиться на некотором расстоянии от поверхности твердого носителя. Для этой цели используют вставки,

чаще всего углеводородные цепочки, отделяющие лиганд от поверхности носителя. Вставка может вначале присоединяться к лиганду или к нерастворимой матрице. Вставка, как правило, повышает эффективность выделения и очистки биополимеров. Чаще всего используются вставки с цепочкой из шести углеродных атомов ($\sim 0,7$ нм). Увеличение длины подобной вставки, как правило, не улучшает взаимодействия биополимер — лиганд, а в отдельных случаях даже ослабляет его.

Важным фактором аффинной хроматографии является концентрация лиганда на биоспецифическом адсорбенте и его локализация на шариках соответствующего носителя. Однако не всегда увеличение количества лиганда на единицу объема адсорбента приводит к увеличению его емкости. Иногда увеличение удельного содержания лиганда выше предела даже уменьшает связывающую емкость адсорбента. Это может быть обусловлено стерическими факторами и локализацией лиганда на носителе. Считается, что небольшие молекулы, проникающие в поры геля, присоединяются как внутри, так и на поверхности частичек геля, а большие молекулы, неспособные диффундировать внутри геля, локализованы на поверхности. Однако лактопероксидаза (молекулярная масса 78000), например, легко проникающая внутрь агарозного геля, распределяется исключительно по поверхности CNBr—AA, создавая оболочку, которая препятствует проникновению других молекул фермента внутрь геля.

Адсорбция на биоспецифический сорбент, как правило, проводится в условиях, обеспечивающих наилучшее взаимодействие с лигандом. Эти условия не всегда совпадают с таковыми для взаимодействия в растворе. Так, оптимальное значение pH для взаимодействия РНКазы из печени крысы с ингибиторным белком в растворе равно 7, а адсорбция ингибитора в колонке с иммобилизованным на карбоксиметилцеллюлозе ферментом происходит при $\text{pH} = 6$.

Элюция адсорбированного в колонке биополимера может быть биоспецифической и неспецифической. Последний тип элюции включает изменение ионной силы или (и) pH элюирующего буферного раствора. При выделении мРНК в колонках с поли U — AA десорбция РНК осуществляется как увеличением содержания формамида в буферном растворе, так и ступенчатым повышением температуры колонки, что ослабляет биоселективную гибридизацию комплементарных цепей полинуклеотидов. Иногда для достижения элюции биополимера необходимо применять жесткие кис-

лотные или щелочные условия или использовать буферные растворы, содержащие денатурирующие вещества, такие как мочевина и хлоридрат гуанидина.

В этих случаях, чтобы избежать денатурации белка, соответствующие фракции должны быть немедленно разбавлены или диализованы. Более мягкой является элюция биоспецифического типа, когда элюирующий раствор содержит вещества, имеющие сродство к адсорбированному биополимеру, например субстрат, ингибитор или кофактор фермента. Описано использование для элюции специфических ионов, действующих на очищенный фермент как «деформирующие агенты», т. е. изменяющие конформацию белка. Биоспецифическая элюция может быть полезной для количественной оценки взаимодействия биополимера с тем или иным веществом.

Основной областью применения аффинной хроматографии является очистка белков, мембран и полисахаридов.

Очистка ферментов. Субстрат, представляющий собой прочно связывающий ингибитор или кофактор, можно связать с матрицей. Если смесь белков или даже неочищенный экстракт клеток пропустить через такую колонку, то в колонке останется только то вещество, которое способно связываться. В некоторых случаях ферменты можно получить в достаточно чистом виде прямо из сложных смесей. Однако зачастую с одним и тем же субстратом или кофактором могут связываться несколько ферментов, поэтому обычно таким методом можно достичь только неполной очистки.

Очистка антител. Осуществляется с помощью сефарозы, активированной бромистым цианом, к которой присоединяются различные антигены, такие как белки, вирусы или альбумин бычьей сыворотки, связанные с гаптенами; метод является наилучшим для получения чистых антител.

Очистка транспортных белков. Проводится обычно на сефарозе, связанной с веществом, которое должно транспортироваться (например, тироксинсвязывающие глобулины, эстрадиолсвязывающие белки, гормональные и лекарственные рецепторы).

Примеры использования хроматографических методов в биохимической практике

Тонкослойная хроматография аминокислот. Для тонкослойной хроматографии аминокислот используют стеклянные пластинки (20×20 см). Прежде всего их промывают хромовой смесью, водой, а перед использованием протирают спиртом.

Количество сорбента для получения сорбционной массы берут из расчета 12,5—2,5 мг на 1 см² пластинки. Силикагель смешивают с 2—3 объемами воды, а целлюлозу и ее производные — с 8—10 объемами. Сорбционную массу хорошо перемешивают, встряхивая в колбе в течение 0,5—1 мин, образованную однородную массу выливают на стеклянную пластинку и распределяют равномерным слоем с помощью аппликатора.

Пластинки высушивают на горизонтальной поверхности: с силикагелем в потоке воздуха — в течение 20 мин, а с ДЭАЭ-целлюлозой при температуре 40—50°C — 40—60 мин или при комнатной температуре — 10—12 ч. Затем пластинки активируют в сушильном шкафу при температуре 105—110°C в течение 15—30 мин.

Стартовую линию наносят простым карандашом на расстоянии 1,5—2 см от края пластинки (расстояние между точками нанесения проб — 2,0—2,5 см). На тонкослойную хроматограмму наносят по 5—10 мкл 0,1%-го раствора аминокислоты (каждую аминокислоту — на отдельную точку как свидетель) и по 10—15 мкл пробы. Наносить пробы и свидетели лучше всего линейей.

В качестве камеры для хроматографирования лучше всего использовать стеклянную банку (25×25×15 см) с шлифованной или плотно притертой крышкой. Растворитель заливают в камеру за 2 ч до начала хроматографирования.

Хорошие результаты дает использование растворителя: *n*-бутанол — 34%-й раствор аммиака (7:3). Для разделения аминокислот можно использовать готовые пластинки типа силуфол.

Пластинку с пробами помещают под углом 50° в растворитель камеры и оставляют на 1—1,5 ч, пока он поднимется на расстояние 10—15 см от края. Затем пластинки вынимают из камеры, высушивают на воздухе и опрыскивают из стеклянного пульверизатора 0,3%-м раствором нингидрина (0,3 г нингидрина растворяют в 100 мл *n*-бутанола, который содержит 3 мл ледяной уксусной кислоты). Хроматограмму проявляют 30 мин при температуре 60°C или 10 мин при температуре 105—110°C.

Методом тонкослойной хроматографии можно определить свободные аминокислоты, которые входят в состав сыворотки крови, тканей, мочи, а также аминокислотный состав белков.

Чтобы определить аминокислоты белков, необходимо прежде всего их гидролизовать. Гидролиз можно проводить кислотный или щелочной.

При кислотном гидролизе 50—60 мг белка гидролизуют в запаянной ампуле в 10—12 мл 6 н. раствора HCl в течение 24—30 ч при температуре 105°C. Соляную кислоту добавляют в 200—500-кратном объеме относительно белка. После гидролиза соляную кислоту удаляют многократной отгонкой с водяным паром в вакууме. Гидролизат при этом каждый раз выпаривают. Соляную кислоту можно также удалять, выдерживая гидролизат в вакуум-эксикаторе над NaOH. После удаления соляной кислоты гидролизат нагревают на водяной бане 5 мин с небольшим количеством активированного угля (100 мг). Затем горячий гидролизат фильтруют через плотный фильтр, и осадок промывают водой. Гидролизат разбавляют до объема 1 мл и 10—30 мкл его наносят на хроматограмму. Нейтрализация гидролизата необходима только при использовании как растворителя 80%-го раствора фенола. Нейтрализацию можно проводить, выдерживая каплю гидролизата над паром аммиака. Кислотный гидролиз белков разрушает триптофан.

При щелочном гидролизе 5—10 мг белка нагревают в течение 24 ч в запаянной трубке с 1 мл воды и 65 мг $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ при 125—130°C. К охлажденной реакционной смеси добавляют 2 н. раствор H_2SO_4 до $\text{pH}=6$, нагревают до кипения и центрифугированием удаляют осадок BaSO_4 , который затем промывают небольшим количеством воды. Раствор и промывные воды объединяют и выпаривают досуха. Осадок растворяют в 0,5—1 мл воды или 0,1 н. растворе HCl. Цистин и β -оксиаминокислоты при таком гидролизе частично разрушаются, триптофан остается без изменений.

В процессе хроматографирования цистин, цистеин и метионин разрушаются. Поэтому их вначале окисляют пергидролем до стойких сульфокислот. Для этого на место нанесенного исследуемого раствора наносят 30%-й раствор пергидроля (такой же объем, как и исследуемой пробы). Цистин и цистеин окисляются до стойкой цистеиновой кислоты, а метионин — до метионинсульфона.

Фракционирование белков с помощью сефадексов. Для расчета количества сефадекса, необходимого для заполнения определенного объема колонки, необходимо знать объем, который будет занимать 1 г сухого сефадекса после набухания. Например, для G-200 эта величина равна 30. Если объем колонки разделить на 30, то полученное значение будет соответствовать количеству граммов сухого сефадекса, необходимого для заполнения определенного объема колонки.

Для заполнения колонки, размер которой $1,8 \times 20$ см, а $V = 50,8$ мл, необходимо 1,5—2 г сухого сефадекса G-200.

Рассмотрим фракционирование белков сыворотки крови на сефадексе G-200. В колонке с сефадексом G-200 белки сыворотки крови можно разделить по молекулярной массе на три основные фракции. Первая фракция имеет в основном белки с константой седиментации 19S и электрофоретической подвижностью α - и β -глобулинов (α_2 - и β_2 -макроглобулинов, α - и β -липопротеидов). В другой фракции содержатся в основном белки с константой седиментации 7S и подвижностью γ -глобулинов. Третья фракция состоит из белков с константой седиментации около 4S и подвижностью альбуминов (альбуминов, преальбуминов, α_1 -гликопротеидов).

Для анализа 4—5 г порошка G-200 суспендируют в 0,05 M ТРИС — HCl буферном растворе, который содержит 0,14 M раствор NaCl ($pH = 8,0$), и оставляют для набухания в течение 12 ч. Буферный раствор готовят так: в мерной колбе вместимостью 1 л растворяют 8,184 г сухого химически чистого NaCl. Затем в колбу помещают 6,057 ТРИС (трис-гидроксиметиламинометан, молекулярная масса 101,14) и доводят объем водой почти до метки. Титруют содержимое колбы каплями концентрированной химически чистой HCl до $pH = 8,0$ (примерно 60 капель) и доводят объем колбы водой до метки. Для удаления мелких частичек сефадекса надосадочную жидкость декантируют. Осадок геля повторно суспендируют в буферном растворе и снова декантируют. Эту операцию повторяют 3—4 раза. Стеклянную колонку закрепляют вертикально на штативе. В основу колонки впаивают стеклофильтр № 1 или помещают стекловату, на которые перед заполнением колонки кладут диск из фильтровальной бумаги. В верхнее отверстие колонки вставляют воронку.

Через воронку в колонку наливают буферный раствор до $\frac{1}{3}$ вместимости колонки, затем добавляют суспензию сефадекса. После осаждения сефадекса буферный раствор над ним отсасывают и периодически в воронку добавляют суспензию сефадекса. Так обеспечивают непрерывное осаждение частичек сефадекса в колонке. Колонку заполняют при закрытом нижнем кране. При образовании четкой границы раздела между гелем и буферным раствором гель в колонке уплотняют, пропуская буферный раствор через колонку в течение 24—48 ч при открытом нижнем кране. На горизонтальную поверхность геля помещают диск фильтровальной бумаги. Перед анализом сыворотку крови центрифугируют, а затем 0,2—0,5 мл ее разбавляют 3—

4 раза и осторожно наносят на фильтр, который покрывает гель. После проникновения сыворотки в гель стенки колонки споласкивают 2—3 мл буферного раствора и начинают элюцию белка из колонки. Скорость прохождения буферного раствора должна составлять 12—15 мл/ч.

Элюат (по 2,5—5 мл) собирают в пробирки с помощью коллектора фракций. В каждой пробирке определяют содержание белка по методу Лоури или спектрофотометрически при 280 нм. Результаты разделения белков сыворотки крови изображают графически. Закончив элюцию, колонку промывают 100—150 мл буферного раствора, после чего ее можно использовать повторно.

Следует заметить, что при сохранении сыворотки в течение 4—5 дней при температуре 2—4°C содержание низкомолекулярных белков увеличивается. Количество белков третьей низкомолекулярной фракции составляет 36—40%, а при хранении увеличивается до 50%. Общий выход белка — 97—98%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Айвазов Б. В.* Практическое руководство по хроматографии. — М.: Высшая школа, 1968.—279 с.
- Алексеев Л. П.* Аминокислотный анализ белков, тканевых экстрактов и биологических жидкостей. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1964, т. 1, с. 129—161.
- Ахрем А. А., Кузнецова А. И.* Тонкослойная хроматография. — М.: Наука, 1964.—175 с.
- Безверженко И. А.* Аффинная хроматография. — Киев: Наукова думка, 1978.—127 с.
- Богатырев В. Л.* Иониты в смешанном слое. — М.: Химия, 1968.—210 с.
- Васильев А. Н.* Теоретические основы хроматографических методов в биохимическом анализе. — Киев: Вища школа, 1979.—43 с.
- Детерман Г.* Гель-хроматография. — М.: Мир, 1970.—252 с.
- Дзвени Т., Гергей Я.* Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Мир, 1976.—364 с.
- Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. Дейла, Мацека, Янки:* В 3-х т. — М.: Мир, 1978.—428 с.
- Клящицкий Б. А., Шапот В. С.* Биоспецифическая адсорбционная хроматография. — Успехи биологической химии, 1976, вып. XVII, с. 234—264.
- Лабораторная техника органической химии / Под ред. Б. Кейля.* — М.: Мир, 1966.—751 с.
- Мак-Нейр Г., Бонелли Э.* Введение в газовую хроматографию. — М.: Мир, 1970.—280 с.
- Методы практической биохимии / Э. Гриффитс, Б. Уильямс, К. Уилсон и др.* — М.: Мир, 1978.—268 с.
- Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / Под ред. Ю. А. Овчинникова.* — М.: Мир, 1974.—462 с.
- Ольшанова К. М., Копылов В. Д., Морозова Н. М.* Осадочная хроматография. — М.: Изд-во АН СССР, 1963.—104 с.

Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге. — В кн.: Современные методы в биохимии. М., 1964, т. 1, с. 162—181.

Перри С., Амос Р., Брюер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. — М.: Мир, 1974.—260 с.

Сопін Є. Ф., Виноградова Р. П. Основи біохімічних методів дослідження. — К.: Вища школа, 1975.—244 с.

Успехи хроматографии / Отв. ред. К. В. Чмутов, К. И. Сакодынский. — М.: Наука, 1972.—295 с.

Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров / Под ред. Г. В. Самсонова. — М.; Л.: Химия, 1966.—342 с.
Хадден Н. и др. Основы жидкостной хроматографии.—М.: Мир, 1973.—264 с.

Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э. Шталя. — М.: Мир, 1965.—508 с.

Хроматография на бумаге / Под ред. И. М. Хайса и К. Мацека. — М.: Изд-во иностр. лит., 1962.—851 с.

Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое. — М.: Мир, 1971.—192 с.

Глава II. МЕТОДЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

§ 10. ТЕОРИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ

Электрофорезом называется движение заряженных частиц в жидкости под действием электрического поля. Термин введен Л. Михаэлисом. Метод основан на способности частичек или молекул, которые имеют электрический заряд, двигаться в электрическом поле с различной скоростью. Скорость движения пропорциональна числу зарядов молекулы, но зависит от формы и величины молекулы, поскольку эти факторы также оказывают влияние на движение молекулы.

Скорость перемещения макромолекул в электрическом поле может быть использована для определения молекулярной массы белков, для разделения макромолекул на основе их общего заряда или формы, для определения изменений в аминокислотном составе при замене заряженной аминокислоты на незаряженную и наоборот, а также для количественного разделения различных видов молекул.

Впервые явление электрофореза было обнаружено в начале XIX века. Так, в 1808—1809 г. профессор Московского университета О. Ю. Рейс описал явление движения коллоидных частичек в определенном направлении под действием электрического поля, вызванное наличием у них электрического заряда.

В конце XIX и в начале XX века электрофорез изучали, главным образом, наблюдая за движением достаточно крупных частичек под микроскопом. В 1937 г. А. Тизелиус

сконструировал прибор для разделения белков в растворе с оптической регистрацией. Этот прибор давал возможность определить процентное соотношение фракций и их подвижность. Наиболее удобным оказался так называемый «зональный» электрофорез, различные модификации которого появились в последние годы.

В настоящее время электрофорезом называют перемещение в электрическом поле относительно больших частичек суспензии или коллоидов (ранее называемый катафорезом). Перемещение низкомолекулярных электролитов называют ионофорезом, а отделение низкомолекулярных ионов от высокомолекулярных — электродиализом. Движение жидкости через полупроницаемую перегородку под влиянием приложенного извне электрического напряжения называется электроосмосом.

Противоположно заряженные частицы одной величины или одинаково заряженные частицы различной массы движутся в электрическом поле с различной скоростью.

В зависимости от задачи эксперимента выделяют препаративный и аналитический электрофорез. Препаративный электрофорез используется для получения относительно больших количеств чистого материала. Аналитический электрофорез применяется для контроля чистоты, определения количества компонентов в смеси, их соотношения и др.

Если разделяют вещества в количестве 0,1 г, то говорят о макроэлектрофорезе. Разделение веществ меньше 1 мг проводят микроэлектрофорезом. При разделении веществ в количестве 10 мг говорят о полумикроэлектрофорезе. Низковольтный электрофорез имеет место при использовании напряжения до 1000 В, высоковольтный — при использовании напряжения свыше 1000 В.

Методом электрофореза можно разделить белки, полисахариды, ферменты, токсины, фосфорные эфиры, бактериальные антигены, вирусы, витамины, антибиотики и другие вещества.

Электрические заряды молекул белка в растворе возникают как в результате диссоциации ионогенных групп ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$), так и вследствие адсорбции ими ионов из раствора. Это явление известно под названием двойного электрического слоя. Коллоидная частичка белка вместе с ее диффузионным двойным слоем образует единую кинетическую систему. Движение коллоидной частички будет зависеть лишь от общего заряда всей системы, а не от заряда на поверхности самой частички.

Наличие двойного электрического слоя обуславливает появление электрокинетического потенциала (ζ -потенциала). Величина и знак электрокинетического потенциала определяют скорость и направление движения белковой частички в электрическом поле. Поскольку свободный заряд белковой молекулы определяется ионизацией в первую очередь amino- и карбоксильных групп, электрокинетический потенциал молекулы будет зависеть от рН среды.

Каждый индивидуальный белок характеризуется величиной электрокинетического потенциала при определенных условиях рН, определенной ионной силе и температуре раствора и, кроме того, кривой зависимости этого потенциала от концентрации водородных ионов. Это создает возможность разделения растворенной смеси белков на отдельные компоненты. В том случае, если белки при различном химическом составе имеют одинаковый электрокинетический потенциал, они электрофоретически неразделимы. Смесь таких белков будет электрофоретически гомогенной.

Подробная теория электрофореза сложна и полностью еще не разработана. Для понимания принципов использования метода в различных целях достаточно его простого описания. Во многом электрофорез напоминает седиментацию, так как к объему прикладывается сила, которой оказывает сопротивление вязкость среды.

Скорость движения белковых частичек описывает уравнение Александера — Джонса. Если частичка имеет электрический заряд g , а напряженность электрического поля E , то сила, вызывающая движение частичек, равна gE , т. е. частичка будет двигаться с конечной скоростью, величина которой определяется из условий равновесия между электрической силой и сопротивлением среды. Если частичка сферической формы, то по закону Стокса

$$gE = 6\pi\eta r v,$$

где η — вязкость среды; r — радиус частичек; v — скорость движения. Отсюда скорость движения

$$v = \frac{gE}{6\pi\eta r}.$$

В определенной среде с вязкостью η , при одной и той же напряженности электрического поля E , скорость движения ионов будет зависеть от размера частичек и от их электрических зарядов.

Для определения коллоидов, особенно белков, в последнее время широко используются:

- 1) метод свободно движущейся границы, который называют просто методом движущейся границы, или фронтальным электрофорезом;
- 2) метод зонального электрофореза, электрофорез на носителе;
- 3) микроскопический (ультрамикроскопический) метод;
- 4) иммуноэлектрофорез;
- 5) изоэлектрофокусирование;
- 6) изотахофорез.

§ 11. ФРОНТАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗ

Фронтальный электрофорез — один из первых методов, предложенный еще в 1937 году А. Тизелиусом, его называют еще классическим методом электрофореза. В электрофорезе с подвижной границей макромолекулы присутствуют во всем объеме раствора и положение молекул (практически граница, отделяющая растворы от растворителя) как функцию времени определяют оптическим способом. Фронтальным электрофорезом измеряют скорость движения границы раздела между белковым раствором и его растворителем.

Суть этого метода состоит в следующем. В U-образную трубку под буферный растворитель наслаивают раствор белка так, чтобы между обоими растворами образовалась граница раздела. В оба колена трубки помещают электроды, соединенные с источниками постоянного электрического поля. При прохождении тока частички начинают перемещаться единым фронтом, отсюда название — фронтальный электрофорез.

Принципы, положенные в основу конструкции прибора Тизелиуса, не изменились до наших дней. Позднейшие усовершенствования коснулись лишь деталей. Основная часть прибора — U-образная измерительная ячейка состоит из нижней 1, двух средних 2, 3 и двух верхних 4 секций (рис. 20), имеющих одинаковое прямоугольное сечение. Секции могут сдвигаться в горизонтальном направлении относительно друг друга. Для этого плоские поверхности их контакта шлифованы и смазаны. Исследуемым раствором заполняют вначале нижнюю секцию 1. Затем с помощью специального приспособления, обеспечивающего плавность движения, эту секцию сдвигают в сторону, разобщая ее с верхними секциями 2, 3, 4.

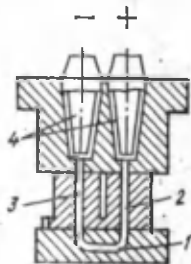


Рис. 20. Схема кюветы к прибору Тизелиуса.

Средние секции 2,3 промывают; одну сторону заполняют раствором, другую — растворителем. Наконец, заполняют и закрывают секции 4 и сосуды для электродов; все устройство погружают в водяной термостат.

После установления в ячейке температуры секции передвигают на их первоначальные места. Образуются две резкие границы между раствором и растворителем. Добавляя буферный раствор в один из сосудов для электродов и убавляя в другом, осторожно выводят обе границы на желаемый уровень в средней секции ячейки. Затем присоединяют электроды к источнику постоянного тока и с помощью оптического устройства наблюдают за перемещением границ. Наблюдение ведется в направлении, перпендикулярном плоскости изгиба ячейки.

Глубина ячейки должна быть по возможности большой, чтобы обеспечить достаточно длинный путь светового луча, с помощью которого ведется наблюдение. Практика показала, что глубина около 25 мм является оптимальной. Ширина ячейки должна быть небольшой, чтобы обеспечить достаточный отвод тепла, выделяемого при прохождении электрического тока. Уменьшение ширины кюветы связано с электроосмосом. Величина электроосмоса зависит от материала стенок. Оптимальная ширина ячейки для стекла составляет 2—3 мм. Применение органического стекла дало возможность уменьшить ширину до 0,4 мм.

Электроды. В приборе могут применяться любые электроды: платиновые, серебряные или угольные. Если на электродах выделяется газ, следует обеспечить его отвод. Образующиеся продукты электролиза могут иметь плотность, отличающуюся от плотности окружающего раствора. Сосуды для электродов необходимо конструировать так, чтобы возникающими конвекционными потоками продукты электролиза не заносились в измерительную ячейку.

Чаще всего используют серебряные электроды, покрытые слоем хлорида серебра и погруженные в насыщенный раствор NaCl , который наливается в нижнюю часть сосудов. Во время опыта на катоде происходит электрохимическое восстановление серебра, а на аноде — обратная реакция, приводящая к накоплению AgCl . При повторных опытах анод и катод меняют местами. Первоначальное осаждение AgCl на электроде проводится также электрохимически.

Размер сосудов для электродов должен быть тем больше, чем больше длительность опыта и сила тока, чтобы ионы из области вблизи электродов не успели попасть в ячейку и изменить в ней состав электролитов.

Оптические системы. Для наблюдения за движением границы можно использовать любое различие в оптических свойствах раствора и растворителя: светорассеяние, поглощение в видимом и ультрафиолетовом свете, различия в показателе преломления и т. д. Абсорбционные методы, особенно в видимом свете, требуют очень простой аппаратуры и часто применяются в зональном электрофорезе. При фронтальном электрофорезе применяются исключительно методы, основанные на различиях в показателе преломления — рефракционные и интерференционные — вследствие их универсальности и возможности точно определять не только положение границы, но и ее форму.

В рефракционных методах используется явление отклонения светового луча, проходящего через среду с градиентом показателя преломления в сторону большего показателя. Были предложены следующие методы: метод шкалы (метод Ламма), теневой метод (предложен А. Тизелиусом), методы, основанные на применении вертикальной (метод Филпота и Свенссона) и наклонной (предложен Г. В. Троицким) цилиндрической линзы. Все эти методы регистрируют градиент показателя преломления, преимущество их заключается в наглядности получаемых электрофореграмм.

В 50-х годах предложены различные варианты интерференционных оптических систем, которые все чаще применяются в современных приборах для наблюдения за границей раздела между растворами.

Термостатирование. Для лучшего отвода тепла ячейку или весь прибор, включая сосуды для электродов, погружают в водяной термостат. А. Тизелиус предложил поддерживать температуру термостата вблизи точки наибольшей плотности исследуемого раствора. В этой точке (для чистой воды вблизи 4°C) коэффициент объемного расширения мал, и опасность возникновения тепловой конвекции уменьшена. Точки максимальной плотности разбавленных водных растворов электролитов, которые применяются при электрофорезе, на $1\text{--}2^{\circ}\text{C}$ ниже, чем у воды. Поддерживая температуру около 1°C , можно работать при значении коэффициента объемного расширения на порядок меньше, чем при комнатной. Низкая температура дает дополнительное преимущество при исследовании легко денатурирующих объектов.

Концентрация раствора. Ионы движутся тем быстрее, чем больше напряженность поля в растворе. Использование поля с высокой напряженностью ускоряет опыт и уменьшает диффузионное размывание границ. Однако

чрезмерно большая напряженность поля приводит к перегреву и возникновению конвекции. Уменьшение электропроводности, т. е. концентрации электролита в растворе, увеличивает допустимую напряженность поля. Уменьшение концентрации электролита в растворе выгодно и тем, что при физико-химических исследованиях теоретическая интерпретация результатов электрофоретических изменений тем легче, чем больше разбавлен раствор. Предельное разбавление белка определяется не чувствительностью оптики, а стабильностью границы раствора.

Чем больше разность концентраций, следовательно и плотностей на границе, тем более устойчива она к действию тепловой конвекции и других факторов. Велика вероятность возникновения конвекционных полей при анализе смесей, в которых имеются компоненты с очень малой относительной конвекцией. Обычно считают, что рассеиваемая мощность может достигать до $0,2 \text{ Вт/см}^3$ при правильно выбранных размерах ячейки и рабочей температуре, т. е. местный перегрев может достигать $0,4^\circ\text{C}$, а изменение плотности — $0,001\%$. Но и при таких условиях в тех областях электрофоретической ячейки, где градиент концентрации мал, часто наблюдаются конвекционные потоки, проявляющиеся в виде острых пиков на диаграмме. По этим причинам концентрация белкового раствора для анализа выбирается от нескольких единиц до нескольких десятых процента.

Кроме самого белка, раствор содержит ионы иных элементов, входящих в буферные системы, используемые для поддержания рН среды, нейтральные соли и т. д. Точный электрофоретический анализ белковой смеси возможен только в том случае, если концентрация электролита в растворе значительно превышает эквивалентную концентрацию белка. Этим ограничивается минимальная концентрация электролита в растворе, которая определяет в основном его электропроводность и выбирается обычно в пределах $0,2—0,05 \text{ M}$.

Расчеты электрофоретической подвижности по «идеальной» электрофореграмме. Заряженные частички движутся в электрическом поле равномерно со скоростью v , пропорциональной напряженности электрического поля E :

$$v = uE.$$

Коэффициент пропорциональности u , численно равный скорости движения частички при $E=1 \text{ В/см}$, называют электрофоретической подвижностью данной частички.

Если через электрофоретическую ячейку с сечением S , содержащую раствор электролита с удельной электропроводностью δ , проходит ток i , напряженность поля в ней будет равна: $E = i/\delta S$.

За время t граница, образованная в растворе определяемыми ионами, переместится на расстояние $\Delta x = vt$; подставив значения v и E , получим:

$$\Delta x = u \frac{it}{\delta S}$$

При условии, что $it = q$, где q — количество электричества, прошедшее через раствор,

$$u = \frac{\delta S \Delta x}{q}$$

Это уравнение для определения электрофоретической подвижности. Электропроводность раствора определяют предварительно в специальном сосуде, калиброванном по раствору с известной электропроводностью. Обычно используют 0,1 М раствор КСl.

При анализе сложной смеси можно определить ее количественный состав. Для этого нужно найти соотношение между площадями соответствующих пиков градиента показателя преломления, если используется оптика Свенсона.

Области применения фронтального электрофореза следующие:

1. Определение электрофоретических свойств индивидуальных белков. Это один из немногих методов, дающий возможность определить с очень высокой точностью подвижность и изoeлектрическую точку белка, которые являются его важной характеристикой. Нужно только помнить, что каждое измерение дает характеристики, справедливые лишь для определенных значений рН, ионной силы и состава буферного раствора.

2. Электрофоретическая подвижность зависит от размеров, формы, числа заряженных групп макромолекулы, которые часто нельзя обнаружить другими методами. Изменения, вызванные различными химическими воздействиями, небольшие химические различия и т. д. могут быть легко замечены при фронтальном электрофорезе.

3. Количественное изучение ассоциации и диссоциации белков с другими компонентами — белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и др.

4. Определение однородности индивидуального белка. Хотя разрешающая способность метода невелика, иногда присутствие компонента с мало отличающимися подвижно-

стями проявляется в расширении границы в процессе движения. В некоторых случаях белки, считавшиеся однородными, разделяются на индивидуальные компоненты при крайних значениях рН или очень длительном электрофорезе.

5. Разделение смесей белков, особенно белков сыворотки крови, а также экстрагированных из различных органов и тканей животных и растений. Качество разделения и точность определения состава сильно зависят от состава, рН и ионной силы буферного раствора. Важным является такой выбор рН, когда все компоненты смеси заряжены одноименно — это уменьшает опасность ассоциации и выпадения осадка.

При различных патологических нарушениях в организме часто наблюдаются определенные изменения в составе и электрофоретическом поведении белков, поэтому данные фронтального электрофореза существенны для физиологических и клинических исследований.

Для препаративного разделения смесей метод мало пригоден, потому что в чистом виде может быть выделен только самый быстрый (на восходящей стороне) и самый медленный (на нисходящей стороне) компонент смеси, да и то лишь частично. Кроме того, самоизвлечение компонентов из узких областей легко конвектирующего раствора требует больших навыков. Ограничением к применению метода является также необходимость работы со сравнительно большими концентрациями белка и невозможность применения других методов анализа, кроме оптических.

Фронтальный электрофорез не применим для анализа смесей низкомолекулярных веществ.

§ 12. ЗОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Зональный электрофорез называют еще электрофорезом на инертном носителе, или электрофорезом в поддерживающей среде. Суть метода заключается в том, что электрофорез проводят в порах какого-либо твердого материала, и поэтому отпадают трудности, связанные с тепловой конвекцией и введением пробы. Но возникают специфические проблемы: возможность адсорбции исследуемого вещества на поверхности раздела фаз, электроосмотическое движение жидкости в порах, влияние неоднородности поддерживающей среды и др. Несмотря на это, электрофорез на твердом носителе широко распространен в лабораторной и клинической практике благодаря простоте аппаратуры, скорости и хорошему качеству разделения, возможности разделять различные классы веществ, способных к иониза-

ции в водной среде — от белков и нуклеиновых кислот до неорганических соединений.

К твердому носителю предъявляются следующие требования: материал должен иметь однородные поры размера, соответствующего разделяемым компонентам, быть нерастворимым и химически устойчивым в широком интервале рН, обладать механическими свойствами. Наиболее жестким требованием является отсутствие адсорбции исследуемых веществ на поверхности носителя и незначительный электроосмос. Пока не найдены материалы, полностью инертные во всех случаях, особенно по отношению к белкам.

В качестве носителя можно использовать асбестовое волокно, стекло в виде волокон, ткани, порошка или шариков, пористую резину, диатомовый ил и т. д. Но наиболее удовлетворяют предъявляемым требованиям порошки целлюлозы и крахмала, а из листовых материалов — бумага и ацетат-целлюлозные мембраны.

При работе с пористым носителем поверхность раздела фаз очень велика и даже сравнительно слабая адсорбция может привести к полной неудаче при электрофорезе. Причины адсорбции не всегда достаточно ясны. Очевидно, адсорбция пептидов и аминокислот связана с наличием ионизированных групп на поверхности носителя. В целлюлозе и в меньшей мере в крахмале содержатся свободные карбоксильные группы, которые при высоких значениях рН заряжены отрицательно, поэтому опасность адсорбции мала для отрицательно заряженных и велика для положительно заряженных групп. Для уменьшения заряда бумаги можно этерифицировать карбоксильные группы диазотаном. С белками рекомендуется работать при рН выше их изоэлектрической точки, когда электростатическое отталкивание препятствует адсорбции. Этот эффект можно усилить, используя «ионообменную» бумагу, в которой с поверхностью целлюлозных волокон химически связано значительное число ионизированных групп с зарядом, противоположным заряду исследуемого иона.

Для уменьшения адсорбции белков применяются детергенты, иногда помогает предварительная обработка носителя раствором исследуемого белка. Несмотря на это, адсорбция все-таки наблюдается при электрофорезе на твердом носителе (особенно для белков). Обратимая адсорбция проявляется в уменьшении скорости движения и в образовании «хвостов» у движущихся зон, что ухудшает разделение и затрудняет количественный анализ. Необратимая адсорбция приводит к тому, что на

всем пути зоны остается равномерный «след» — адсорбированный белок, а количество вещества в зоне постепенно уменьшается. Иногда адсорбция сопровождается денатурацией белка, частичной или полной потерей его биологической активности.

Простой способ количественной оценки адсорбции состоит в том, что предварительно проводится хроматография исследуемого вещества на носителе (без электрического поля) и измеряется удерживаемый объем.

Электроосмос. Заряд, существующий на поверхности раздела фаз, приводит к движению жидкости в порах носителя во время электрофореза. Если скорость этого движения невелика, то оно не приводит к ухудшению разделения, так как все зоны перемещаются параллельно. Но при большой скорости электроосмоса анализ усложняется: приходится учитывать его влияние и принимать специальные меры, для того чтобы поток жидкости не вынес исследуемые вещества за пределы носителя. Кроме того, при сильном электроосмосе зоны могут расширяться. В целлюлозе и крахмале заряды на поверхности раздела фаз появляются при диссоциации карбоксильных групп. Поэтому при $pH=4,0$ и ниже электроосмос в этих носителях мал. В нейтральной и щелочной средах он значителен.

Количество карбоксильных групп в целлюлозе и крахмале определяется в значительной мере их предшествующей обработкой. На скорость движения жидкости также влияет величина и форма пор. Потому электроосмос зависит от источника получения носителя, способа его приготовления, плотности упаковки и других факторов и плохо воспроизводим.

Скорость движения жидкости непосредственно у границы раздела фаз определяется той же формулой, что и скорость электрофореза крупных частичек, т. е. при прочих равных условиях она пропорциональна электрокинетическому потенциалу на границе раздела и уменьшается с повышением ионной силы раствора. Иногда применяют специальные способы уменьшения электроосмоса и его компенсации.

Одним из способов определения скорости движения жидкости в различных носителях является наблюдение за перемещением в них при электрофорезе незаряженных веществ, таких как глюкоза, декстран, нейтральные аминокислоты и изоэлектрической области и др. Для этого незаряженные вещества наносят на избранный носитель и пропускают через него электрический ток, соблюдая все условия, при которых проводят электрофорез. Затем находят местополо-

жение «нейтрального» вещества, учитывая, что его перемещение возможно только в результате электроосмоса. Следует помнить, что «нейтральное» вещество может в некоторых случаях приобретать заряд, образуя комплекс с ионами буферного раствора (например, сахара образуют комплекс с ионами VO_3^-).

Другой способ состоит в определении перемещения двух белков, подвижности которых предварительно измерены фронтальным электрофорезом.

Электрофоретическая подвижность в пористом носителе меньше, чем в свободном растворе, даже если адсорбция отсутствует, так как частички в порах перемещаются не прямолинейно, а по более длинным, извилистым траекториям. Поправка на непрямолинейность движения частичек для бумаги введена Н. Кункелем и А. Тизелиусом. Однако для других пористых носителей это осуществить не удалось.

В зависимости от пористой среды и техники работы можно выделить следующие виды электрофореза: электрофорез в колонках, электрофорез в блоках, электрофорез в листовых материалах, электрофорез в гелях.

Промежуточное положение между фронтальным и зональным электрофорезом занимает электрофорез в градиенте плотности.

Электрофорез в градиенте плотности

Метод предложен в 1955—1956 гг. А. Колиным и Г. Свенссоном. Электрофорез проводится в вертикальной трубке с буферным раствором, плотность которого возрастает с глубиной. Это достигается добавлением какого-либо тяжелого недиссоциирующего вещества (чаще всего сахарозы) с переменной концентрацией. Градиент плотности делает столбик жидкости устойчивым к тепловой конвекции, небольшим вибрациям и т. д. Затем на каком-либо уровне вводится исследуемый раствор узкой полосой. После завершения электрофореза столбик жидкости разделяют на фракции и анализируют. За введением образца и ходом опыта можно наблюдать визуально, если исследуемые вещества окрашены, а стенки трубки прозрачны. Удобно добавлять в исходный неокрашенный раствор какой-либо краситель. Можно создать градиент плотности в приборе Тизелиуса и пользоваться для наблюдения оптикой Филлота — Свенссона, учитывая влияние на показатель преломления самой сахарозы.

В градиенте плотности можно разделять как малые, так и значительные количества веществ. Применяя для анализа радиоактивную метку или измерение биологической активности, можно работать с субмикrogramмами вещества. Метод пригоден для разделения низкомолекулярных веществ.

В отличие от фронтального электрофореза, где уменьшение концентрации исследуемого вещества ниже определенного предела приводит к нестабильности границ, разделение в градиенте плотности тем лучше, чем меньше эта концентрация, так как стабильность обеспечивается независимым способом. Дальнейшая разработка электрофореза в градиенте плотности привела к возникновению нового метода — изоэлектрофокусирования.

Электрофорез в колонках

Первые колонки заполняли стеклянным порошком. Затем появились колонки с крахмалом и порошком целлюлозы, которые готовят, обрабатывая целлюлозу этанолом.

Колонки применяют для препаративного разделения и очистки смеси белков, пептидов, аминокислот. Крахмал особенно пригоден для электрофореза сывороточных белков, которые на нем практически не адсорбируются. Исследуются также и другие вещества в интервале рН от 2 до 11.

Целлюлозные колонки более универсальны. В них можно разделять большие количества белков (меньше влияние вязкости); адсорбция также во многих случаях меньше, чем в крахмале, благодаря меньшему содержанию твердой фазы; по той же причине адсорбция в целлюлозной колонке проявляется в меньшей степени, чем на бумаге.

Электрофорез в колонках используется в основном для препаративных целей, для аналитических целей он мало пригоден.

Преимуществом колонок является возможность разделения значительных количеств вещества при относительной простоте устройства. В колонках легко создать стандартные условия температуры, рН, ионной силы, чего не всегда можно добиться при других препаративных методах. С однажды заполненной колонкой можно работать в течение длительного времени. Извлечение зон не представляет трудностей, этот процесс легко можно автоматизировать.

Электрофорез в блоке

Метод заключается в том, что электрофорез ведут в специально приготовленных блоках, для наполнения которых чаще всего используется крахмал.

Структура наполнителя такова, что после окончания опыта можно вынуть из прибора целиком весь столбик крахмала, разрезать его на слои и элюировать каждый из них отдельно. Целлюлоза и другие пористые материалы мало пригодны для этой цели.

Электрофорез в крахмальном блоке разработан Н. Кункелем и Р. Слэтером в 1952 г. Метод обладает хорошей разрешающей способностью, однако идентификация разделенных компонентов затруднена из-за невозможности окрасить блок. Местоположение компонентов в блоке определяют накладыванием на блок хроматографической бумаги, на которую переходят компоненты, и дальнейшей ее окраской.

Крахмал готовят так же, как и для колонок, т. е. крахмал декантируют 5—10 раз в большом объеме дистиллированной воды; фракции, не осаждающиеся в течение 0,5—2 ч, отбрасывают. Затем следует промывка теплым буферным раствором. Суспензии дают осесть, избыток жидкости сливают и оставшейся пастой заполняют плоскую коробочку, приготовленную из органического стекла. Обычные размеры блока 30—80 см в длину, 3—8 см в ширину, 0,3—2 см в толщину. Для присоединения электродов в крахмал на концах блока закладывают полоски фильтровальной бумаги. Поверхность крахмала выравнивают, удаляя избыток жидкости фильтровальной бумагой, и прикрывают полиэтиленовой пленкой, органическим стеклом или легкоплавким парафином, чтобы предотвратить испарение.

Проба вводится в прямоугольную щель, которую вырезают поперек блока с таким расчетом, чтобы она не доходила до краев. Раствор пробы смешивают с сухим крахмалом и полученной пастой заполняют щель. Таким способом можно ввести несколько миллилитров раствора, содержащего несколько десятков миллиграммов вещества. Чтобы ввести меньшее количество раствора, нужно намочить в нем кусочек фильтровальной бумаги и вставить в щель блока. Можно ввести пробу в блок шприцом.

Блок во время электрофореза устанавливается как горизонтально, так и вертикально. При вертикальном способе разрешение получается лучше.

Электрофорез в блоке, так же как и электрофорез в колонках, применяется для препаративных целей, но исполь-

зается он гораздо шире благодаря простоте оборудования и самого процесса приготовления блока.

Электрофорез в листовых материалах

Электрофорез на бумаге можно рассматривать как частный случай электрофореза в блоке. Электрофорез на бумаге возник в конце 40-х — начале 50-х годов и получил широкое распространение. Он развивался параллельно с хроматографией на бумаге, успешно дополняя ее при исследовании низкомолекулярных веществ, пептидов и белков.

Метод дает качественную и количественную оценку, аппаратура и все операции очень просты, разделение происходит быстро, и одновременно можно исследовать большое количество проб (рис. 21).

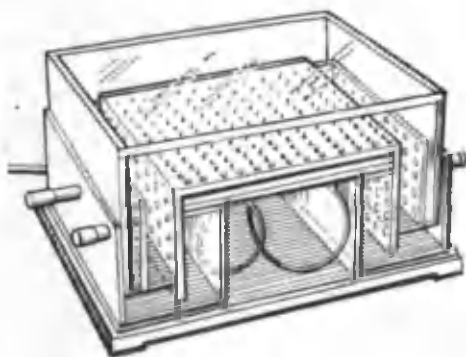


Рис. 21. Универсальный прибор для электрофореза и иммуноэлектрофореза.

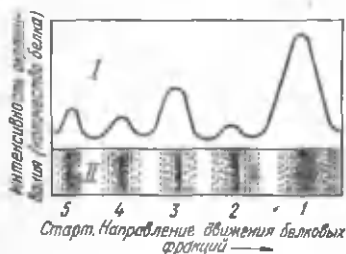


Рис. 22. Электрофореграмма (I) и протеинограмма (II) белков сыворотки крови человека:

1 — альбумины; 2 — α_1 -глобулины; 3 — α_2 -глобулины; 4 — β -глобулины; 5 — γ -глобулины.

Преимуществом метода является возможность анализа непосредственно на поверхности бумаги: путем специфического окрашивания зон, по ферментативной активности, радиоактивности и т. д. (рис. 22).

Одним из недостатков бумаги является заметная адсорбция и денатурация белков на ней. Кроме того, на поверхности бумаги постоянно испаряется вода, что вызывает движение жидкости (реофорез) как вдоль, так и поперек бумажной полоски. Испарение воды ведет к увеличению концентрации солей буферного раствора на бумаге, что создает неравномерное распределение электропроводности. Как правило, концентрация солей

больше в месте, которое находится дальше от электродов и продольной оси полосы бумаги. Движение буферного раствора может происходить и под влиянием силы натяжения вследствие различных уровней буферного раствора в электродных сосудах. Все это приводит к неравномерному движению зон, поэтому метод не пригоден для определения электрофоретической подвижности биополимеров.

В некоторых приборах бумага зажимается между твердыми поверхностями или погружается в непроводящую жидкость, что предотвращает испарение. В этом случае легко добиться воспроизводимости положения зон и измерить подвижность, но зоны получаются более широкими вероятно из-за влияния слоя жидкости, образующегося между поверхностью бумаги и непроводящей жидкостью, даже если она не смачивается водой.

При такой конструкции прибора можно легко осуществить хороший теплоотвод и резко повысить напряженность поля до 200 В/см, уменьшив время разделения до десятков минут. Такой электрофорез, часто в сочетании с хроматографией, успешно применяется для быстрого разделения аминокислот, пептидов и других относительно низкомолекулярных соединений. Белки этими методами разделяются плохо. Высокая напряженность обуславливает большую силу тока, бумага нагревается, поэтому необходимо охлаждение.

Электрофорез на бумаге является аналитическим и микропрепаративным методом, пригодным для разделения небольших количеств веществ. Без чрезмерного расширения пятна на бумагу можно нанести несколько десятков микролитров раствора.

Зоны на бумаге можно легко окрашивать и проводить качественные и количественные определения. В последнем случае измеряют интенсивность пятен в проходящем или отраженном свете, часто с автоматической записью на диаграмме с помощью денситометров различной конструкции.

Для количественной оценки электрофореграмм часто используется метод элюции с последующей фотометрией. Поскольку элюирование красителя редко бывает количественным, относительная погрешность такого определения составляет 20%.

В 1957 г. Коном для разделения белков были использованы мембраны из ацетата целлюлозы. Такие мембраны содержат больше ацетатных групп, которые не проявляют адсорбирующих свойств. Кроме того, разделение гораздо ускоряется при более низком напряжении. Меньший размер пятен означает, что вещество в них нахо-

дится в большей концентрации, поэтому его легче обнаружить. Низкая адсорбция ацетатом приводит к меньшему фону при окрашивании, что увеличивает чувствительность обнаружения. Прозрачность ацетата целлюлозы дает возможность осуществлять прямую фотометрию, а хорошая растворимость в различных растворителях позволяет легко элюировать разделенные компоненты.

Электрофорез в гелях

Гели, используемые в качестве поддерживающей среды, имеют ряд преимуществ. Основным из них является то, что размеры пор геля сравнимы с размерами разделяемых макромолекул. В этих условиях подвижность частичек резко зависит от их размеров и таким образом вводится дополнительный фактор, влияющий на их разделение. Во многих гелях крайне мала адсорбция. По этим причинам электрофорез в гелях обладает высокой разрешающей способностью по отношению к сложным белковым смесям. Это особенно выражено в крахмальном и синтетическом полиакриламидном гелях. В этих гелях, например, можно обнаружить до 30 компонентов сыворотки крови, в то время как фронтальный электрофорез дает только 5—7 фракций. Агаровый гель хотя и обладает малой адсорбцией по отношению к белкам, но дает худшее разделение, так как размеры пор в нем относительно велики. Но и в агаре отношение подвижностей больших и малых ионов уменьшается с увеличением его концентрации.

Как правило, электрофорез в гелях используется только для анализа. Для препаративных целей метод мало пригоден из-за трудности извлечения веществ из геля, тем более что при разделении на слои не удается полностью реализовать высокую разрешающую способность геля, поскольку зоны в его толще всегда несколько искривлены.

В практике электрофореза чаще всего используются агаровый, крахмальный и полиакриламидный гели. Использование агара для электрофоретического разделения было предложено Г. Гордоном и др. в 1956 г. Преимущества агарового геля следующие: его можно приготовить любой формы и толщины, он обладает пластичностью при нагревании и относительной плотностью при комнатной температуре. Для хорошего качества и воспроизводимости электрофореграмм большое значение имеет степень очистки агара.

Недостатком агара как среды для электрофореза является то, что в его структуре содержатся кислые полисахара-

риды типа агаропектинов, способные образовывать комплексы с некоторыми липопротеидами и основными белками. Кроме того, значительный отрицательный заряд в структуре агара вызывает повышение скорости движения воды и катионов в буферном растворе, который направлен от анода к катоду, вследствие чего белки с низкой электрофоретической подвижностью перемещаются от места старта к катоду (электроэндосмос).

Эти недостатки можно устранить, используя препарат агарозы — агар, очищенный от агаропектина. Гель агарозы более прозрачный, чем гель агара, механически более прочен и электронейтрален.

Хорошие результаты получают с 1%-м агаром, который в разогретом виде наносят на стеклянные пластинки. После электрофореза пластинки с агаром можно окрасить. После высыхания они достаточно прозрачны, чтобы можно было провести количественное определение прямой фотометрией.

Агаровый гель не имеет свойства молекулярного сита, поэтому разрешающая способность его низка.

Электрофорез в крахмальном геле разработан в 1955 г. О. Смитисом. Гель крахмала имеет свойство молекулярного сита, поэтому разделение в нем биополимеров осуществляется не только по величине электрического заряда, но и по размерам молекул, что обеспечивает большую разрешающую способность. Используется для исследований, связанных с идентификацией типов гемоглобинов, изоферментов, наследственно детерминированных белков и др.

Воспроизводимость электрофореграмм зависит от тщательности приготовления геля. Крахмал необходимо предварительно частично гидролизовать нагреванием в кислой среде при тщательно контролируемых условиях. После гидролиза материал хорошо промывают водой, обезвоживают и высушивают. Приготовленный таким образом крахмал смешивают с буферным раствором (13—15 г крахмала на 100 мл буферного раствора) и нагревают до тех пор (80—90°), пока вязкость раствора значительно не понизится. Затем жидкость деаэрируют при пониженном давлении, заливают в прямоугольную форму слоем толщиной 3—6 мм и ставят в холодильник на несколько часов. Простейший прибор устроен так же, как и для электрофореза в крахмальном блоке.

Часто сочетают электрофорез с хроматографией, особенно при разделении большого числа компонентов смеси, например сыворотки крови. Сыворотку сначала разделяют на бумаге, зоны не фиксируют, а влажную бумагу прижи-

мают к поверхности крахмального геля и проводят дополнительно электрофорез в геле в перпендикулярном направлении. После окончания электрофореза зоны проявляют для сопоставления с результатами электрофореза сыворотки крови на бумаге. Метод называют двухмерным электрофорезом.

Недостатком данного метода электрофореза является то, что эффективность его зависит от качества самого геля, приготовляемого из природных продуктов, свойство которых не всегда одинаковы. Кроме того, крахмальный гель непрозрачный, что усложняет идентификацию и количественное определение отдельных фракций. Для количественного фотометрирования окрашенных зон необходимо провести предварительное просветление фона.

Полиакриламидный гель ввел в практику Дж. Раймонд в 1959 г. Этот гель представляет собой продукт сополимеризации акриламида и какого-нибудь агента, который сшивает акриламид. Чаще всего таким агентом является N, N'-метилен-бис-акриламид. Благодаря образованию поперечных связей между соседними полиакриламидными цепями, которые нарастают, такой гель имеет строение трехмерной сетки.

Вязкость, эластичность и прочность геля зависят от степени полимеризации (от длины цепей) полиакриламида, а также от степени сшивания (от количества N, N'-метилен-бис-акриламида). Степень полимеризации и степень сшивания определяет плотность геля, который можно охарактеризовать средним размером пор. Этот фактор имеет большое значение при разделении молекул различной формы и массы по принципу молекулярного сита. Средний диаметр пор у 7,5% гелей равен 5,0 нм, а у 30% — около 2,0 нм.

Именно потому, что полиакриламидный гель является синтетическим продуктом полимеризации, он имеет ряд положительных качеств: химическую стабильность и инертность, прозрачность, лабильность строения (что дает возможность получать гели с необходимой величиной пор), отсутствие адсорбции и электроосмоса, стабильность относительно изменений pH среды и температуры, нерастворимость в большинстве растворителей. Полиакриламидный гель можно получить с хорошей воспроизводимостью из аналитически чистых исходных веществ.

Электрофорез в полиакриламидном геле, как и в крахмальном, имеет высокую разрешающую способность, потому что в нем объединены два принципа: разделение по электрофоретической подвижности и на основе эффекта молекулярного сита. Эффект молекулярного сита связан с

тем, что гели отличаются от жидких сред большей вязкостью и высоким сопротивлением трения. Частички, которые движутся в гелях, испытывают в зависимости от своих размеров различное сопротивление трения и поэтому разделяются не только по своим зарядам, а и «просеиваются» в зависимости от размера и формы молекул. Эффективность электрофореза в крахмальном геле в большой мере зависит от качества самого геля, свойства которого не стандартны потому, что это природный продукт. Полиакриламидный гель получают при постоянных условиях из веществ определенного химического строения и относительно высокой степени чистоты, поэтому получаемые результаты легко воспроизводимы. Кроме того есть возможность широко варьировать плотность сетки геля, при изменениях концентрации от 2 до 30% (в пересчете на акриламид) гель остается прозрачным.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводится в колонках с гелем (рис. 23) или на пластинках геля (рис. 24). В последнее время колонки быстро вытесняются пластинками геля, использование которых дает возможность одновременно на одной пластинке анализировать большое число проб. Этот вид электрофореза наиболее гибкий и широко используется для анализа и разделения макромолекул.

Гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) можно использовать для определения молекулярной массы белков (К. Вебер и М. Осборн, 1969). При $\text{pH}=7$ в 1%-м растворе ДСН и 0,1 М растворе меркаптоэтанола большинство многоцепочечных белков связывает ДСН и диссоциирует, дисульфидные связи разрываются меркаптоэтанолом, вторичная структура исчезает, в результате чего комплексы, состоящие из субъединиц белка и ДСН,

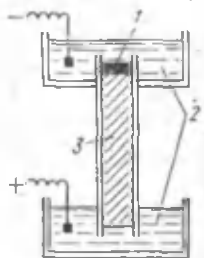


Рис. 23. Прибор для гель-электрофореза в колонке:

1 — проба; 2 — буферный раствор; 3 — гель.

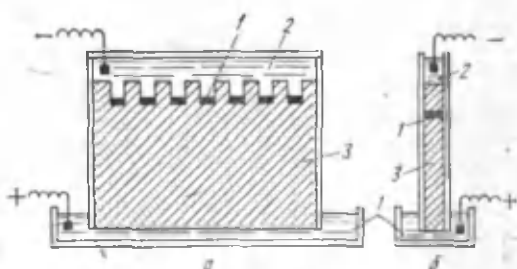


Рис. 24. Прибор для электрофореза на пластинках геля:

1 — пробы (семь); 2 — буферный раствор; 3 — гель; а — вид спереди; б — вид сбоку.



Рис. 25. График зависимости $\lg M$ от подвижности белка для определения молекулярной массы методом электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле:

1 — альбумин бычьей сыворотки; 2 — каталаза; 3 — яичный альбумин; 4 — карбоксипептидаза А; 5 — химоотрипсиноген; 6 — лизоцим.

приобретают беспорядочную конфигурацию. Обработанные таким образом белки имеют одну и ту же форму и одинаковое отношение заряда к массе. Это объясняется тем, что количество ДСН, связываемое на единицу массы белка, всегда равно 1,4 ДСН на 1 г белка. Заряд белковой молекулы определяется в большей степени ДСН, а не различием заряда на поверхности белка за счет аминокислот.

Таким образом достигается зависимость подвижности только от молекулярной массы белка за счет свойств геля быть молекулярным ситом. Если в колонке с гелем подвергнуть электрофорезу серию белков с известной молекулярной массой, то получается серия полос. График зависимости $\lg M$ от подвижности белка представляет собой прямую линию (рис. 25). Если белок с неизвестной молекулярной массой подвергнуть электрофорезу, то по калибровочному графику можно определить его молекулярную массу с относительной погрешностью от 5 до 10%. Большую точность можно получить, когда неизвестная молекулярная масса находится между известными. Этот метод определения молекулярной массы, как и тонкослойная гель-проникающая хроматография, наиболее распространен в практике.

Гель-электрофорез в присутствии ДСН можно также использовать для определения наличия S—S-групп, так как в присутствии этих групп подвижность будет зависеть от обработки белка меркаптоэтанолом, расщепляющим S—S-связи. Кроме того ДСН используется вместо 7—12 M растворов мочевины, которые применялись для разрушения вторичной и третичной структуры белков.

Электрофорез в полиакриламидном геле широко используется для разделения нуклеиновых кислот. Основным фактором разделения в данном случае является эффект молекулярного сита, так как отношение заряда к массе приблизительно одно и то же для всех полинуклеотидов. Этот метод можно использовать также для разделения кольцевых и линейных молекул ДНК. Можно подобрать такую концентрацию геля, при которой в гель будут проникать только линейные молекулы ДНК, а кольцевые останутся на старте.

Диск-электрофорез

Диск-электрофорез предложен Л. Орнштейном и Б. Девисом в 1964 году. Это метод разделения, в котором используется неоднородная прерывистая среда с полиакриламидным гелем в качестве носителя. В отличие от электрофореза в однородной системе полиакриламидного геля при диск-электрофорезе значение рН и размеры пор неодинаковы в разных частях колонки, благодаря чему возникает эффект концентрации: в верхней части колонки вещества собираются в резко ограниченной зоне, в нижней они разделяются. Верхний слой геля имеет меньшую концентрацию (большой размер пор), готовится в буферном растворе с низкой ионной силой и различными значениями рН и называется концентрирующим. Нижний слой геля с малыми размерами пор и иным значением рН называется разделяющим. Большой размер пор верхнего слоя геля приводит к тому, что молекулы в нем задерживаются меньше, двигаясь при этом быстрее, чем в нижнем слое. Кроме того, меньшая ионная сила обуславливает большее электрическое сопротивление, поэтому напряженность электрического поля в верхнем слое геля больше, что также влечет за собою большую скорость движения молекул в верхнем слое по сравнению с нижним. Соотношение значений рН по слоям оказывает такое же влияние на подвижность. Все это приводит к тому, что в верхнем слое геля компоненты смеси с близкими подвижностями концентрируются. Это явление называется эффектом концентрирования, или эффектом Кольрауша (см. «Изотахорофорез»). При движении молекул через разделяющий гель образуются различные зоны в соответствии с подвижностями разделяемых компонентов.

Таким образом, разделение веществ этим методом основано не только на различиях подвижности, но и на взаимодействии эффекта концентрирования и молекулярного сита. Эти свойства обуславливают преимущества диск-электрофореза: малое количество исследуемого материала (1—100 мкг), отсутствие необходимости в первоначальном концентрировании разбавленных растворов, простота аппаратуры (использование стеклянных трубок), скорость разделения, большая разрешающая способность для молекул разного размера (молекулярная масса от 10^4 и меньше до 10^6 и больше) и различной формы, хорошее воспроизведение разделения, простота исследования белков, протеидов, нуклеиновых кислот, ферментов, антигенов, полисахаридных ионов.

Метод состоит в том, что после раздельной полимеризации гелей в колонке тонкий слой пробы (10—20 мкл) в плотном слое сахарозы наносится на верхний слой геля в стартовой зоне и в течение 1,5—2 ч проводится электрофорез. После окончания разделения гель удаляют из колонки. Для идентификации зон существует ряд методов. Гель можно окрашивать, погружая в раствор красителя с последующим тщательным промыванием для удаления несвязанного красителя. (В некоторых случаях краситель удаляют с помощью электрофореза. Это можно осуществить благодаря тому, что краситель ковалентно связывается с белком, который в свою очередь связан с гелем. Несвязанный краситель свободно выходит из геля при повторном приложении электрического поля). При необходимости гель можно фотографировать; если же требуется получить количественную информацию, количество связанного красителя измеряют денситометром. В другом методе гель разрезают поперек на много слоев, каждый из которых анализируют на радиоактивность, измеряют оптическую плотность при соответствующей длине волны или количество красителя. При использовании радиоактивного материала гель можно разрезать вертикально и анализировать методом автордиографии.

Диск-электрофорез применяют в основном для определения чистоты предположительно чистых белков и для анализа компонентов смесей, когда необходимо получить очень высокое разрешение (т. е. в случае присутствия очень большого числа компонентов).

Понятие чистоты, естественно, относительно, и единственная зона может быть результатом того, что примеси присутствуют в слишком малых количествах, чтобы их можно было определить. Поэтому для проверки чистоты используют большие количества белка. Поскольку предел определения вещества при окрашивании составляет около 1 мкг, для гарантированной 99%-й чистоты следует наносить 100 мкг белка, причем это количество будет достаточным только в том случае, когда вещество в качестве примеси содержит только один белок. Даже при очень высоких концентрациях (0,5—1,0 мг) наличие одной зоны еще не является критерием чистоты, поскольку примеси могут не отделяться в выбранном буферном растворе или при данном рН. Следовательно, для того чтобы иметь хотя бы некоторую уверенность в гомогенности препарата, обычно необходимо использовать несколько буферных растворов и ряд значений рН.

Непрерывный (проточный) электрофорез

Непрерывный электрофорез представляет собой препаративный метод, заключающийся в одновременном перемещении непрерывно прибавляемого вещества в одном направлении потоком растворителя и в другом направлении — электрическим полем. В качестве носителя здесь часто используют фильтровальную бумагу, однако можно проводить проточный электрофорез и без целлюлозного носителя. Большой лист бумаги, расположенный, как показано на рис. 26, помещают в камеру из плексигласа. Верхний край бумаги погружают в резервуар с буферным раствором, причем первоначально всю бумагу смачивают этим раствором. Пока резервуар полон, буферный раствор непрерывно движется по бумаге вниз под действием капиллярных сил и каплет с зубцов на нижнем крае бумаги в пробирки. Вдоль линии старта непрерывно прибавляется разделяемый раствор с помощью механического шприца или фитиля. Электрическое поле приводит к постоянному горизонтальному перемещению, степень которого зависит от степени и знака подвижности. Разделение определяется такими факторами, как скорость тока буферного раствора, скорость прибавления вещества, приложенное напряжение, рН и ионный состав буферного раствора; оптимальные условия обычно подбирают опытным путем. Такая система успешно применяется для разделения белков, пептидов, аминокислот, других небольших молекул и неорганических ионов.

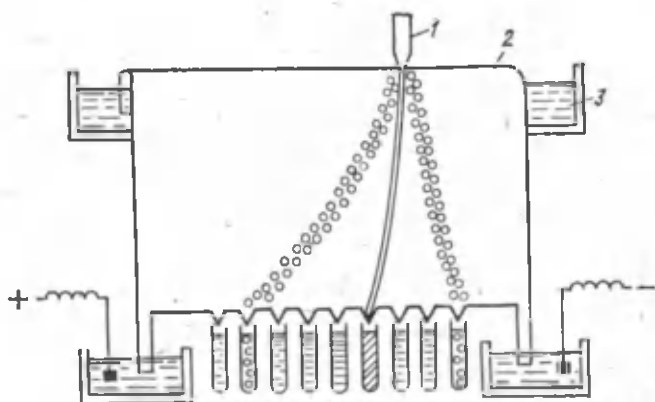


Рис. 26. Прибор для проточного электрофореза:
1 — пробирка; 2 — бумага, пропитанная буферным раствором; 3 — резервуар с буферным раствором.

При работе с некоторыми веществами приходится сталкиваться с проблемой адсорбции на бумаге. Во избежание этого К. Хэннинг разработал систему, в которой не требуется целлюлозный носитель. Для этого буферный раствор из резервуара постоянно течет между двумя очень близко расположенными стеклянными пластинами. Точность температурного контроля и малое расстояние между пластинами, обуславливающее значительную капиллярность, понижают конвекцию. Через ряд конических отверстий у основания отбираются различные фракции. Этот дорогой и сложный прибор не нашел широкого применения, однако он дает прекрасное разделение белков, пептидов и различных кровяных клеток (например, лимфоциты человека, вырабатывающие антитела, можно отделить от лейкоцитов и макрофагов).

§ 13. ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Иммуноэлектрофорез принадлежит к наиболее чувствительным и современным методам иммунологического анализа. С помощью этого метода можно определить число компонентов смеси, а также идентифицировать эти компоненты по их электрофоретической подвижности, иммунохимической специфичности, химической природе или определенным свойствам. С помощью иммуноэлектрофореза можно определить только те компоненты, которые способны давать реакцию преципитации с антителами (полные антигены или гаптены, полученные при деградации полных антигенов), т. е. в основном белки и некоторые полисахариды. Специфичность реакции преципитации дает возможность разделить вещества даже с одинаковой электрофоретической подвижностью, а благодаря чувствительности этой реакции можно определить вещества с очень маленькими концентрациями. Для проведения анализа нужно небольшое количество вещества.

Однако метод иммуноэлектрофореза имеет ряд недостатков, а именно: а) исследуемые вещества должны растворяться в водных буферных растворах и иметь антигенные свойства; б) основной реагент — иммунная сыворотка — представляет собой тяжело стандартизированный биологический продукт. Для выявления максимального количества компонентов смеси иногда необходимо использовать несколько сывороток от разных тканей; в) этот метод в основном качественный и дает возможность проводить количественные определения лишь при разбавлении смеси антигенов.

Иммуноэлектрофорез проводят в гелях. Из различных исследуемых веществ удовлетворительные результаты получают только с агаровым и пектиновым гелями. Иммуноэлектрофорез можно также проводить и в гелях из крахмала, но эти гели непрозрачные и электрофоретическая подвижность в них отличается от подвижности в жидкости.

Вместо гелей можно использовать пленки ацетатцеллюлозы, однако из-за особенности строения этих пленок результаты опыта много искажаются, потому что при этом возможен так называемый фильтрующий эффект (макромолекулярные вещества будут задерживаться в ходе электрофореза). В агаровых гелях очень редко проявляется фильтрующий эффект. Для агара не установлено уменьшение скорости миграции глобулина с большой молекулярной массой, но в нем наблюдается некоторое замедление движения нативного фибриногена крови и лизоцима яичного белка. Агар образует стойкие гели уже при концентрациях около 1%, и разные вещества в таких гелях имеют такую же подвижность, что и в жидких средах. Эти гели очень прозрачные и при высыхании превращаются в эластичные пленки, которые не изменяются при длительном хранении.

При иммуноэлектрофорезе в геле параллельно оси миграции делают углубление, в которое помещают необходимый объем иммунной сыворотки. Антитела из этой сыворотки и антигены, которые содержатся в геле, диффундируют навстречу друг другу и когда встречаются в соответствующих соотношениях, образуют нерастворимые комплексы — преципитаты в виде дуг, имеющих более или менее эллипсоидную форму. Количество отдельных дуг соответствует количеству отдельных компонентов в смеси. В иммуноэлектрофорезе можно говорить об одной дуге, если даже есть некоторые раздвоения, но концы их или сами дуги некоторое время сливаются.

Если обе дуги образуются сразу и остаются без изменений, то можно говорить о наличии двух независимых дуг и двух независимых веществ, так же как и при пересечении двух близко расположенных дуг.

Соотношение иммунной сыворотки и исследуемого вещества, а также расстояние от центрального углубления до боковых, имеет большое значение, потому что образование специфических преципитатов зависит от соотношения антигенов и антител.

Результаты анализа можно зафиксировать в виде схем или документировать. Часто дуги преципитации можно окрасить, это облегчает наблюдение. Для эффективности окрашивания все белки, которые не берут участия в

специфической реакции, удаляют, промывая пластинки в течение 2—3 ч физиологическим раствором, который несколько раз меняют. После окончания промывания гель накрывают мокрой фильтровальной бумагой и высушивают при температуре 37°C. После высушивания бумагу снимают. Использование красителей, реагирующих с белками, делает дуги преципитации более заметными. Если антиген имеет какие-нибудь компоненты (липиды, углеводы, металлы), то с помощью соответствующих гистохимических реакций можно определить наличие этих компонентов и детальнее охарактеризовать любую дугу преципитации. После окрашивания агаровую пленку легко снять со стекла, погружая его в водный раствор глицерина. В результате этого получают эластичную пленку, которую можно сохранять очень долго между листами фильтровальной бумаги или в целлофановом конверте.

С помощью реакции специфической преципитации можно определить вещества только при таких условиях: а) исследуемое вещество должно быть антигеном или гаптеном; б) иммунная сыворотка должна иметь достаточное количество антител, которые осаждают (преципитируют) это вещество; в) концентрация антител в исследуемой смеси должна быть достаточной для определения.

Метод иммуноэлектрофореза дает возможность очень точно и полно определить компоненты сложных белковых смесей по их иммунологической специфичности и электрофоретической подвижности и, кроме того, иметь представление об относительной концентрации компонентов в системе, а в некоторых случаях — об их физиологической активности и химических свойствах. Этим методом можно определить индивидуальный антиген в системе, не выделяя его из смеси.

Использование иммунологической специфичности веществ в иммуноэлектрофоретическом анализе дает возможность разделять белки (или антигенные полисахариды), идентичные по электрофоретической подвижности, молекулярной массе и другим физико-химическим свойствам.

§ 14. ИЗОЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ (ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЕ) В ГРАДИЕНТЕ ЗНАЧЕНИЙ pH

Это метод разделения амфолитов по электрофоретической подвижности и изоэлектрическим точкам. В отличие от обычного электрофореза в полиакриламидном геле размер пор геля при изоэлектрофокусировании имеет меньшее зна-

чение, а основным фактором, который противодействует, является градиент рН (Г. Свенссон, 1962; А. Хэглунд, 1967).

При передвижении границы фракции во время электрофореза или хроматографии диффузия размывает границы зоны. Использование же метода изоэлектрофокусирования одновременно с электрофорезом приводит к тому, что фракция белка концентрируется в зонах, которые соответствуют их изоэлектрической точке.

Изоэлектрофокусирование представляет собой миграцию молекул амфолита (амфотерного электролита) в градиенте рН под действием постоянного напряжения в область со значением рН, равным изоэлектрической точке вещества (рис. 27). Например, молекулы белка в той области, где рН ниже его изоэлектрической точки, заряжены положительно и перемещаются в направлении сверху вниз. Молекулы в области с рН выше изоэлектрической точки белка мигрируют снизу вверх. В итоге белок оказывается сконцентрированным или сфокусированным в зоне с рН, равным его изоэлектрической точке. В таком состоянии он остается до тех пор, пока сохраняется градиент рН и подается напряжение. Аналогично компоненты гетерогенной смеси белков будут располагаться вдоль трубки в виде набора зон в порядке их изоэлектрических точек. Подобное распределение белков называется *изоэлектрическим спектром* в отличие от спектра подвижности, создаваемого с помощью электрофореза. Преимущество изоэлектрофокусирования по сравнению с другими методами в том, что в ходе разделения зона белка сужается, так как действующие силы стремятся уменьшить размывание зон вследствие диффузии.

Для создания градиента рН используются низкомолекулярные синтетические полиамфолиты (многозарядные структуры), перекрывающие широкий интервал изоэлектрических точек. Для разделения биополимеров в градиенте рН был впервые осуществлен в середине 60-х годов О. Вестербергом синтез амфолинов. Амфолины содержат набор полиаминополикарбоновых кислот, обладающих значительной буферной емкостью с изоэлектрическими точками в интервале рН от 2,5 до 11,0.

Амфолины выпускаются фирмой «ЛКВ» (Швеция) в виде 40%-х водных растворов в следующих интервалах рН: 2,5—4,0; 3,0—5,0; 3,0—6,0; 4,0—6,0; 5,0—7,0; 5,0—8,0; 7,0—

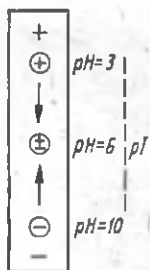


Рис. 27. Схема изоэлектрофокусирования.

9,0; 8,0—10,0; 9,0—11,0; 3,5—5,0; 3,5—10,0; 3,0—10,0. Выпускаются также типы амфолинов, дающие градиент рН в интервале 0,5 единиц (4,0—4,5; 4,5—5,0). Во избежание разложения и загрязнения микроорганизмами амфолины следует хранить в темном месте при температуре не выше 6°C.

Фирма «Seriva» (ФРГ) начала производство серволитов — полиаминов, содержащих в качестве анионных групп остатки серной и фосфорной кислот, карбоксильных групп. Серволиты также можно использовать для создания градиентов рН в интервале от 2,0 до 11,0.

Ввиду гетерогенности амфолины химически не охарактеризованы. Максимальная молекулярная масса (M) амфолинов «рН=3,5—10,0» достигает 5000. Амфолины с $M > 4000$ составляют около 0,03% общего количества амфолинов, с $M > 1000$ —0,7%, а $M > 600$ —6%. Большая часть амфолинов имеет $M \approx 400$.

Амфолины способны реагировать с нингидрином, давать биуретовую реакцию с реактивом Фолина. Они необратимо окрашиваются красителями для белков — амидочерным, кумасси голубым и т. д., образуют хелатные комплексы с металлами. Хотя способность к образованию комплексов с двухвалентными ионами Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} у амфолинов в 20—200 раз слабее, чем у этилендиаминтетрауксусной кислоты, они способны вызвать полное ингибирование ряда металлоферментов.

Присутствие амфолинов не мешает протеканию иммунологических реакций, таких как иммунопреципитация или реакция фиксации компонентов. Токсичность амфолинов незначительна и иммунизация животных смесью белка с амфолином не вызывает побочных реакций.

Амфолины имеют характерные максимумы поглощения в видимом свете, которые следует учитывать при спектрофотометрическом изучении смеси белков с амфолинами.

Амфолины затрудняют определение N-концевых аминокислотных остатков белков или пептидов методом дансильирования и мешают точному проведению аминокислотного анализа, особенно идентификации β -аланина, таурина, фосфосерина, цистеиновой и аспарагиновой кислот.

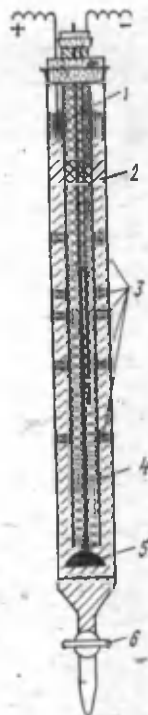
Присутствие амфолинов не вызывает денатурации белков, иногда стабилизирует их. Считают, что амфолины не связываются с белками, однако для альбумина описано незначительное комплексообразование с амфолинами. Отделение белков, особенно низкомолекулярных, и пептидов от амфолинов — очень трудоемкий процесс. Для этого используют продолжительный диализ, гель-фильтрацию на

Рис. 28. Схема колонки для изоэлектрического фокусирования в градиенте плотности.

сефадексах G-25 и G-50, многократное пересаживание белков сульфатом аммония, ионообменную хроматографию, ультрацентрифугирование и ультрафильтрацию. Невозможно провести полное отделение белков с молекулярной массой 20 000 — 30 000 от амфолинов гель-фильтрацией.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности. Градиент плотности в растворе широко применяется для стабилизации среды при электрофокусировании. После окончания опыта такой раствор можно собрать для последующего анализа. Данный метод может применяться для аналитических и препаративных целей. Градиент плотности предотвращает конвекцию, а также стабилизирует зоны белка. Для этой цели применяют различные неионные стабилизирующие среды, в том числе сахарозу, глицерин, этиленгликоль. Градиент создают постепенно, внося в колонку для электрофокусирования различные концентрации сахарозы. Пробы можно вносить, перемешав со всем объемом сахарозы и амфолина, или в определенные зоны, близкие к изоэлектрическим точкам.

Для изоэлектрофокусирования в градиенте плотности используется колонка конструкции О. Вестерберга и Г. Свенссона (рис. 28). Градиент pH создается в колонке 2, которая изготовлена из стекла, содержит катодную трубку 4, анод 1 и охлаждается водой. Колонку 2 заполняют полиамфолином в градиенте концентрации сахарозы для предотвращения конвекции. Пробу также готовят в виде суспензии в полиамфолине. Катодная трубка 4 заполняется сильным основанием (обычно триэтаноламином), а в верх колонки 2 заливается фосфорная кислота, в слое которой находится анод 1. Клапан 5 на дне катодной трубки 4 открывают, после чего к электродам прикладывают напряжение в несколько сот вольт. Через 1—3 дня система придет в равновесие и белки 3 распределятся в градиенте pH в соответствии с их изоэлектрическими точками. Содержимое колонки 2 фракционируют через сливной кран 6. Различные белки определяют спектрофотометрически, по ферментативной активности или по радиоактивности.



Для создания градиента рН от 3 до 10 при объеме колонки 400 см³ и 5°С необходимо около 8 ч. Фокусирование зон белков длится 24—72 ч.

Изоэлектрофокусирование в градиенте плотности используется для препаративного разделения и установления точного значения изоэлектрической точки. Как аналитический метод он слишком дорогостоящий с точки зрения затрат реактивов, времени и анализируемого образца (около 500 мг образца).

Изоэлектрофокусирование в геле. Метод аналитический, гораздо проще в отношении аппаратуры, требует меньших затрат вещества, незначительных количеств дорогостоящих амфолинов-носителей и дает возможность в течение 3 ч выполнить анализ нескольких проб одновременно. Этот метод используется для фракционирования белков по их изоэлектрическим точкам для быстрой проверки чистоты в процессе многостадийного выделения или анализа белкового состава многих проб. Он служит также для подбора оптимальных условий препаративного разделения.

От электрофореза в полиакриламидном геле метод отличается тем, что находящийся в трубках или на пластинках гель содержит амфолины-носители, которые вместе с пробой равномерно распределяются по всему гелю или проба наслаивается сверху геля. Трубки или пластинки соединяют с анодной и катодными камерами, заполненными соответственно 0,2%-м раствором серной или фосфорной кислот и 0,4%-м раствором этаноламина и этилендиамина. Разделение проводят в течение 1—3 ч. Зоны белка фиксируют 5%-м раствором трихлоруксусной кислоты, а затем окрашивают, предварительно удалив амфолины. Метод изоэлектрофокусирования дает возможность проводить разделение, которое нельзя осуществить другими методами, при этом зоны разделяемых амфолинов значительно концентрируются.

§ 15. ИЗОТАХОФОРЕЗ

Метод достаточно прост, обладает высокой чувствительностью, с его помощью можно разделять большие и малые количества проб. По разрешающей способности препаративный изотахофорез не уступает электрофокусированию в градиенте рН.

При изотахофорезе заряженные ионы сначала разделяются в соответствии с величиной их заряда и подвижностью, а затем перемещаются в электрическом поле с одинаковыми и постоянными в данном опыте скоростями. Характер

перемещения ионов во время изотахофоретического разделения описывается уравнением Кольрауша:

$$\frac{c_A}{c_B} = \frac{u_A}{(u_A + u_R)} \cdot \frac{(u_B + u_R)}{u_B} \cdot \frac{L_A}{L_B}$$

где u_A , u_B и u_R — подвижности ионов A^- , B^- и R^+ ; c_A и c_B — концентрация ионов A^- и B^- ; L_A и L_B — величина электрического заряда ионов A^- и B^- .

В таком виде уравнение отражает процессы, которые происходят на движущейся к аноду границе, разделяющей растворы двух солей A^-R^+ и B^-R^+ , имеющих общий противоион R^+ .

Физический смысл уравнения Кольрауша состоит в том, что изменение концентрации одного из ионов в каком-либо участке трубки, в котором происходит изотахофоретическая миграция ионов, приводит к такому изменению концентрации других ионов, что сумма отношений c/u для всех ионов остается постоянной. Поскольку подвижность ионов u определяется отношением скорости миграции иона при свободном электрофорезе v к напряженности электрического поля E ($u = v/E$), уравнение Кольрауша описывает соотношение между напряженностью электрического поля, концентрацией иона и его подвижностью.

При проведении эксперимента проба вводится между ведущим электролитом (содержащим ведущий ион с подвижностью большей, чем подвижность ионов пробы) и замыкающим электролитом (содержащим замыкающий ион с подвижностью меньшей, чем подвижность ионов пробы). Ионы пробы, замыкающего и ведущего электролитов должны иметь заряд знака пробы (в данном случае отрицательный).

Чтобы достигнуть необходимые значения рН и буферной емкости, растворы пробы, ведущего и замыкающего электролитов должны иметь одинаковый противоион, обладающий буферными свойствами (рис. 29).

После приложения к системе разности потенциалов все отрицательно заряженные ионы сначала движутся со скоростями, определяемыми напряженностью электрического поля, величиной заряда и подвижностью. Ведущие ионы, обладающие высокой подвижностью, с большой скоростью движутся к аноду. По мере ухода ведущих ионов снижается общая концентрация ионов в системе, и в соответствии с уменьшением электропроводности возрастает напряженность электрического поля. Вслед за ведущими ионами к аноду мигрируют ионы пробы. Напряженность электрического поля в зоне пробы также резко повышается, что

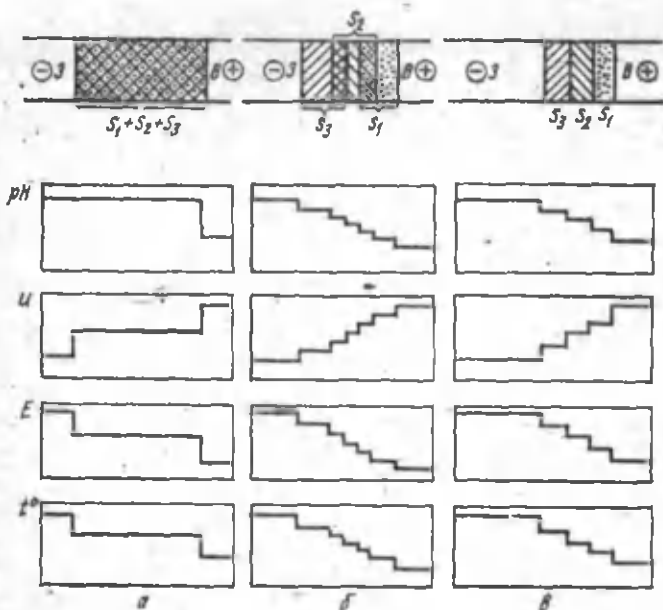


Рис. 29. Схематическое изображение изменений рН, подвижности u , напряженности поля E и температуры T^0 в анионной изотахофоретической системе:

a — начальные условия эксперимента (рН, u , E и T^0) в зоне пробы одинаковы; b — через определенный промежуток времени компоненты пробы S_1 , S_2 и S_3 частично разделились и образовали ступенчатые рН, u , E и T^0 ; v — в системе достигнуто равновесие, характеризующееся полным разделением компонентов пробы, четкими границами между ними, образованием стабильных во времени ступенчатых градиентов рН, u , E и T^0 при достижении всеми компонентами системы одинаковой скорости движения; В — ведущий электролит; З — замыкающий электролит.

приводит к увеличению скорости их миграции и обеспечивает равенство скоростей миграции ионов пробы и ведущих ионов. Проникнуть же в зону ведущих ионов ионы пробы не могут. Если какая-то часть ионов пробы все же проникнет в зону ведущих ионов (характеризующуюся низкой напряженностью поля из-за наличия большого количества ведущих ионов с высокой подвижностью), то скорость их миграции резко уменьшится; они отстанут от движущихся к аноду ведущих ионов и окажутся в «своей» зоне. Если ведущие ионы попадут в зону ионов пробы, то вследствие высокой напряженности электрического поля в этой зоне скорость их движения резко увеличится, и они будут «выброшены» обратно в свою зону, где скорость их движения снова нормализуется. Таким образом, возникает «самостабилизирующаяся», идущая к аноду, граница (фронт), по одну сторону которой находятся ведущие ионы, по дру-

гую — ионы пробы. Зона ведущих ионов характеризуется большой концентрацией ионов с высокой подвижностью. Соответственно эта зона будет иметь низкую напряженность электрического поля, вследствие чего выделение тепла в ней будет незначительным. Зона ведущих ионов имеет наиболее низкое значение рН.

Зона пробы характеризуется меньшей концентрацией ионов со значительно меньшей, чем у ведущих ионов, подвижностью, но большей напряженностью поля и более высоким значением рН, более сильным выделением тепла.

За ионами пробы движутся замыкающие ионы, обладающие еще меньшим зарядом и подвижностью. Они не могут опередить ионы пробы, которые для них являются ведущими. В трубку, где движутся ионы, все время поступают новые количества замыкающих ионов из электродного замыкающего электролита, поэтому их концентрация остается постоянной. Потому после приложения к системе разности потенциалов концентрируются именно ионы пробы и тем самым обеспечивается постоянство суммы отношений c/u согласно уравнению Кольрауша, что приводит к сужению зоны пробы. По мере сужения зоны пробы концентрация ионов в ней увеличивается, соответственно возрастает электропроводность и падает напряженность электрического поля в этой зоне до тех пор, пока скорости миграции всех трех видов ионов — ведущих, замыкающих и ионов пробы — не окажутся равными. После установления равной и постоянной скорости движения всех ионов система стабилизируется. Ионы пробы оказываются «сжатыми» между ведущими и замыкающими ионами в узкой зоне. Ширина этой зоны и концентрация ионов в ней в значительной степени определяются концентрацией и подвижностью ведущих ионов. С одной стороны, чем выше подвижность и концентрация ведущих ионов, тем в более узкой зоне с большей концентрацией будут сжаты ионы пробы. С другой стороны, при введении в систему большого количества ионов пробы ширина занимаемой ими зоны увеличится, но концентрация их в этой зоне изменяться не будет, поскольку она задается для системы разделяющей концентрацией и подвижностью ведущих ионов. Разрешающая способность изотахофореза не ухудшается при повышении нагрузки, что является важным преимуществом метода.

Если проба содержит несколько видов ионов с различными подвижностями, то они будут располагаться между замыкающими и ведущими ионами в порядке убывания их подвижностей в виде непосредственно контактирующих

дискретных зон, состоящих из ионов только одного вида. После достижения равновесия и разделения изотахофоретически мигрирующих ионов в системе образуется градиент напряженности поля, рН, температуры (рис. 29, б, в).

Если в систему ввести значительное количество дополнительных ионов, обладающих подвижностями, промежуточными между подвижностями ионов пробы, то такие ионы займут место между ионами пробы, «раздвинув» их. Такие добавочно вводимые в систему ионы называют с п е й с е р н ы м и, раздвигающими, или разделяющими. Если подобрать соответствующую концентрацию и подвижность таких ионов, то ионы пробы будут отстоять друг от друга, разграниченные разделяющими ионами (занимающими ввиду их большой концентрации значительное пространство). Разделяющие ионы по химической природе должны отличаться от ионов пробы. В качестве разделяющих ионов чаще всего используются амфолины.

Некоторые виды ионов пробы могут иметь подвижность меньшую, чем подвижность замыкающих ионов. Такие ионы называют т р а й л е р н ы м и, или «хвостовыми». Они движутся за передним фронтом замыкающих ионов в зоне с постоянными значениями рН, напряженности электрического поля и в изотахофоретическом процессе не участвуют; их разделение происходит, как в обычном зональном электрофорезе.

Примером изотахофореза биополимеров являются процессы, происходящие в верхнем слое полиакриламидного геля при диск-электрофорезе и приводящие к концентрированию ионов пробы, которые затем разделяются в нижнем слое мелкопористого геля по принципу зонального электрофореза.

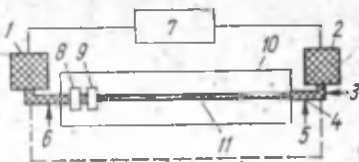
Аналитический изотахофорез в капиллярах. Метод используют для анализа низкомолекулярных ионов: металлов, аминокислот, метаболитов, нуклеотидов, но может быть применим для анализа белков и пептидов.

Для анализа служит прибор Tachophor, выпускаемый фирмой «ЛКВ» (Швеция). Прибор имеет капилляр из стекла или тефлона с внутренним диаметром 0,4—0,6 мм и длиной 10—100 см, анализ ведут при напряжении до 30 кВ и силе тока до 300 мкА (рис. 30). Пробу вводят в капилляр специальным микрошприцом вместимостью от 0,1 до 50 мкл. Процесс разделения занимает 10—40 мин. Зоны разделившихся веществ локализуют с помощью скользящего вдоль капилляра в процессе опыта ультрафиолетового или температурного детектора.

В качестве разделяющих ионов используют соответст-

Рис. 30. Схема прибора Tachophor для изотахофореза в капиллярах:

1 — ведущий электролит; 2 — замыкающий электролит; 3 — ввод пробы; 4 — клапан; 5 — элюционные отверстия; 6 — противоток; 7 — источник постоянного тока; 8, 9 — температурный и УФ-детекторы; 10 — термостатированная ячейка; 11 — капилляр.



вующие амфолины, а также β -аланин, γ -аминоасляную кислоту, валин и другие вещества. Для разделения ионов, подвижности которых в воде близки, используют неводные растворители. Например, подвижности ионов K^+ и NH_4^+ в воде почти идентичны, но в метаноле различаются на 10%.

Аналитический изотахофорез дает возможность разделять и исследовать несколько наномоль вещества. Вызывает интерес использование этого метода для анализа аминокислот и белков. Важным может оказаться применение его в клинических условиях. Так, с помощью аналитического изотахофореза обнаружены различия в составе цереброспинальной жидкости здоровых людей и жидкости, взятой от больных хроническим менингоэнцефалитом и множественным склерозом.

Изотахофорез в полиакриламидном геле. Метод применяется в препаративных целях. Чаще всего с помощью изотахофореза разделяют несколько десятков миллиграммов белкового препарата. Есть пример препаративного разделения 5 г гемоглобинов.

Теоретически возможно изотахофоретическое разделение биополимеров в полиакриламидном геле при pH от 2,5 до 11 и температуре 0—25°C в различных буферных системах.

Для изотахофореза выбирают такую концентрацию геля, при которой отсутствует эффект молекулярного сита. Однако концентрация геля не должна быть очень низкой, иначе разделение ухудшится из-за диффузии низкомолекулярных компонентов.

Необходимо выбирать такие буферные системы, чтобы компоненты пробы имели подвижность не ниже подвижности замыкающего иона. Положение электрофоретического фронта обычно определяют по положению окрашенного низкомолекулярного маркера — метиленового синего, метиленового зеленого, бромфенолового синего и др., по изменению pH геля; по границе, преломляющей свет, а также с помощью атомно-адсорбционной спектроскопии.

Пока полиакриламидный гель является единственной стабилизирующей средой, в которой можно получить четкое изотахофоретическое разделение проб белковой приро-

ды. Гели агара, агарозы и сефадексов непригодны из-за большой величины электроосмоса.

Для предотвращения комплексообразования белков или пептидов в гель добавляют мочевины, неионные детергенты: твин, тритон X-100 и др. В гель можно вводить любые неионные добавки, лиганды, субстраты, кофакторы и пр.

Обычно препаративный изотахофорез проводят в приборах для диск-электрофореза или изоэлектрофокусирования в геле — чаще всего в приборах Uniphor (фирмы «ЛКВ», Швеция), лучше других приспособленных к особенностям изотахофоретического разделения и оснащенных пластмассовыми колонками, к которым гель практически не прилипает. Использование стеклянных колонок нежелательно, так как из-за прочного прилипания геля, иногда происходящего при изотахофорезе, может исказиться поверхность геля и ухудшиться разделение.

Продолжительность эксперимента должна быть достаточной для достижения в системе изотахофоретического равновесия, т. е. установления одинаковой скорости движения всех разделяемых фракций. Поэтому иногда необходимо использовать гели до 15—20 см длиной, так как в более коротких гелях фракции достигают их нижнего края до наступления равновесия. Обычно время разделения не превышает 1 ч в аналитических опытах и 20—30 ч — в препаративных.

Белковые фракции, разделяемые в аналитических опытах в гелях, локализуют окрашиванием по методикам, аналогичным для изоэлектрофокусирования в геле.

Рекомендуют вводить в разделяемую смесь окрашенный маркер со свойствами, близкими к разделяемым компонентам (гемоглобин, цитохром) или метить разделяемые компоненты флуоресцирующими агентами — флуорескамином, *o*-фталевым альдегидом. Введение флуоресцирующей метки дает возможность легко следить за ходом разделения и повышает чувствительность метода. Однако связывание заряженной флуоресцирующей метки с белком может менять его физико-химические свойства, подавлять активность ферментов, изменять его изоэлектрическую точку, что затрудняет интерпретацию полученных результатов.

Примеры использования методов электрофореза в биохимической практике

Разделение и количественное определение белков методом электрофореза на бумаге. Методом можно разделять белки сыворотки крови на альбумины, α -, β - и γ -глобулины.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, 10 мг в 1 мл воды.
2. Биуретовый реактив: 1,5 г CuSO_4 и 6 г сегнетовой соли растворяют в 500 мл воды, добавляют при постоянном помешивании 300 мл 10%-го раствора NaOH (для приготовления используют 65—75%-й раствор NaOH , свободный от CO_2), раствор доводят водой до 1 л, перемешивают и хранят в темной парафинированной или полиэтиленовой склянке.
3. Вероналовый буферный раствор, $\text{pH}=8,6$: в 500 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 1 л последовательно отмеряют точно взвешенные на аналитических весах 40,320 г медиала и 1,840 г веронала, доводят водой до 1 л, перемешивают.
4. Краситель для проявления белков: 100 мг бромфенолового синего, 50 мл ледяной уксусной кислоты и 50 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1 л воды.
5. Уксусная кислота, 2%-й раствор.
6. Ацетат натрия, приготовленный на 10%-м растворе уксусной кислоты, 2%-й раствор.
7. NaOH , 0,01 н. раствор.

Ход определения. Электродные кюветы камеры прибора для электрофореза заполняют вероналовым буферным раствором точно до одинакового уровня. Из хроматографической бумаги вырезают полосы размером 42×4 см, отмечают простым мягким карандашом линию, на которую будет нанесена сыворотка, и вставляют полосы в раму. Раму помещают внутрь камеры, заправляя концы бумажных полос во внутренние отделения электродных кювет. Камеру закрывают крышкой и дают бумаге пропитаться буферным раствором.

Перед проведением электрофореза в сыворотке крови или любой биологической жидкости определяют общее содержание белка с помощью биуретового реактива, который дает возможность определить от 1 до 10 мг белка в пробе.

Для определения содержания белка используют калибровочный график, построенный по стандартным растворам альбумина или казеина согласно следующей схеме:

Номер пробы	Количество белка, мг	Объем раствора белка, мл	Объем дистиллированной воды, мл
1	—	—	2,0
2	2,0	0,2	1,8
3	4,0	0,4	1,6
4	8,0	0,8	1,2
5	12,0	1,2	0,8
6	16,0	1,6	0,4
7	20,0	2,0	—

Примечание. Пробу № 1 готовят в двойном объеме.

Содержание белка в пробе должно быть не более 20 мг в 1 мл, поэтому сыворотку крови разбавляют дистиллированной водой в десять раз. Для определения белка пробы 1 и 1,5 мл доводят водой до 2 мл. Затем к каждой опытной пробе и к пробам стандартного ряда добавляют по 8 мл биуретового реактива. Окраска развивается при комнатной температуре в течение 30 мин. Пробы колориметрируют на фотоэлектроколориметре в кювете шириной 10 мм с зеленым светофильтром. Измерения проводят против пробы № 1, содержащей те же компоненты за исключением белка. На основании полученных данных строят график, откладывая по оси ординат величину оптической плотности, а по оси абсцисс — количество белка, соответствующее этой величине. Измерив величину оптической плотности опытных проб и пользуясь калибровочным графиком, определяют содержание белка в исследуемой пробе в миллиграмм-процентах.

Для нанесения пробы на бумагу на край покровного стекла отмеривают 2 мг белка. Стекло поворачивают каплей вниз, прикладывают под острым углом к поверхности бумаги, затем включают ток и устанавливают необходимое напряжение. При напряжении 240 В (градиент потенциала 5—5,5 В) проводят электрофорез белков сыворотки в течение 18—20 ч, при напряжении 360 В — 6—8 ч. При этом, чтобы не допускать перегрева и чрезмерного испарения, сила тока не должна превышать 0,1—0,3 мА на 1 см поперечного разреза бумажной полосы. Электрофорез проводят при комнатной температуре.

По окончании электрофореза выключают ток и извлекают раму из прибора. Слегка подсушив электрофореграммы под тягой, отделяют их от рамы и переносят в сушильный шкаф на 15—20 мин, где при температуре 110—120°C происходит фиксация белка на бумаге. Высушенные полосы бумаги помещают в эмалированную кювету, заливают красителем и оставляют на ночь. Затем краситель сливают в склянку. (Его можно использовать неоднократно!). Бумагу отмывают 2%-м раствором уксусной кислоты 2 раза по 5 мин и 1 раз 10 мин. Закрепляют фореграммы в течение 2 мин, обрабатывая 2%-м раствором ацетата натрия, и сушат под тягой.

Методом электрофореза на бумаге получают в среднем 4—5 фракций белков: альбумины, α -, β - и γ -глобулины. Иногда α -глобулины дают α_1 - и α_2 -фракции, β -глобулины — β_1 и β_2 -фракции.

Электрофореграммы, на которых проявились пятна белков, разрезают на полоски одинаковой ширины (примерно

5 мм) и помещают каждую полоску в отдельную пробирку с 3 мл 0,01 н. раствора едкого натра. Элюция проводится в течение 1 ч. Для каждого элюата находят величину оптической плотности на фотоэлектроколориметре. Измерения проводят относительно контрольного элюата (лучше взять двойной объем), для чего вырезают на свободном от белковых фракций участке электрофореграммы «слепую пробу» такой же площади.

На основании полученных данных строят кривую распределения окраски на фореграмме. На оси абсцисс откладывают значения, соответствующие номерам проб в порядке их расположения на электрофореграмме, на оси ординат — соотношения белковых фракций в сыворотке крови. Кривую делят по минимумам на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Площадь каждого участка пропорциональна количеству окраски, соединяющейся с белком данной фракции. Соотношение между площадями вычисляют по массе, принимая, что масса участков бумаги пропорциональна их площади, а вся площадь составляет 100%.

Можно элюировать отдельные фракции и рассчитывать процентное соотношение в них белков. Для идентификации электрофореграмм можно использовать денситометр.

Разделение белков сыворотки крови методом диск-электрофореза. Сочетание эффектов концентрирования и молекулярного сита обуславливает высокую разрешающую способность и чувствительность метода. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле в сыворотке крови обнаруживают до 30 фракций.

Реактивы (готовятся на дважды дистиллированной воде!):

1. Раствор А: 7,32 г ТРИС, 9,6 мл 1 н. раствора HCl, 0,044 мл ТЕМЕД, воды до 20 мл; рН=8,9.
2. Раствор Б: 6,72 г акриламида, 179,2 мг метилен-бис-акриламида, воды до 28 мл.
3. Раствор В: персульфат аммония, 28 мг в 20 мл воды, готовится в день опыта.
4. Раствор Г: 598 мг ТРИС, 4,8 мл 1 н. раствора HCl, 0,046 мл ТЕМЕД, воды до 10 мл; рН=6,7.
5. Раствор Д: 1 г акриламида, 250 мг метилен-бис-акриламида, воды до 10 мл.
6. Рибофлавин, раствор 4 мг в 100 мл воды.
7. Сахароза, 40%-й раствор.
8. Электродный буферный раствор: 6 г ТРИС, 28,8 г глицина, воды до 100 мл; рН=8,3. Перед употреблением разбавляют в 10 раз.
9. Бромфеноловый синий, 0,001%-й водный профильтрованный раствор.
10. Уксусная кислота, 7%-й раствор.

11. Уксусная кислота, 2%-й раствор.

12. Амидочерный 10 Б, 1%-й раствор, приготовленный на 7%-м растворе уксусной кислоты.

Ход работы. Чистые и сухие трубки укрепляют строго вертикально в специальном штативе, например в штативе аппарата фирмы «Reanal» (производства ВНР). При использовании самодельных штативов трубки сначала заклеивают с нижнего конца лейкопластырем, опускают на несколько секунд в расплавленный парафин, а затем помещают в штатив. Готовят рабочий раствор для разделяющего геля из растворов А, Б, В и воды в соотношении 1 : 2 : 4 : 1. Смесь осторожно перемешивают стеклянной палочкой и быстро разливают с таким расчетом, чтобы до верхнего конца каждой трубки оставалось 15 мм (в этом месте лучше сделать метку). *Время между приготовлением и заливкой смеси не должно превышать 5 мин!* На поверхность смеси осторожно настилают воду. Это необходимо для того, чтобы поверхность геля получилась ровной: вода уменьшает силу сцепления между раствором геля и стеклом, которая приводит к образованию мениска. Полимеризация геля проходит за 30 мин при комнатной температуре. По окончании полимеризации образуется резкая граница между гелем и верхним слоем жидкости. Жидкость удаляют фильтровальной бумагой, в каждую трубку вносят по 0,15 мл рабочего раствора для концентрирующего геля и настилают воду. Рабочий раствор для концентрирующего геля готовят из растворов Г, Д, рибофлавина и сахарозы в соотношении 1 : 2 : 1 : 4. Гель облучают в течение 20 мин флуоресцентной лампой дневного света или ультрафиолетовой лампой на расстоянии 2—3 см, концентрирующий гель становится молочно-белым. С поверхности геля удаляют слой воды, трубки освобождают от лейкопластыря и укрепляют в катодном сосуде.

Раствор веществ, подлежащих разделению, должен быть приготовлен в том же буферном растворе и иметь то же значение рН и ту же ионную силу, что и раствор концентрирующего геля. Биологические жидкости разбавляют раствором концентрирующего геля так, чтобы общий объем составлял приблизительно 0,15 мл. При исследовании сыворотки крови смешивают 3 мкл сыворотки (содержание белка около 200 мкг) с 0,15 мл раствора концентрирующего геля или с сефадексом Г-200 (1 : 1). Полученный раствор переносят в трубку на поверхность концентрирующего геля. Конец трубки осторожно заполняют электродным буферным раствором.

Электрофорез рекомендуют проводить при температуре

+4°C. Электродные сосуды заполняют предварительно охлажденным до +4°C электродным буферным раствором, следя за тем, чтобы на краях трубок не появились пузырьки воздуха. В верхний буферный раствор добавляют краситель — бромфеноловый синий из расчета 1 мл 0,001%-го раствора на 500 мл раствора. Катодный сосуд опускают в анодный на такое расстояние, чтобы трубки были погружены в буферный раствор анодного сосуда на 4 см. После заполнения электродных сосудов электроды присоединяют к источнику постоянного тока и в первые 2 мин устанавливают ток 1 мА на трубку. Затем проводят электрофорез при токе 4 мА на трубку до тех пор, пока полоса красителя не будет отступать от нижнего края трубок на 3 мм. После окончания электрофореза электродные буферные растворы выливают из сосудов. Их можно употреблять при следующих электрофорезах, но нельзя смешивать друг с другом или менять местами.

Чтобы не допустить расширения белковых зон из-за диффузии, гель после электрофореза немедленно удаляют из трубок и фиксируют 7%-м раствором уксусной кислоты. Извлекают столбик геля шприцом, заполненным 7%-м раствором уксусной кислоты. Осторожно вводят конец инъекционной иглы между стенкой трубки и гелем. Медленно продвигают иглу примерно до середины геля так, чтобы она двигалась по спирали вдоль внутренней стенки трубки. Затем вводят глицерин, который способствует отделению геля от стенок и выталкиванию его из трубок. Гель переносят в пробирку с раствором амидочерного 10 Б на 30 мин. Отмывают гель от избытка красителя 2%-м раствором уксусной кислоты. Хранят гель в 7%-м растворе уксусной кислоты.

Электрофорез в полиакриламидном геле проводят с использованием только разделяющего геля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Біологічна хімія* / Р. П. Виноградова, М. Є. Кучеренко, А. Р. Литвиненко та ін. — К.: Вища школа, 1977.—384 с.
- Грбар П., Буртен П.* Иммуноэлектрофоретический анализ. — М.: Изд-во иностр. лит., 1963.—206 с.
- Ларский Э. Г.* Методы зонального электрофореза. — М.: Медицина, 1971.—112 с.
- Маурер Г.* Диск-электрофорез. — М.: Мир, 1971.—248 с.
- Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. — М.: Наука, 1981.—286 с.
- Пушкина Н. Н.* Биохимические методы исследования. — М.: Медгиз, 1963.—395 с.
- Сопін Є. Ф., Виноградова Р. П.* Основи біохімічних методів дослідження. — К.: Вища школа, 1975.—244 с.

Стронгин А. Я., Левин Е. Д., Степанов В. М. Изотахофорез как метод разделения биополимеров. — Биоорганическая химия, 1976, т. 2, № 7, с. 869—884.

Троицкий Г. В. Электрофорез белков. — Харьков: Изд-во ХГУ, 1962.— 322 с.

Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров / Под ред. Г. В. Самсонова. — М.; Л.: Наука, 1966.—342 с. Фрайфелдер Д. Физическая химия. — М.: Мир, 1980.—582 с.

Глава III. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

§ 16. МЕТОД ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

Метод потенциометрического титрования — объемно-электрохимический метод, заключающийся в том, что точку эквивалентности при титровании определяют по резкому изменению потенциала индикаторного электрода. Так, если металлическую пластинку, например из цинка, опустить в чистую воду, то под влиянием полярных молекул воды ионы цинка отрываются от кристаллической решетки металла и переходят в раствор. В результате потери ионов металлическая пластинка приобретает отрицательный заряд, а прилегающий к ней слой воды заряжается положительно за счет катионов, удерживаемых отрицательным зарядом металла. На границе между металлом и раствором образуется двойной электрический слой, характеризующийся определенным скачком потенциала, который называется *э л е к т р о д н ы м*.

При погружении металлической пластинки в раствор солей, содержащий ионы того же металла, что и пластинка, между твердой и жидкой фазой устанавливается динамическое равновесие: $Me^0 \rightleftharpoons Me^{n+} + ne$.

Величина электродного потенциала при установившемся равновесии называется *равновесным электродным потенциалом* и определяется согласно уравнению Нернста:

$$\varphi = \varphi_0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln c_{Me}$$

где φ — потенциал металлического электрода при данной концентрации ионов металла в растворе; φ_0 — потенциал этого же электрода в растворе с концентрацией ионов, равной единице (нормальный потенциал); c_{Me} — концентрация ионов металла, или его активность ($a_{Me} = \gamma c_{Me}$, где γ — коэффициент активности); R — газовая постоянная; T — абсолютная температура; F — число Фарадея; n — заряд ионов металла. При температуре 25°C и соответствующим

щих значениях R и T , а также учитывая коэффициент перехода от натуральных к десятичным логарифмам, уравнение Нернста примет вид:

$$\varphi = \varphi_0 + 0,058/n \cdot \lg c_{Me}.$$

Для потенциометрического титрования составляют замкнутую цепь из индикаторного электрода, погруженного в исследуемый раствор, и электрода сравнения. В процессе потенциометрического титрования в зависимости от концентрации (активности) ионов в растворе происходит изменение равновесного потенциала индикаторного электрода относительно данного катиона или аниона. Величину потенциала индикаторного электрода определяют по отношению к неполяризуемому электроду, потенциал которого не изменяется в процессе титрования и служит для сравнения с потенциалом индикаторного электрода. Такие электроды называются электродами сравнения, или стандартными.

Во время титрования после добавления каждой порции реактива измеряют величину э. д. с. замкнутой цепи. В начале титрования потенциал индикаторного электрода изменяется медленно, а вблизи точки эквивалентности — скачкообразно. Графически потенциометрическое титрование изображают кривой, которая образуется, если на оси абсцисс откладывать количество миллилитров раствора, которым титруют, а на оси ординат — разность потенциалов между индикаторным электродом и электродом сравнения (рис. 31).

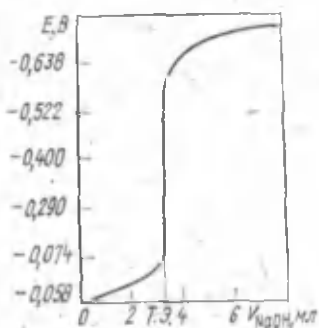


Рис. 31. Кривая потенциометрического титрования соляной кислоты щелочью:
т. экв. — точка эквивалентности.

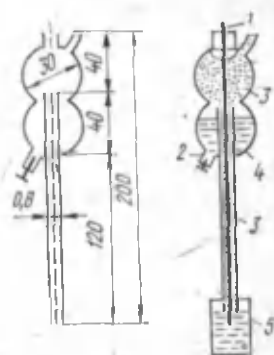


Рис. 22. Схема сосуда комбинированной конструкции ВИМС:
1 — капилляр; 2 — платиновый контакт; 3 — часть сосуда, заполненная агаром; 4 — ртуть; 5 — стакан с исследуемым раствором.

Для каждой реакции подбирают соответствующий индикаторный электрод, который дает самые точные результаты. Подбор электродов зависит от условий титрования, наличия окислителей и восстановителей, интервала изменений рН от времени титрования и др. При окислительно-восстановительных реакциях в качестве индикаторных электродов чаще всего используют платиновые и золотые, а при реакциях нейтрализации — электроды, потенциал которых зависит от величины рН (например, водородный, стеклянный, хингидронный). В электрохимических методах исследований в качестве стандартных наиболее широко используется каломельный, хингидронный и хлорсеребряный электроды.

Стандартные электроды слабо поляризуемы и должны иметь неизменный потенциал в процессе титрования, следовательно, изменение электродвижущей силы электродной пары будет зависеть только от потенциала индикаторного электрода. Кроме того, потенциалопределяющая электродная реакция должна быть термодинамически обратимой, а концентрация ионов, характеризующая электродный процесс, — постоянной.

Каломельный электрод. Наиболее широко применяется в качестве стандартного электрода в потенциометрии, полярографии, амперометрии и других электрохимических методах. Каломельный электрод обладает высокой степенью обратимости и воспроизводимости. Потенциал электрода определяется системой $\text{Hg}_2^{2+}|\text{Hg}^0$ или $\text{Hg}^0|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{KCl}$, а электродная реакция



В практике применяются три разновидности каломельного электрода: насыщенный, нормальный и децинормальный, а их потенциалы, измеренные в паре с нормальным водородным электродом при температуре 18°C, соответственно равны 0,250, 0,337 и 0,235 В. Для работы можно использовать каломельный электрод промышленного производства или приготовить в лабораторных условиях.

Сосуд для каломельного электрода может быть различной формы, однако лучше всего использовать сосуд комбинированной конструкции ВИМС (рис. 32).

Приготовление электрода начинают с амальгирования контакта выносного анода. Для этого в сосуд наливают раствор соли $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, подкисленный азотной кислотой (несколько капель HNO_3 на 100 мл раствора). В раствор погружают платиновую проволоку, присоединяя один конец

ее к полюсу «+» аккумулятора напряжения 6 В. Платиновый контакт сосуда присоединяют к полюсу «-». Электроды проводят в течение 3—5 мин.

Моют и высушивают сосуд на воздухе при комнатной температуре. Приготавливают насыщенный на холоде раствор хлорида калия (марки х. ч.), а также каломельную пасту, для чего в фарфоровой ступке растирают каломель с небольшим количеством ртути и сухого хлорида калия до образования однородной серой массы, которую промывают несколько раз холодным насыщенным раствором хлорида калия.

Приготавливают смесь растертого в ступке сухого хлорида калия с небольшим количеством насыщенного раствора хлорида калия.

Каломельный электрод приготавливают так: наливают в сосуд ртуть так, чтобы она покрыла платиновый контакт (3—5 мм), закрепляют сосуд в вертикальном положении на штативе. В сосуд помещают слой каломельной пасты (3—5 мм), покрывая ею слой ртути, а затем сверху насливают смесь, приготовленную из сухого хлорида калия и насыщенного раствора хлорида калия. Трубку заполняют 3%-м раствором агара в насыщенном растворе хлорида калия, а сверху наливают насыщенный раствор хлорида калия. Отверстие трубки закрывают тампоном из фильтровальной бумаги.

Приготовленный каломельный электрод должен «состариться» в течение 24 ч. В процессе работы каломельный электрод предохраняют от встряхивания и действия высоких температур.

Очистка ртути и меры предосторожности при работе с ней. При приготовлении каломельного электрода и в полярографическом анализе применяется очень чистая ртуть.

Ртуть, загрязненную органическими веществами, а также механическими примесями, тщательно фильтруют через стеклянный или бумажный фильтр, в котором иглой прокалывают несколько отверстий.

Ртуть, загрязненную жирами, встряхивают в делительной воронке с 5%-м раствором NaOH для омыления жиров, промывают несколько раз дистиллированной водой и фильтруют через сухой бумажный фильтр с мелкими отверстиями.

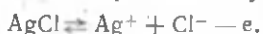
Для очистки ртути от примесей металлов рекомендуется перегонять ее в вакууме или обработать в толстостенной делительной воронке 5%-м раствором нитрата ртути (I) с несколькими каплями 10%-го раствора HNO_3 . Обработку проводят 3—4 раза, затем промывают 5—6 раз

дистиллированной водой и фильтруют через сухой бумажный фильтр.

Пары ртути ядовиты, поэтому все работы с ней нужно проводить в вытяжном шкафу. Пол и столы в лаборатории должны быть покрыты линолеумом, а пролитую на пол ртуть необходимо тщательно собрать медной амальгмированной пластинкой. Для уменьшения испарения пролитой ртути щели в полу следует засыпать порошком серы или обработать 20%-м раствором FeCl_3 .

Хлорсеребряный электрод. Наиболее распространен в потенциометрии и полярографии. Служит стандартным электродом в комплекте со стеклянным и платиновым электродами.

Электродная реакция выражается уравнением:



Хлорсеребряные электроды характеризуются высокой воспроизводимостью и могут применяться в различных средах. Хлорсеребряные электроды выпускаются промышленностью и входят в комплекты многих электрохимических приборов. Готовят электроды путем электролитического осаждения Ag^+ , или AgCl , на серебряную проволоку, которую затем погружают в насыщенный раствор хлорида калия, содержащий небольшое количество хлорида серебра.

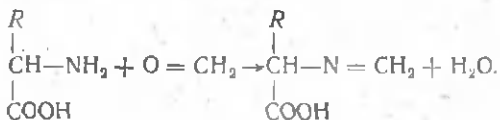
Для потенциометрического титрования служат специальные приборы: рН-метры, потенциометры, титрометры и др. В лабораторных условиях для потенциометрического титрования лучше всего использовать блок автоматического титрования серийного производства БАТ-12-ЛМ.

Потенциометрическим титрованием определяют активность ферментов в реакциях со специфическими веществами — субстратами, а также точку эквивалентности для реакций нейтрализации, осаждения, окислительно-восстановительных, комплексообразования.

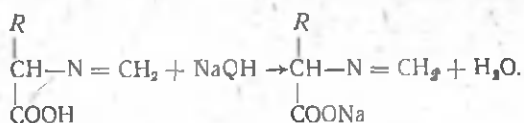
Определение карбоксильных и аминных групп белков

Молекулы белков всегда содержат свободные карбоксильные и аминные группы.

Метод основывается на способности формальдегида связывать свободные аминогруппы с образованием метиленовых производных



После блокирования аминогрупп свободные карбоксильные группы оттитровываются раствором щелочи:



Для определения готовят две пробы: исследуемую и контрольную.

Исследуемая проба. В колбу наливают 0,4 мл сыворотки крови, гомогената ткани или растворы глицина различной концентрации, 10 мл воды и добавляют 2,5 мл формольной смеси (к 6 мл 2%-го раствора формальдегида добавляют 2 капли спиртового раствора фенолфталеина и каплями 0,1 н. раствор NaOH до розового окрашивания жидкости. Смесь приготавливают перед работой).

Контрольная проба. В колбу помещают все добавленные в исследуемую пробу реактивы, кроме сыворотки или гомогената. Затем в колбы с исследуемой и контрольной пробамы добавляют по 1 мл 0,01 н. раствора NaOH и 0,2 мл 0,1 н. раствора NaOH. pH-метром измеряют pH контрольной пробы, а затем исследуемую пробу титруют из микробюретки 0,1 н. раствором NaOH до значения pH контрольной пробы. Титрование проводят 2—3 раза. Для расчёта берут среднее значение.

Содержание свободных карбоксильных групп C_{COOH} (в мг% аминного азота) в исследуемом материале рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{COOH}} = \frac{0,14Af \cdot 100}{0,4},$$

где 0,14 — эквивалент азота; A — объем 0,01 н. раствора NaOH, израсходованный на титрование исследуемой пробы, мл; f — коэффициент поправки на титр 0,01 н. раствора NaOH; 0,4 — количество сыворотки крови или гомогената в пробе, мл; 100 — коэффициент пересчета на 100 мл сыворотки крови.

Потенциметрическое определение pH среды

При биохимических исследованиях часто учитывается реакция среды. Большинство значений pH биологических сред близки к 7.

Концентрация ионов водорода и гидроксильных групп является важным фактором, который регулирует катали-

тическое действие ферментов. Так, оптимальная активность пепсина проявляется при $pH=2$, при $pH=4$ она резко тормозится. Активность амилазы слюны проявляется при $pH=5,75 - 7,05$.

Некоторые заболевания способствуют изменению pH мочи и крови. Например, при сахарном диабете вследствие чрезмерного образования кислот в организме человека повышается кислотность мочи. Заболевание мочевых путей приводит к повышению щелочности мочи.

Как известно, величина pH равна отрицательному значению десятичного логарифма концентрации ионов водорода:

$$pH = -\lg[H^+].$$

Аналогично

$$pK_a = -\lg K_a,$$

где K_a — константа диссоциации кислоты.

Подстановка этих обозначений в уравнение

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

приводит к важной формуле, которая в более общей форме имеет вид:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[\text{соль}]}{[\text{кислота}]}$$

где $[\text{соль}] = [A^-]$, а $[\text{кислота}] = [HA]$.

Данное уравнение известно под названием уравнения Гендерсона — Хассельбалха, оно дает возможность рассчитать величину pK_a для любой кислоты, исходя из молярного отношения донора $[HA]$ и акцептора $[A^-]$ протонов при данном pH , рассчитать величину pH сопряженной кислотно-основной пары при данном pK_a и данном молярном отношении между донором $[HA]$ и акцептором $[A^-]$ протонов, а также молярное отношение донора $[HA]$ и акцептора $[A^-]$ протонов при данных значениях pH и pK_a .

Кислотность или щелочность растворов можно определить колориметрическими методами, универсальным индикатором, по шкале буферных растворов, а также буферным методом (метод Михаэлиса).

Самым точным является метод потенциометрического определения pH среды, который основывается на измерении э. д. с. элемента, состоящего из электрода сравнения

(каломельного, хлорсеребряного, водородного) с известным потенциалом, и измерительного электрода (стеклянного), потенциал которого определяется концентрацией водородных ионов в исследуемом растворе.

Стеклянный электрод — это трубка с напаянным на конус пустотельным шариком диаметром 15—20 мм, который изготавливается из легкоплавкого электродного стекла толщиной несколько микрометров, содержащего катионы лития и натрия для увеличения электропроводности. Внутреннюю часть стеклянного электрода заполняют раствором соляной кислоты определенной концентрации, в который опускают хлорсеребряный или другой электрод сравнения. Схему стеклянного электрода можно записать так:



При погружении стеклянного электрода с неизвестной концентрацией водородных ионов между поверхностью шарика и раствором происходит обмен ионами. На границе раздела стекло — раствор возникает разность потенциалов E , величина которой определяется активностью ионов водорода в растворе:

$$E = RT/F \cdot \text{pH}.$$

Преимущества стеклянного электрода огромны: потенциал его устанавливается быстро и не изменяется при наличии окислителей, восстановителей или токсических веществ; с помощью стеклянного электрода можно исследовать окрашенные и мутные растворы; при использовании стеклянного электрода в исследуемый раствор не добавляются посторонних веществ; благодаря малому диаметру стеклянного электрода для определения можно брать небольшие объемы исследуемого вещества (несколько миллилитров).

К недостаткам стеклянного электрода относятся следующие. Линейная зависимость между потенциалом и pH соблюдается не при всех значениях pH и описывается кривой (рис. 33). В кислых и щелочных средах наиболее точные результаты можно получить при значениях pH от 0 до 12. В сильнощелочной среде, т. е. при pH=12, наблюдается так называемая «щелочная ошибка», которая зависит от сорта используемого стекла, в силь-

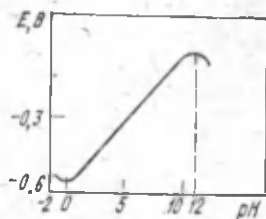


Рис. 33. Зависимость потенциала стеклянного электрода от pH среды.

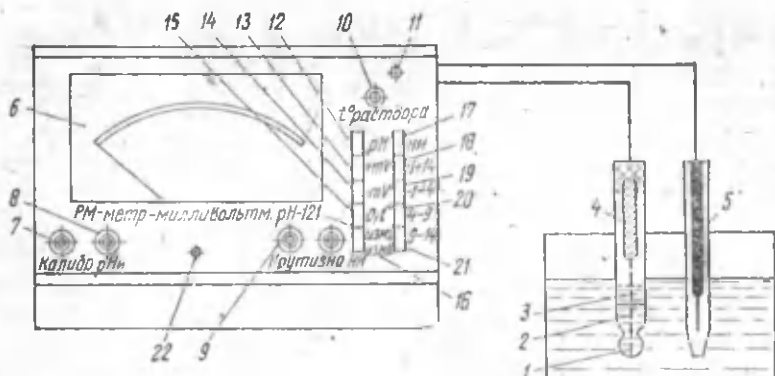


Рис. 34. Общий вид рН-метра — милливольтметра рН-121:

1 — полый шарик из электродного стекла; 2 — стеклянный электрод; 3 — раствор, который заполняет внутреннюю часть электрода; 4 — внутренний контактный электрод; 5 — вспомогательный электрод; 6 — глазок индикатора включения; 7 — ручка резистора R16 — «калибровка»; 8 — ручка резистора R33—рН; 9 — ручка резистора R26 — «крутизна», «mV»; 10 — ручка резистора «температура раствора»; 11—глазок индикации включения; 12 — кнопка «рН»; 13 — кнопка «+mV»; 14 — кнопка «-mV»; 15 — кнопка «0,1»; 16 — кнопка выбора подключения высокоомного гнезда «изм. 1» или «изм. 2»; 17 — кнопка «ни»; 18 — кнопка «-1-14»; 19 — кнопка «-1-4»; 20 — кнопка «-4-9»; 21 — корректор «-9-14»; 22 — «корректор нуля».

нокислой среде (при $\text{pH}=0$) наблюдается «кислая ошибка».

Потенциал стеклянного электрода зависит также от состояния его внутренней и внешней поверхности. Так, потеря щелочи при тепловой обработке и в процессе изготовления электрода, длительное обезвоживание поверхностного слоя вследствие высушивания, механическое разрушение поверхностного слоя либо химическое воздействие щелочей или фтороводорода приводит к возникновению потенциала асимметрии стеклянного электрода. Потенциал асимметрии должен быть постоянным для данного электрода. Его можно измерить, если рН растворов по обе стороны мембраны будет иметь одинаковые значения. При высыхании электрода потенциал асимметрии изменяется.

Для определения рН растворов в лабораторных условиях промышленностью выпускаются рН-метр ЛПУ-01, рН-метр — милливольтметр ЛПМ-60М, рН-метр — милливольтметр рН-340 и рН-121. Общий вид рН-метра — милливольтметра рН-121 показан на рис. 34. Прибор предназначен для определения величины рН, рNa, рAg, рK, рNH₄ и окислительно-восстановительных потенциалов, а также использования в качестве высокоомного нуля-индикатора и милливольтметра. При работе с блоками автоматического титрования прибор может быть использован для

массового однотипного титрования. Пределы измерения величины рН — от —1 до 14.

Лабораторный рН-метр — милливольтметр рН-121 состоит из электродной системы (стеклянного и хлорсеребряного электродов); блока преобразователя, предназначенного для преобразования постоянного напряжения, поступающего на вход усилителя, в пропорциональное ему переменное напряжение; блока генератора управляющих импульсов, предназначенного для питания светодиода модулятора и демодулятора; блока усилителя переменного напряжения, обеспечивающего требуемое усиление сигнала; фазового детектора, осуществляющего преобразование усиленного переменного напряжения в напряжение постоянного тока, и усилителя мощности.

Электродная система имеет большое внутреннее сопротивление, достигающее 1000 МОм.

Для измерения э. д. с. электродной системы применяется компенсационная схема, которая значительно уменьшает ток, потребляемый при измерении.

Рассмотрим принципиальную схему рН-метра — милливольтметра рН-121 (рис. 35).

Электродвижущая сила E_x электродной системы сравнивается с падением напряжения на сопротивлении R , через которое протекает ток выходного усилителя $I_{\text{вых}}$. Выходное напряжение $U_{\text{вых}}$ на сопротивлении R противоположно по направлению электродвижущей силе E_x . При этом на выход усилителя подается напряжение $U_{\text{вх}}$.

$$U_{\text{вх}} = E_x - U_{\text{вых}} = E_x - I_{\text{вых}}R.$$

Напряжение $U_{\text{вх}}$ преобразуется в переменное, которое затем многократно усиливается и с помощью демодулятора вновь преобразуется в постоянное. Это напряжение управляет током $I_{\text{вых}}$ выходного каскада усилителя. При достаточно большом коэффициенте усиления напряжения $U_{\text{вых}}$ мало отличается от E_x и благодаря этому ток, протекающий через электроды в процессе измерения э. д. с., весьма мал. Ток $I_{\text{вых}}$, протекающий через сопротивление R , пропорционален э. д. с. электродной системы, т. е. рН контролируемого раствора.

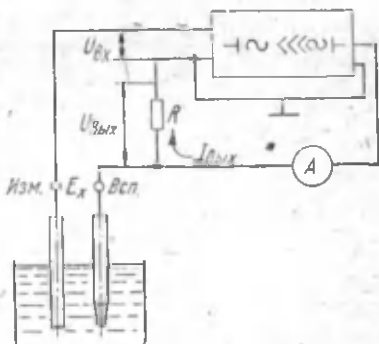


Рис. 35. Принципиальная схема рН-метра — милливольтметра рН-121.

Перед началом работы прибор необходимо подготовить согласно инструкции, а электроды погрузить в стакан с 0,1 н. раствором HCl на 4 ч. Прибор включают в электрическую сеть напряжением 220 В и прогревают 15—20 мин.

Перед определением рН необходимо стандартизировать шкалу рН по следующим буферным растворам (значения рН для этих растворов определены при 20°C):

Буферный раствор	рН
0,05 М раствор оксалата калия	1,68
Насыщенный при 25°C раствор гидротартрата калия	3,56
0,05 М раствор гидрофталата калия	4,00
0,025 М раствор дигидрофосфата калия и 0,025 М раствор гидрофосфата натрия	6,88
0,01 М раствор тетрабората натрия	9,22

Кроме стандартных буферных растворов, можно применять 0,1 н. раствор соляной кислоты, приготовленный из фиксанала. Для 0,1 н. раствора соляной кислоты от 0 до 50°C $pH=1,1$. Шкалу рН потенциометра стандартизируют по стандартным буферным растворам, включая все диапазоны измерений: —1 — +14 единиц рН; —1 — +4; 4—9; 9—14.

В первые дни работы с прибором и новым стеклянным электродом прибор необходимо контролировать по буферным растворам 1—2 раза в день, поскольку характеристики стеклянного электрода могут изменяться (до $pH=0,2$). В дальнейшем прибор можно проверять раз в неделю, применяя буферный раствор, величина рН которого лежит в том самом диапазоне измерений, что и рН контрольных растворов.

Перед каждым погружением электродов в исследуемый раствор, особенно при измерении рН растворов с малой буферной емкостью, электроды необходимо тщательно промыть дистиллированной водой, а остатки воды снять фильтровальной бумагой.

При изменении рН растворов, температура которых отличается от комнатной, необходимо применять автоматическую температурную компенсацию или при каждом измерении устанавливать ручной корректор на температуру исследуемого раствора. Отсчет рН по шкале прибора следует начинать после установления стрелки для буферных растворов — через 1,0—1,5 мин, а для растворов с малой буферной емкостью — через 2—3 минуты. Первое предварительное измерение проводят в диапазоне —1 — +14, за-

тем в более узком диапазоне снимают более точные показания прибора.

После каждого измерения рН раствора электроды прибора нужно тщательно промывать, погружая их в стакан с дистиллированной водой, которую меняют 4—5 раз.

Нельзя допускать высыхания стеклянного электрода. Продолжительное пребывание электрода в концентрированных кислотах или щелочах изменяет его характеристики.

После окончания работы электроды промывают и опускают в воду.

Буферные растворы, буферная емкость и ее определение потенциометрическим методом

Растворы, сохраняющие определенную концентрацию ионов водорода при добавлении к ним кислот, щелочей или при разбавлении, называют б у ф е р н ы м и. Обычно буферное действие оказывают водные растворы слабых кислот и их солей или слабых оснований и их солей. Сильные кислоты и основания в воде диссоциируют практически полностью и не содержат резервного количества недиссоциированных молекул.

Сохранение постоянства рН имеет большое значение для протекания всех биохимических процессов. Изменение рН среды резко влияет на интенсивность обмена веществ в живых организмах. Из всех систем в организме, обладающих буферными свойствами, наиболее важными являются фосфатная, гидрокарбонатная и белковая.

Рассмотрим механизм действия буферной системы на примере водного раствора уксусной кислоты и ее соли CH_3COONa . Ацетат натрия — сильный электролит, который практически полностью диссоциирует:

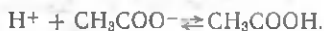


Уксусная кислота — слабая, в растворе диссоциирует мало:



При наличии хорошо диссоциированной соли, благодаря большой концентрации ионов CH_3COO^- , диссоциация кислоты угнетается и становится еще меньшей. Поэтому практически уксусная кислота в таком растворе находится почти полностью в молекулярной форме. Итак, все ионы CH_3COO^- в растворе образовались вследствие диссоциации ацетата натрия. Если к такому раствору добавить сильную кислоту (например, соляную), свободные ионы водо-

рода этой кислоты свяжутся с ионами CH_3COO^- с образованием недиссоциированной молекулы:

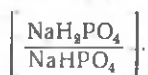


Равновесие этой реакции сильно смещено вправо. Итак, при добавлении сильной кислоты концентрация ионов водорода в растворе (а значит и величина рН) практически не изменится.

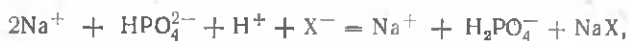
Если к этому буферному раствору добавить гидроксид натрия (сильное основание), ионы OH^- будут связываться с ионами H^+ , образуя воду, а уксусная кислота при этом будет диссоциировать, и концентрация ионов водорода (величина рН) почти не изменится.

Добавление сильной кислоты или щелочи к буферному раствору нарушает соотношение соль : кислота, которое определяет рН этого раствора. Чем больше концентрация компонентов и чем ближе их соотношение к 1, тем меньше изменяется рН буферного раствора.

Фосфатная буферная система представляет собой смесь дигидро- и гидрофосфатов:



Дигидрофосфат обладает свойствами слабой кислоты, а гидрофосфат — слабой щелочи. При добавлении кислот гидрофосфат реагирует с ними, вследствие чего образуется дигидрофосфат, который выделяется с мочой. Кислая реакция мочи в основном обусловлена кислыми фосфатами:



где X^- — анион кислоты.

При добавлении щелочей с ними реагирует дигидрофосфат, вследствие чего образуется гидрофосфат:



Гидрокарбонатная буферная система имеет большое значение для поддержания постоянства рН крови. Эта система образуется угольной кислотой и гидрокарбонатами калия или натрия, причем содержание гидрокарбонатов приблизительно в 20 раз больше, чем содержание угольной кислоты.

Важную роль в поддержании постоянства рН крови и тканей осуществляет белковая буферная система.

Белки плазмы крови как амфотерные электролиты способны связывать кислоты и щелочи. Однако буферное действие белков плазмы крови по сравнению с гидрокарбонатами и фосфатами невелико.

Количественной характеристикой буферных свойств раствора является буферная емкость, которая определяется количеством грамм-эквивалентов кислоты или щелочи, необходимых для добавления к 1 л (1 мл) буферного раствора, чтобы изменить рН этого раствора на единицу.

Экспериментально определяют буферную емкость так: находят рН буферного раствора, затем в колбу к 10 мл этого раствора добавляют 1 мл 0,1 н. раствора NaOH или HCl и снова определяют рН.

Буферную емкость β рассчитывают по формуле:

$$\beta = \frac{NV_1}{(pH_1 - pH_0)V_0}$$

где V_0 — объем исходного буферного раствора, мл; V_1 — объем добавленной кислоты или щелочи, мл; N — нормальность добавленной кислоты или щелочи; pH_0 — рН исходного буферного раствора; pH_1 — рН буферного раствора после добавления кислоты или щелочи.

Буферная емкость зависит от концентрации буферной системы, а также от соотношения концентраций соли и кислоты. Наибольшая буферная емкость достигается в растворах, в которых концентрация соли равна концентрации слабой кислоты, а также $pH = pK_a$.

В растворах сильных электролитов осмотическое давление и электропроводность не отражают истинной ионной концентрации, если эти растворы не сильно разбавлены. Поэтому наряду с истинной, или аналитической, концентрацией c было введено понятие об эффективной концентрации, или активности a . Активность, которая рассчитывается как $a = \gamma c$ (здесь γ — коэффициент активности), заменяет концентрацию вещества в уравнении закона действия масс. Для бесконечно разбавленных растворов активность электролита равна его аналитической концентрации, а $\gamma = 1$. Для растворов умеренных концентраций $\gamma < 1$ и уменьшается по мере повышения концентрации. Особенно резко выражено это уменьшение в растворах, содержащих многозарядные ионы, у которых сильное межйонное взаимодействие. Однако при очень больших концентрациях некоторых электролитов коэффициент активности вновь начинает возрастать ($\gamma > 1$), что объясняется недостатком молекул воды для гидратации всех ионов.

Межионное взаимодействие имеет место между любыми противоположно заряженными ионами, оно зависит от общей концентрации всех ионов в растворе. В разных смесях коэффициент активности одного и того же иона при одинаковой его концентрации будет иметь разное значение.

Активность иона в разбавленных растворах пропорциональна не молярной концентрации растворов, а их ионной силе. Коэффициент активности ионов связан с ионной силой разбавленного раствора следующим соотношением:

$$\lg \gamma = -0,5Z^2\sqrt{I},$$

из которого следует, что чем больше ионная сила раствора I , тем меньше коэффициент активности его иона. Если ионные силы двух растворов равны, то коэффициенты активности ионов равной валентности в них одинаковы. Зависимость между коэффициентом активности и ионной силой водных растворов хорошо соблюдается примерно до $I=0,02$. При выполнении ряда биохимических исследований рассчитывают ионную силу и готовят растворы с необходимым значением I . Так, при низких ионных силах растворимость белка увеличивается, а при высоких — уменьшается; на этом основан эффект высаливания белка высокими концентрациями солей.

Ионная сила I определяется как полусумма произведений концентрации всех ионов, которые имеются в растворе, на квадраты зарядов:

$$I = \frac{c_1Z_1^2 + c_2Z_2^2 + c_3Z_3^2}{2},$$

или $I = 1/2 \sum cZ^2$.

Приводим несколько примеров расчета ионной силы.

1. Ионная сила 0,045 M раствора KCl

$$I = \frac{0,045 \cdot 1^2 + 0,045 \cdot 1^2}{2} = 0,045.$$

2. Ионная сила 0,0745 M раствора $MgCl_2$

$$I = \frac{0,0745 \cdot 2^2 + 0,0745 \cdot 1^2 + 0,0745 \cdot 1^2}{2} = 0,2235.$$

Ионная сила большинства биологических жидкостей и физиологического раствора равна 0,15.

Определение окислительно-восстановительных потенциалов и расчет стандартных свободных энергий

Биологическое окисление представляет собой совокупность окислительно-восстановительных реакций, протекающих в живых организмах и катализируемых системой окислительно-восстановительных ферментов — оксидоредуктаз. Сущность этих реакций сводится к переносу протонов и электронов по дыхательной цепи от субстратов на молекулярный кислород через ряд промежуточных переносчиков, способных к обратимому окислению и восстановлению.

Для расчета изменений стандартной свободной энергии в окислительно-восстановительных реакциях необходимо определить окислительно-восстановительный потенциал системы, т. е. способность веществ отдавать или принимать электроны.

Окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) — потенциал, который возникает на инертном электроде (золото, платина), погруженном в обратимую окислительно-восстановительную систему.

Схема окислительно-восстановительной системы с платиновым электродом следующая:



Инертный электрод не имеет характерного скачка потенциала. Обратимая окислительно-восстановительная система — система, которая содержит вещество одновременно в окислительной и восстановительной формах, легко переходящих одна в другую.

Окислительно-восстановительный потенциал зависит от природы системы и соотношения окислительных и восстановительных форм.

Для получения шкалы окислительно-восстановительных потенциалов принимают общий стандарт, потенциал которого произвольно равен нулю и относительно которого можно рассчитывать другие потенциалы. Общим стандартом служит водородный электрод ($1/2 \text{H}_2 \rightarrow \text{H}^+ + \text{e}$). Потенциал водородного электрода принимается равным нулю при условии, что газообразный водород под давлением 101,325 Па (1 атм) находится в равновесии с ионами водорода, активность которых равна единице. Разность между окислительно-восстановительным потенциалом любого электрода и водородного E определяют по уравнению:

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

где [Ox] — концентрация окисленной формы; [Red] — концентрация восстановленной формы; n — число перенесенных электронов; E_0 — стандартный окислительно-восстановительный потенциал данной системы (см. ниже).

Поскольку расчет уравнений биологических окислительно-восстановительных пар приводят обычно для двухэлектронных переносов, окислительно-восстановительный потенциал можно выразить уравнением:

$$E = E_0 + 0,0031g \frac{[\text{Ox}]}{[\text{Red}]}$$

Если концентрации окисленных и восстановленных форм будут равны, то $[\text{Ox}]/[\text{Red}] = 1$, $lg 1 = 0$ и $E = E_0$.

В этом случае потенциал системы обозначают E_0 и называют стандартным, или нормальным окислительно-восстановительным потенциалом. Его величина характеризует окислительно-восстановительные свойства системы, определяет ее стремление принимать или отдавать электроны и применяется для сравнения окислительно-восстановительных систем. Системы с более высоким положительным окислительно-восстановительным потенциалом будут окислять системы с более низким потенциалом.

Окислительно-восстановительный потенциал биологических систем характеризует величина E'_0 , которая учитывает значение рН ($E'_0 = E_0 - 0,06 \text{ рН}$).

Потенциал стандартного водородного электрода $E'_0 = -7(-0,06) = -0,42 \text{ В}$, а потенциал пары вода — кислород равен $+0,815 \text{ В}$. В этих пределах заключены окислительно-восстановительные потенциалы всех биологически важных окислительно-восстановительных систем. Процесс биологического окисления сводится к окислению водорода субстрата молекулярным кислородом с образованием воды. Разность потенциалов между водородным и кислородным электродами составляет $1,23 \text{ В}$. Благодаря наличию ряда биологических окислительно-восстановительных систем скачок потенциала при окислении субстратов осуществляется постепенно с относительно небольшим перепадом свободной энергии. Это обеспечивает более полную фиксацию освобождающейся энергии в энергию макроэргических соединений, используемых организмом для различных физиологических функций.

Нормальные редокс-потенциалы окислительно-восстановительных систем большинства субстратов находятся в пределах $-0,62 \text{ В}$, а редокс-потенциал системы $\text{НАД} \times \text{ХН}_2/\text{НАД}$ равен $-0,32 \text{ В}$ (табл. 3). Поэтому атомы (про-

тоны и электроны) водорода от субстратов переносятся на никотинамидные ферменты. Величина редокс-потенциалов флавиновых ферментов значительно выше (от $-0,06$ до $-0,1$ В), и это обуславливает перенос электронов и протонов от никотинамидных ферментов к флавиновым. Повышение редокс-потенциалов от флавиновых ферментов к цитохромам обуславливает перенос электронов к системе, состоящей из электронов, протонов, кислорода и нейтральной молекулы воды ($E'_0 = +0,815$ В) — последнего этапа тканевого дыхания.

Таблица 3. Величины нормальных редокс-потенциалов некоторых компонентов окислительно-восстановительной цепи (при $pH=7$ и $t=38^\circ C$)

Биологическая система	E_0 , В*
Субстраты $\leftrightarrow 2H^+ + 2e$	От 0 до $-0,62$
НАД $\cdot H_2 \leftrightarrow$ НАД $+ 2H^+ + 2e$	$-0,32$
ФФ $\cdot H_2 \leftrightarrow$ ФФ $+ 2H^+ + 2e$	От $-0,06$ до $-0,1$
Цит. <i>b</i> \leftrightarrow Цит. <i>b</i> $+ e$	$-0,04$
Цит. <i>c</i> \leftrightarrow Цит. <i>c</i> $+ e$	$+0,26$
Цит. <i>a</i> \leftrightarrow Цит. <i>a</i> $+ e$	$+0,29$
Цитохромоксидаза \leftrightarrow Цитохромоксидаза $+ e$	$+0,50$
$H_2O \leftrightarrow 1/2 O_2 + 2H^+ + 2e$	$+0,815$

* Редокс-потенциалы отдельных биологических систем выражены через э. д. с. E'_0 .

Окислительно-восстановительный потенциал можно определить потенциометрическим методом с помощью специального устройства (рис. 36). Элемент составлен из электрода сравнения (водородного, каломельного или хлорсеребряного) и инертного электрода (платина, золото), погруженного в исследуемую окислительно-восстановительную систему. Сосуды с электродами связаны между собой солевым мостиком, который обеспечивает миграцию ионов, но не допускает прямой химической реакции между компонентами полуэлектродов. Окислительно - восстановительный

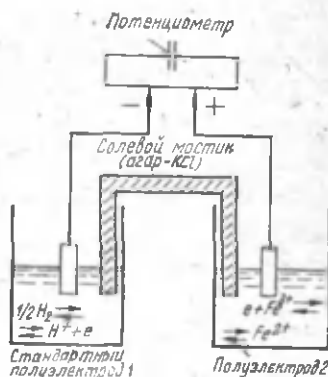


Рис. 36. Схема устройства для определения окислительно-восстановительных потенциалов.

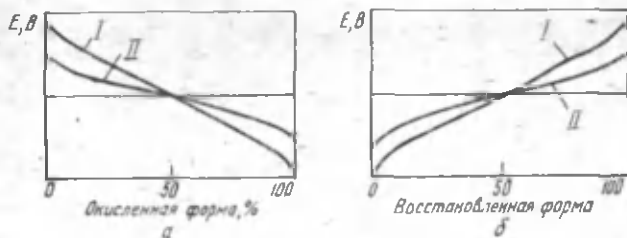


Рис. 37. Зависимость разности потенциалов от степени окисления восстановленной формы (а) и степени восстановления окисленной формы (б):

I — одноэлектронный переход; II — двухэлектронный переход

потенциал исследуемой системы измеряют потенциометром как разность потенциалов между полуэлектродами и выражают в вольтах. Зависимость разности потенциалов от степени окисления восстановленной формы и степени восстановления окислительной формы показана на рис. 37.

В конечной точке окислительно-восстановительного титрования, как правило, наблюдается резкий скачок электродного потенциала.

Определение величины стандартных окислительно-восстановительных потенциалов дает возможность вычислить величину стандартного изменения свободной энергии $\Delta G^{0'}$ для случая, когда реагируют две окислительно-восстановительные пары:

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta E_0'$$

Например, при переносе пары электронов от НАД \times \times H_2 ($E_0' = -32$ В) к молекулярному кислороду ($E_0' = +0,82$ В) по дыхательной цепи $\Delta G^{0'} = 2 \cdot 96,406 \cdot 1,14 = 217,8$ кДж/моль.

§ 17. КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

Кондуктометрический метод анализа основан на измерении электрической проводимости растворов. Электрической проводимостью (проводимостью) раствора называется величина, обратная его сопротивлению. Под проводимостью понимают также способность веществ проводить электрический ток под действием внешнего источника электрического поля.

Проводимость раствора G зависит от концентрации, подвижности ионов и температуры; она обратно пропорцио-

нальна расстоянию между электродами L и прямо пропорциональна площади электродов S :

$$G = k \frac{Scu}{L},$$

где k — константа сосуда.

Единицей измерения проводимости является сименс (См).

Согласно закону Ома

$$I = \frac{E}{R},$$

где I — сила тока, А; E — напряжение, В; R — сопротивление, Ом.

Отсюда проводимость раствора можно представить как величину, обратную его электрическому сопротивлению:

$$G = \frac{1}{R}.$$

Большую проводимость (10^8 См) имеют проводники первого рода (металлы). Проводимость растворов электролитов — проводников второго рода — составляет 10^{-5} — 10^{-4} См, а высококачественные изоляторы имеют весьма низкую проводимость — 10^{-14} — 10^{-16} См.

Различают удельную электрическую проводимость κ и молярную λ_m . Удельная проводимость соответствует проводимости 1 м³ раствора, находящегося между расположенными на расстоянии 1 м друг от друга электродами площадью 1 м².

Удельная проводимость представляет собой величину, обратную удельному сопротивлению: $\kappa = \frac{1}{R}$. Ее единицей измерения является сименс на метр (См/м).

Удельную проводимость измеряемого раствора определяют по формуле:

$$\kappa = \frac{k}{R},$$

где k — постоянная электролитической ячейки.

Значение k находят, измеряя в данной электролитической ячейке сопротивление 0,01 н. раствора КСl, со следующим значением κ :

$$\begin{array}{ll} \text{при } t^\circ = 18^\circ\text{C} & \kappa = 0,001225 \text{ См/м,} \\ \text{при } t^\circ = 25^\circ\text{C} & \kappa = 0,001413 \text{ См/м.} \end{array}$$

Вычисляют k по формуле:

$$k = \kappa R_{\text{КСl}}$$

Молярная электрическая проводимость соответствует проводимости слоя электролита толщиной 1 м, помещенного между электродами такой площади, чтобы объем электролита между ними содержал 1 моль растворенного вещества. Единицей измерения молярной электрической проводимости является сименс-квадратный метр на моль ($\text{См} \cdot \text{м}^2/\text{моль}$).

Известно несколько методов кондуктометрического анализа.

Методом аналитической кондуктометрии можно непосредственно определять концентрации электролита известного качественного состава, измеряя проводимость раствора.

Наиболее широко применяется кондуктометрическое титрование, которое основывается на определении проводимости раствора во время реакции между исследуемым веществом и реактивом, которым титруют. Электрическая проводимость раствора при известных условиях пропорциональна концентрации электролита.

Рассмотрим процесс кондуктометрического титрования на примере реакции, протекающей в растворе:



В процессе титрования в растворе образуется нерастворимое или малодиссоциируемое соединение AD и в зависимости от подвижностей ионов A^+ и C^+ наблюдается различный характер изменения проводимости до точки эквивалентности. После точки эквивалентности величина проводимости возрастает за счет избытка в растворе ионов C^+ и D^- .

Результаты измерений проводимости растворов в процессе титрования изображают графически в виде кривых титрования. Точку эквивалентности на кривой титрования находят по пересечению прямых зависимости удельной проводимости от количества добавленного реагента. Согласно кривой титрования находят число миллилитров титранта, прореагировавшего с определенным веществом, и рассчитывают содержание определяемого вещества q_0 (в г):

$$q_0 = \frac{N_T V_T \mathcal{E}_0}{1000} \cdot \frac{V_p}{V_a},$$

где N_T — нормальность титранта, вступившего в реакцию, мл; \mathcal{E}_0 — грамм-эквивалент определяемого вещества; V_p — общий объем анализируемого раствора, мл; V_a — объем аликвотной части раствора, взятой для титрования; V_T — объем титранта, вступившего в реакцию, мл.

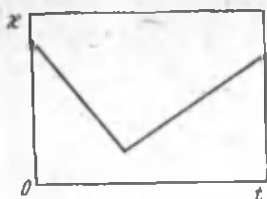
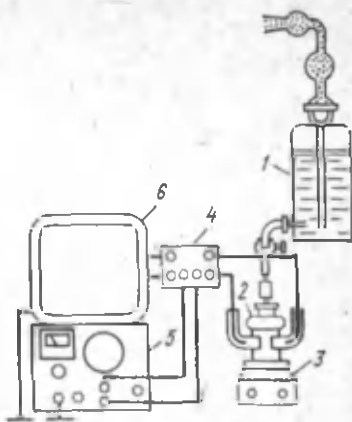


Рис. 38. Кривая хронокондуктометрического титрования.

Рис. 39. Схема установки для хронокондуктометрического титрования:



1 — сосуд Мариотта; 2 — электролитическая ячейка; 3 — магнитная мешалка типа ММ-1; 4 — кондуктометрический блок; 5 — генератор ЗГ-33; 6 — электронный потенциометр ЭПП-09.

Следует также учитывать возможность искажения показателей проводимости раствора за счет его разбавления в процессе титрования. Поэтому для титрования концентрацию титранта берут в 10 раз выше, чем концентрация титруемого раствора, или вводят поправочный коэффициент разбавления K :

$$K = \frac{V_a + V_t}{V_a}$$

В кондуктометрии часто используется хронокондуктометрическое титрование. Оно основано на автоматической регистрации изменений проводимости и определении концентрации вещества по времени, затраченному на его титрование реагентом заданной концентрации. По результатам титрования строят кривые проводимости — время, после расшифровки которых определяют концентрацию исследуемого вещества (рис. 38).

Схема установки для хронокондуктометрического титрования приведена на рис. 39.

Хронокондуктометрический метод дает возможность использовать реакции, протекающие не количественно, а качественно. При анализе многокомпонентных систем можно получить более точные результаты, а время анализа значительно сокращается.

При кондуктометрическом титровании можно получить несколько типов кривых. Первый тип кривой (рис. 40) получается при титровании раствора сульфата натрия раст-

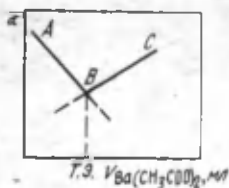


Рис. 40. Кривая кондуктометрического титрования раствора сульфата натрия раствором ацетата бария.

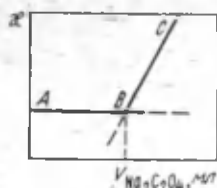


Рис. 41. Кривая кондуктометрического титрования раствора ацетата кальция раствором оксалата натрия.

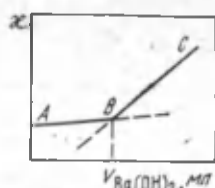
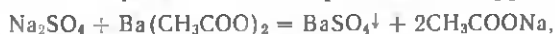
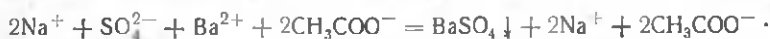


Рис. 42. Кривая кондуктометрического титрования раствора сульфата натрия раствором гидроксида бария.

вором ацетата бария. Реакция протекает по уравнению:



или в ионной форме



На отрезке *AB* наблюдается уменьшение удельной проводимости, поскольку более подвижные сульфат-ионы связываются в труднорастворимый осадок BaSO_4 и заменяются менее подвижными ацетат-ионами.

Резкое увеличение проводимости на отрезке *BC* после точки эквивалентности происходит за счет увеличения концентрации ионов Ba^{2+} и CH_3COO^- в титруемом растворе.

Второй тип кривой (рис. 41) получается при титровании раствора ацетата кальция раствором оксалата натрия. Реакция протекает по уравнению:



На отрезке *AB* до точки эквивалентности не наблюдается повышения проводимости, в связи с тем, что в процессе титрования ионы Ca^{2+} замещаются ионами Na^+ , подвижность которых несколько меньше. Избыток $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ вызывает резкое увеличение проводимости раствора (отрезок *BC*).

Титрование раствора сульфата натрия раствором гидроксида бария описывает третий тип кривой (рис. 42). Уравнение реакции имеет вид:



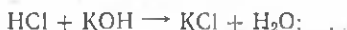
В процессе титрования наблюдается увеличение проводимости раствора до точки эквивалентности (отрезок *AB*)

за счет накопления сильно подвижных гидроксид-ионов OH^- вместо менее подвижных SO_4^{2-} , а после точки эквивалентности (отрезок BC) — за счет избытка $\text{Ba}(\text{OH})_2$.

В кондуктометрическом титровании чаще всего используют реакции нейтрализации, осаждения, комплексообразования и окисления — восстановления. Соответственно типу реакции классифицируют и методы кондуктометрического титрования.

При кислотно-основном титровании возможны следующие случаи:

а) титрование сильной кислоты сильным основанием или сильного основания сильной кислотой, например по уравнению реакции:



В результате реакции образуется малодиссоциированная молекула воды. Замена ионов водорода в молекуле кислоты на менее подвижные ионы K^+ приводит к резкому уменьшению электропроводности. Прибавление щелочи после точки эквивалентности вызывает резкий подъем кривой за счет избытка ионов K^+ и OH^- , обладающих большой подвижностью;

б) титрование слабой кислоты сильным основанием или слабого основания сильной кислотой. Пример уравнения реакции следующий:



Вследствие образования соли сильного основания и слабой кислоты в первый момент титрования наблюдается понижение электропроводности раствора (рис. 43). Добавление избытка NaOH вызывает резкий подъем кривой титрования после точки эквивалентности, так как образующийся в результате ее гидролиза малоподвижный ион CH_3COO^- замещается сильно подвижным ионом OH^- ;

в) титрование слабой кислоты слабым основанием или слабого основания слабой кислотой, например:



Проводимость в начале титрования несколько снижается из-за связывания ионов H^+ (рис. 44, отрезок AB), затем возрастает до точки эквивалентности благодаря образованию хорошо диссоциирующей соли $\text{CH}_3\text{COONH}_4$. Дальнейшее прибавление основания не изменяет проводимость

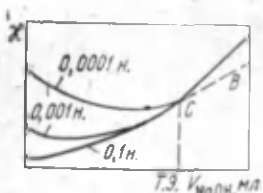


Рис. 43. Кривая титрования слабой кислоты сильным основанием.

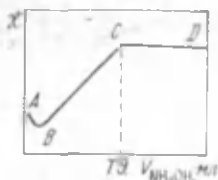


Рис. 44. Кривая титрования слабой кислоты слабым основанием.

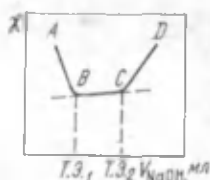


Рис. 45. Кривая титрования смеси кислот.

раствора (отрезок CD). Результаты титрования могут сильно искажаться за счет гидролиза соли. В этом случае точку эквивалентности определяют на пересечении прямолинейных участков кривой титрования;

г) титрование смеси кислот и двухосновных кислот.

Кривая титрования смеси соляной и уксусной кислот раствором едкого натра (рис. 45) имеет вид совмещенных кривых титрования сильной и слабой кислоты. Вначале идет титрование сильной кислоты HCl с точкой эквивалентности B , а при дальнейшем прибавлении щелочи происходит титрование слабой кислоты.

Титрование многоосновных кислот аналогично случаю титрования смеси кислот и описывается аналогичной кривой.

Кондуктометрическое титрование по методу осаждения в первую очередь зависит от растворимости осадка, скорости его образования, постоянства состава и чистоты. Для уменьшения растворимости осадка в раствор добавляют органические растворители, например этанол, или титруют растворы при понижении температуры. На характер кривых титрования оказывает влияние концентрация различных ионов и их подвижность.

В кондуктометрическом титровании на основе реакций комплексообразования в качестве титранта используется ЭДТА. Метод дает возможность определять следующие ионы: Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} и др. Кривые титрования имеют форму, изображенную на рис. 46. Увеличение проводимости раствора до точки эквивалентности происходит за счет высвобождения ионов H^+ в реакции катионов металлов с ЭДТА. После точки эквивалентности проводимость заметно снижается.

Для титрования отдельных ионов в смесях с другими

ионами применяются буферные растворы с различными значениями pH среды.

Кондуктометрическое титрование имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами объемного анализа. С его помощью можно проводить определение в окрашенных и мутных растворах в присутствии окислителей и восстановителей. В этих условиях индикаторный метод не дает удовлетворительных результатов. Методом кондуктометрического титрования можно проводить анализ как в концентрированных, так и в разбавленных до 10^{-4} моль/л растворах с относительной погрешностью определения от 0,1 до 2%.

Кондуктометрическое титрование широко используется в биохимии для определения индивидуальных неорганических и органических карбоновых кислот, окси- и аминокислот, катионов и анионов, микроэлементов, SH-групп, витаминов, а также для определения активности некоторых ферментов (холинэстеразы, щелочной и кислой фосфатазы, гексокиназы, лактатдегидрогеназы, аминотрансферазы, трипсина, коллагеназы и др.).

Конструкции и свойства электролитических ячеек для измерения проводимости растворов, проведения анализа,

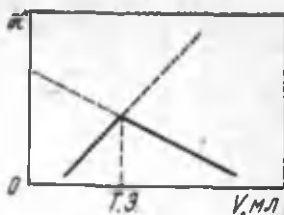


Рис. 46. Кривые кондуктометрического титрования с реакцией комплексобразования.

Рис. 47. Схема моста Кольрауша:

1 — источник тока; 2 — электролитическая ячейка; 3 — нуль-инструмент; 4 — подвижной контакт; АВ — струна реохорда; R3 — известное сопротивление; R1, R2 — дополнительные сопротивления.

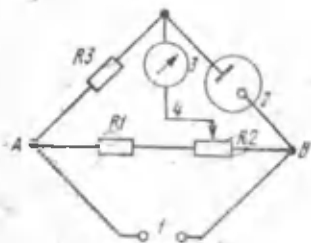


Рис. 48. Установка для кондуктометрического титрования:

1 — реохордный мост Р-38; 2 — бюретка; 3 — платиновые электроды; 4 — стакан для анализируемого раствора; 5 — магнитная мешалка.



схемы приборов кондуктометрического титрования подробно изложены в инструкциях и специальной литературе.

Простейшим прибором для измерения проводимости является мост Кольрауша (рис. 47). В схеме моста применяют переменный ток; в качестве источника тока используют ламповый генератор звуковой частоты. В установку для кондуктометрического титрования (рис. 48) входит прибор для измерения проводимости (мост Кольрауша или мосты Р-38, Р-556, Р-577, или кондуктомер, автоматическая полумикробюретка для подачи титранта, электролитическая ячейка). Раствор перемешивается магнитной мешалкой.

Определение хлоридов плазмы крови

Метод основан на способности хлорид-ионов осаждаться при титровании ионами серебра, что приводит к уменьшению проводимости титрованного раствора. Уменьшение проводимости происходит вследствие того, что подвижность ионов NO_3^- несколько меньше подвижности ионов Cl^- , а также потому, что уменьшается суммарная ионная концентрация титрованного раствора вследствие разбавления его титруемым раствором.

Уравнение реакции следующее:



Проводимость раствора увеличивается благодаря тому, что эффект увеличения концентрации ионов Ag^+ и NO_3^- преобладает над эффектом уменьшения суммарной ионной концентрации титрованного раствора.

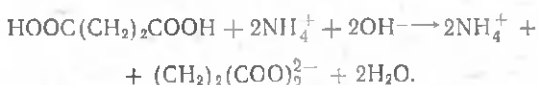
Ход определения. В стаканчик для титрования помещают 0,1 мл плазмы крови, 10 мл воды, перемешивают и титруют из микробюретки 0,1 н. раствором AgNO_3 , измеряя проводимость. На основании данных титрования строят график зависимости проводимости раствора от количества миллилитров добавленного реактива. В месте пересечения кривых находят точку эквивалентности и рассчитывают содержание хлоридов плазмы крови.

Определение янтарной или глутаровой кислот

При кондуктометрическом титровании янтарной или глутаровой кислот целесообразнее использовать в качестве титранта слабые основания, например раствор аммиака,

потому что кривые титрования в точке эквивалентности имеют более резкий излом.

Реакция нейтрализации янтарной кислоты протекает согласно уравнению:



Ход определения. Готовят определенный объем 0,1 н. раствора янтарной кислоты. Аликвотную часть приготовленного раствора переносят в электролитическую ячейку и проводят кондуктометрическое титрование 1 н. раствором аммиака. Проводимость раствора вначале несколько понижается в связи с нейтрализацией высокоподвижных ионов водорода, образующихся при диссоциации кислоты, а затем повышается до точки эквивалентности за счет образующейся в процессе нейтрализации соли. Прибавление избытка аммиака не влияет на проводимость раствора. На основании полученных данных кондуктометрического титрования рассчитывают содержание янтарной кислоты в титруемом растворе.

Аналогично проводят определение глутаровой кислоты.

§ 18. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД

Полярографический метод анализа был предложен в 1922 году чехословацким ученым Я. Гейровским. Метод основан на получении и анализе кривых, которые отражают зависимость силы тока от постепенно увеличивающегося напряжения при электролизе различных веществ. Автоматическая запись этой зависимости осуществляется в приборе, который называется **п о л я р о г р а ф о м**, а кривые зависимости — **п о л я р о г р а м м а м и**. Полярографический метод является одним из перспективных электрохимических методов, применяемых в биологии и медицине. При исследовании биологических объектов полярографическим методом определяют катионы, анионы, аминокислоты, витамины, нуклеиновые кислоты и их компоненты. Особое место занимает полярографический метод при исследовании белков и ферментов; с его помощью можно получить сведения о некоторых функциональных группах белков ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и имидазольной группе), определить ферментативную активность белков, а также выяснить взаимосвязь между коферментом и апоферментом в двухкомпонентной структуре молекулы фермента. Он широко исполь-

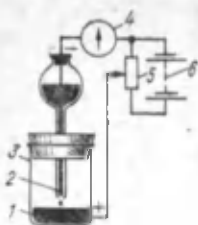


Рис. 49. Принципиальная схема полярографической установки.

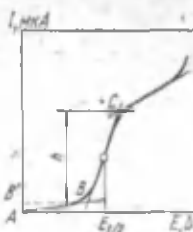


Рис. 50. Полярографическая волна (полярограмма; графический метод определения высоты полярографической волны h).

зуется для изучения процессов дыхания митохондрий различных тканей.

Полярографический метод применяется также при анализе металлов, сплавов, горных пород. С его помощью решаются вопросы кинетики химических и электрохимических реакций, их механизма и строения веществ. Он применяется также для изучения адсорбции, растворимости, комплексообразования, протекания окислительно-восстановительных процессов и т. д.

Метод полярографии используется в фармакологии, фармации для анализа лекарственных веществ, а в медицине — для диагностики различных заболеваний.

Основные преимущества полярографического метода заключаются в следующем:

1) высокая чувствительность дает возможность определить вещества в растворе с концентрацией до 0,0001%, или 10^{-4} — 10^{-6} моль/л;

2) для проведения анализа необходимо 3—5 мл раствора, а в некоторых случаях можно исследовать 0,03—0,5 мл;

3) можно исследовать смесь без предварительного разделения веществ;

4) высокая точность сочетается с быстротой анализа и простотой используемой аппаратуры;

5) пригоден для исследования мутных растворов;

6) в одном и том же растворе можно проводить ряд повторных определений, так как концентрация раствора после каждого определения не изменяется;

7) возможно одновременное определение качества и количества исследуемого вещества.

Полярографический анализ заключается в проведении электролиза исследуемого вещества в растворе. Для этой цели собирают полярографическую установку. На принци-

пиальной схеме полярографической установки (рис. 49) видим, что основной частью полярографа является электролитическая ячейка, состоящая из сосуда, наполненного раствором анализируемого вещества, и двух ртутных электродов. Один из них является катодом 2 — ртутно-капельным электродом, который через гальванометр 4 и потенциометр 5 соединен с аккумулятором 6. Ртутно-капельный электрод представляет собой стеклянную капиллярную трубку с диаметром выходного отверстия около 0,02—0,03 мм. Ртутные капли под влиянием силы тяжести отрываются от капилляра с постоянной скоростью (через 1—3 с) и падают на дно электролизера 3. Анодом 1 является ртуть на дне сосуда, которая соединяется с потенциометром и положительным полюсом аккумулятора.

Вследствие разной поверхности электродов (рабочая поверхность катода должна быть в несколько тысяч раз меньше поверхности анода) на катоде происходит концентрационная поляризация за счет восстановления ионов исследуемого вещества, а на аноде плотность тока незначительна, и величина его потенциала практически не изменяется.

При отсутствии в растворе ионов, способных к электровосстановлению или электроокислению, электрический ток в цепи не проходит. Участок кривой зависимости силы тока от напряжения в этом случае имеет вид прямой линии, параллельной оси абсцисс. В присутствии электровосстанавливающихся или электроокисляющихся ионов постепенное увеличение напряжения ведет к увеличению силы тока. При низких потенциалах через электролизер протекает слабый ток, который почти не изменяется с возрастанием потенциала — так называемый остаточный ток (рис. 50, AB'). Он состоит из конденсаторного тока (емкостный ток, или ток заряжения) и слабого тока, вызванного разрядом электровосстанавливающихся примесей, например плохо удаленного кислорода и др. Конденсаторный ток возникает при потенциалах, недостаточных для разряда иона деполяризатора; ионы подходят к катоду и образуют двойной электрический слой — конденсатор. Величина конденсаторного тока i_k возрастает с увеличением заряда электрода и периода капания ртути:

$$i_k = 0,85eNP^{2/3},$$

где e — заряд поверхности, Кл/см²; N — число капель в секунду; P — масса капли, г.

При определении малых концентраций исследуемых веществ необходимо определять величину остаточного тока в

растворе, содержащем все компоненты за исключением исследуемого вещества, и это значение прибавлять к полученным показателям при потенциалах более положительных, чем потенциал нулевого тока или вычитать при более отрицательных потенциалах.

При определенном потенциале, называемом потенциалом выделения, начинается электролиз, и ионы деполяризатора восстанавливаются. Начало электролиза характеризуется быстрым возрастанием силы тока до определенной величины BC (рис. 50). В это время в приэлектродном слое количество исследуемых ионов уменьшается, а новые ионы поступают на катод в результате диффузии из глубины раствора. Устанавливается равновесие, т. е. какое количество ионов восстанавливается на катоде, такое же количество диффундирует из глубины раствора в приэлектродный слой. Наступает предельный ток, величина которого с повышением напряжения не изменяется.

Ионы деполяризатора могут передвигаться к катоду под действием двух сил: силы электрического поля и самопроизвольной диффузии. Поэтому предельный ток $i_{пред}$ является суммой двух токов: миграционного $i_{мигр}$ и диффузного $i_{диф}$:

$$i_{пред} = i_{мигр} + i_{диф}.$$

Поскольку все уравнения в полярографии выведены для чистых диффузионных токов, миграционные токи устраняют добавлением к исследуемому раствору постороннего электролита (фона), потенциал восстановления катиона которого лежит в более отрицательной области. Катионы фона, подходя к электроду, не разряжаются, а образуют двойной электрический слой и экранируют электрическое поле. Поступление деполяризатора к электроду в присутствии фона осуществляется только в силу диффузии; возникающий при этом ток называется диффузионным.

Индиферентный электролит (фон)

Индиферентный электролит применяют в основном для увеличения электропроводности исследуемого раствора, а также для подавления миграционного тока. Для полного устранения миграционного тока концентрация индиферентного электролита должна быть примерно в 50 раз больше, чем концентрация деполяризатора, или около 0,1 моль/л.

Чаще всего в качестве индифферентного электролита при восстановлении неорганических ионов используют солевые растворы (KCl , KOH , KCN , KNO_3 , Na_2SO_4 , $LiCl$), буферные смеси, а также тетраалкиламмониевые соли, ионы которых восстанавливаются при более отрицательных потенциалах, чем ионы деполяризатора. В полярографии органических веществ используют чаще всего фосфатный, ацетатный и аммиачный буферные растворы для поддержания определенного pH. В полярографии белков и ферментов в качестве индифферентного электролита широко применяется реактив Брэдичка — 0,1 M растворы NH_4Cl и NH_4OH и $2 \cdot 10^{-3}$ M раствор $CoCl_2$. Иногда вместо хлорида кобальта (II) используется гексаминкобальт, где ион кобальта трехвалентный — $Co(NH_3)_6Cl_3$. Для определения нерастворимых органических веществ в качестве фона применяют водные растворы спиртов, уксусной кислоты и пр.

Выбор того или иного индифферентного электролита в каждом конкретном случае зависит от растворимости и устойчивости испытуемого вещества в нем. Индифферентный электролит не должен участвовать в электрохимических процессах на электроде, а также химически реагировать с исследуемым веществом.

Подбирая соответствующий фон электролита и pH среды, можно расширить катодную область применения ртутно-капельного электрода. Так, применение в качестве фона солей тетраалкиламмония дает возможность проводить полярографическое определение катионов, потенциал восстановления которых находится около $-2,6$ В.

Максимумы на полярографических волнах

Полярографические волны часто искажаются максимумами различной формы, которые мешают точному определению величины диффузионного тока и соответствующей концентрации исследуемого иона.

Различают максимумы первого и второго рода. Максимумы первого рода имеют форму пика и охватывают незначительную часть потенциалов (рис. 51). Предполагают, что максимумы первого рода обусловлены неравномерным натяжением на границе ртуть — раствор, в связи с неравномерным распределением потенциала на поверхности ртутной капли.

Зависимость поверхностного натяжения от приложенного к электродам напряжения описывается кривой параболической формы с максимумом $-0,56$ В (рис. 52), получившей название электрокапиллярной кривой.

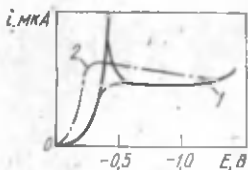


Рис. 51. Максимумы на полярографической волне:

1 — максимум первого рода; 2 — максимум второго рода.

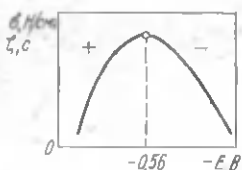


Рис. 52. Электрокапиллярная кривая.

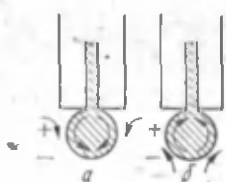


Рис. 53. Движение ртутной капли, вызванное неравномерной поляризацией:

а — при положительном заряде ртутной капли; б — при отрицательном заряде.

Вследствие неравномерного поверхностного натяжения на различных участках ртутной капли она движется в процессе вытекания от участков с меньшим поверхностным натяжением к участкам с большим поверхностным натяжением. Вместе с движением ртути происходит усиленное перемешивание раствора и подача деполаризатора к электроду, что увеличивает силу тока и, следовательно, является одной из причин возникновения максимума (рис. 53).

Максимумы второго рода имеют пологий вид, охватывают большую часть потенциалов, могут возникать при использовании концентрированных растворов фона (выше 0,1 н.) и небольшой концентрации исследуемого вещества (10^{-3} — 10^{-4} М), а также при использовании быстро каплющего капилляра. Одной из причин их появления могут быть деформации капли при ее вытекании из капилляра. Это явление наблюдается почти при всех потенциалах полярографической волны с максимумом в области нуля на электрокапиллярной кривой.

Максимумы первого и второго рода можно устранить добавлением в исследуемый раствор поверхностно-активных веществ в виде красителей (метиловый красный), а также коллоидов (желатин, агар, столярный клей и др.).

Роль поверхностно-активных веществ в устранении максимумов заключается в выравнивании градиента поверхностного натяжения на ртутной капле, что ведет к прекращению движения ртути и вместе с ней движения электролита в приэлектродном слое.

Следует учесть, что применение больших концентраций поверхностно-активных веществ приводит не только к устранению максимумов, но и уменьшению диффузионных токов. Некоторые металлы образуют комплексные соединения с поверхностно-активными веществами, что влечет за собой изменение коэффициента диффузии. Поэтому при

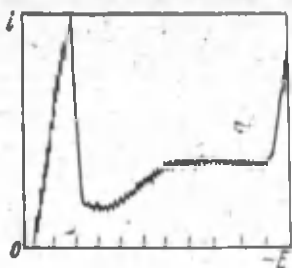


Рис. 54. Полярограмма кислорода на фоне 0,01 М раствора КСl с максимумом на первой волне.

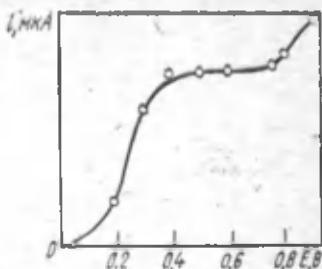


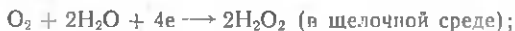
Рис. 55. Полярограмма кислорода на платиновом рабочем электроде.

проведении серийных опытов необходимо пользоваться минимальной и постоянной концентрацией поверхностно-активных веществ, которая устраняет максимум и не влияет на высоту полярографической волны.

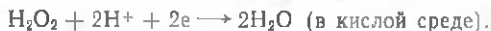
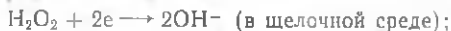
Максимумы второго рода можно устранить добавлением поверхностно-активных веществ, а также путем подбора режима работы капилляра. Применение электродов с низкой скоростью вытекания ртути из капилляра способствует спокойному формированию капли и движения ее поверхности не наблюдается.

Полярографические максимумы можно применять для количественного определения небольших примесей поверхностно-активных веществ, адсорбирующихся на ртутно-капельном электроде.

На высоту полярографической волны исследуемого иона оказывает влияние растворенный кислород, который восстанавливается на ртутном капельном электроде как в кислых, так и в щелочных средах в две стадии. Первая волна обусловлена восстановлением кислорода до пероксида водорода при потенциале от $-0,09$ до $-0,11$ В в щелочных средах и при $+0,15$ В в кислых (рис. 54):



Вторая волна отражает восстановление пероксида водорода до воды, она очень растянута от $-0,5$ до $-1,3$ В в зависимости от рН среды и природы аниона:



На твердых электродах (платиновом, серебряном) восстановлению кислорода соответствует только одна волна (рис. 55). Концентрация кислорода в разбавленных водных растворах солей составляет около $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л (при нормальном давлении и температуре), поэтому высота полярографических волн довольно значительна. Присутствие кислорода в растворе мешает проведению точного полярографического анализа, особенно когда волна кислорода соизмерима с волной деполяризатора. Поэтому кислород удаляют из раствора различными методами, например пропуская через раствор очищенного инертного газа (азота, аргона, водорода) в течение 15—20 мин. Для удаления кислорода из кислых растворов пользуются диоксидом углерода. В щелочных средах и в растворах, реагирующих с углекислым газом, применять его для удаления кислорода нельзя. В этом случае применяют твердый сульфит натрия или, в виде свежеприготовленного насыщенного раствора. Добавления 0,1 г Na_2SO_3 на 100 мл раствора достаточно для полного удаления кислорода в течение 5 мин.

На высоту полярографической волны оказывает влияние температура, от которой зависит коэффициент диффузии анализируемого вещества. Повышение температуры на 1°C ведет к повышению диффузионного тока на 1,5—2,0%. Поэтому в полярографии применяются различной конструкции термостатированные электролизеры.

Диффузионный ток зависит также от массы ртути m , которая вытекает из капилляра, и периода капания ртути t :

$$i_{\text{диф}} = Km^{2/3} t^{1/6},$$

где K — константа.

Нормальный диффузионный ток зависит от высоты ртутного столбика H и подчиняется уравнению:

$$i_{\text{диф}} = KH^{1/2}.$$

Количественный полярографический анализ

В основе количественного полярографического анализа лежит зависимость силы тока от концентрации вещества.

Диффузионный ток, обусловленный электрохимическим процессом на индикаторном электроде, пропорциональный концентрации деполяризатора в растворе. Поэтому количественное определение сводится к измерению высоты полярографической волны h :

$$h = Kc.$$

Высоту полярографической волны определяют графически, как показано на рис. 50. Сначала проводят две касательные предельному току CD и остаточному току AB , а далее линию BC , через точки пересечения проводят линии, параллельные оси абсцисс. Расстояние между этими линиями соответствует высоте полярографической волны h .

Классическим методом определения концентрации деполаризатора является расчет его согласно уравнению Ильковича, которое устанавливает зависимость между величиной диффузионного тока и концентрацией:

$$i_{\text{диф}} = 605nD^{1/2}m^{2/3}r^{1/6}c,$$

где n — число электронов; D — коэффициент диффузии; m — масса ртути; r — период капания ртути.

$$c = \frac{i_{\text{диф}}}{605nD^{1/2}m^{2/3}r^{1/6}}$$

Однако этот метод не нашел широкого применения в полярографических исследованиях из-за длительности определения $m^{2/3}r^{1/6}$, а также коэффициента диффузии для исследуемых веществ. Уравнение Ильковича используют чаще всего для определения коэффициента диффузии исследуемых веществ или заведомо известной их концентрации, а также для расчета числа электронов, принимающих участие в электродном процессе, т. е. для расшифровки механизма электродных реакций.

Для определения концентрации деполаризатора широко применяются метод калибровочных кривых, метод добавок и метод стандартных растворов.

Метод калибровочных кривых основан на том, что искомую концентрацию деполаризатора определяют по высоте полярографической волны при помощи калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовят ряд стандартных растворов с различной концентрацией определяемого вещества, затем снимают полярограммы и устанавливают высоту волн. Между высотой полярографической волны и концентрацией иона, как правило, существует прямая линейная зависимость. По полученным данным строят калибровочный график, откладывая на оси абсцисс величины концентрации, а на оси ординат — соответствующие им значения диффузионного тока (высоту полярографической волны). Затем определяют высоту волны исследуемого раствора и по калибровочному графику находят искомую концентрацию вещества.

При определении концентрации по методу калибровочных кривых необходимо выполнять следующие требования:

1. Состав и концентрация фона и стандартных растворов должны соответствовать составу исследуемого раствора, чтобы на высоту и форму волны данного иона оказывали влияние одни и те же факторы.

2. Измерения исследуемого и стандартных растворов следует проводить при одинаковой температуре.

3. Стандартизация работы капилляра, так как величина диффузионного тока зависит от $m^{2/3}r^{1/6}$.

Метод добавок основан на том, что сначала снимают полярограмму исследуемого раствора, затем в тот же электролизер добавляют типовой раствор с известной концентрацией определяемого вещества с таким расчетом, чтобы высота полярографической волны возросла примерно вдвое, и снимают полярограмму при такой же чувствительности гальванометра, что и вначале определения.

Концентрацию исследуемого иона c рассчитывают по формуле:

$$c = \frac{c_{ст}}{\frac{h_1}{h_2} \cdot \frac{V + V_1}{V} - \frac{V_1}{V}}$$

где $c_{ст}$ — концентрация стандартного раствора; V — объем стандартного раствора; h_1 — высота волны после добавления стандартного раствора; h_2 — высота волны определяемого вещества; V_1 — объем определяемого вещества.

Метод добавок имеет то преимущество, что на высоту волны оказывают влияние одни и те же факторы как при полярографировании исследуемого раствора, так и при полярографировании раствора с добавкой.

Согласно методу стандартных растворов концентрацию вещества в исследуемом растворе определяют путем сравнения высоты волн исследуемого и стандартного растворов, последний из которых содержит исследуемый ион с известной концентрацией. Состав и концентрация фона исследуемого и стандартного растворов должны быть идентичны, а полярографирование обоих растворов проводят в одинаковых условиях.

Концентрацию определяемого вещества c_x рассчитывают по формуле:

$$c_x = c_{ст} h_x / h_{ст}$$

где $c_{ст}$ — концентрация стандартного раствора; h_x и $h_{ст}$ — высота полярограмм исследуемого и стандартного растворов.

Метод стандартных растворов удобен для отдельных и серийных определений; в случае необходимости не нужно

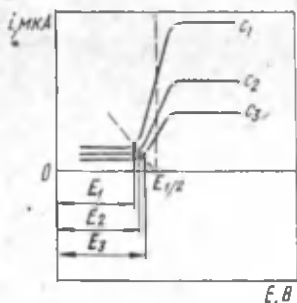


Рис. 56. Потенциал полуволны:

E_1, E_2, E_3 — потенциалы разряда;
 c_1, c_2, c_3 — концентрации исследуемого иона.

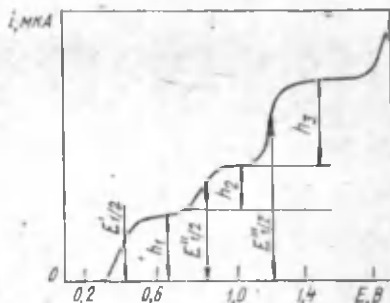


Рис. 57. Полярографический спектр.

снимать калибровочную кривую, а достаточно снять полярограмму стандартного раствора и по ней рассчитать концентрацию ряда исследуемых растворов одного и того же иона.

Потенциал полуволны

Потенциалом полуволны называется потенциал середины полярографической волны. Потенциал выделения или разряда деполаризатора несколько смещается в отрицательную область при уменьшении концентрации электровосстанавливающегося вещества (рис. 56). В отличие от потенциала выделения потенциал полуволны не зависит от концентрации ионов или молекул в растворе и от параметров ячейки. Поэтому при качественном анализе пользуются потенциалом полуволны, так как он характерен для каждого вещества.

Если в исследуемом растворе присутствуют несколько полярографически активных веществ, потенциал полуволны которых отличается на 10—200 мВ, можно получить кривую, которая называется полярографическим спектром. На основании полярографического спектра можно провести количественный и качественный анализ смеси веществ без предварительного их разделения (рис. 57).

Твердые электроды

Основное преимущество твердых микроэлектродов в том, что они дают возможность работать при потенциалах от $-0,1$ до $+1,3$ или $+1,5$ В. Таким образом твердые элект-

роды расширяют область полярографических исследований, дополняя ртутно-капельный электрод. Ограничение использования при отрицательных потенциалах связано с низким перенапряжением водорода на платине, которое может происходить уже при потенциале $-0,1$ В. Исследование электродных процессов при положительных потенциалах ограничивается присутствием на электродной поверхности адсорбированного кислорода, который может тормозить протекание электрохимической реакции.

Преимуществом твердых электродов является также то, что при работе с ними на полярографических волнах отсутствуют максимумы и осцилляции. Это увеличивает точность и быстроту исследований.

Твердые микроэлектроды особенно широко используются при исследовании биоэнергетических процессов в живых организмах. В первую очередь их применяют для непрерывной регистрации дыхания митохондрий, выделенных из клеток различных тканей, а также для наблюдения кислородного режима органов и тканей в неповрежденном организме. В этих случаях на платиновом электроде при электролитическом восстановлении кислорода появляется только одна волна и величина диффузионного тока соответствует присоединению четырех электронов:



Твердые электроды могут быть неподвижные (стационарные в неперемешиваемой и движущейся жидкости) и движущиеся (вращающиеся или вибрирующие).

Стационарные электроды в неперемешиваемой жидкости и полярографии используются редко, так как постоянство предельного тока достигается через сравнительно длительное время из-за изменения диффузионного слоя. Особенностью стационарных твердых электродов в неперемешиваемой жидкости является уменьшение величины диффузионного тока во времени.

Из движущихся электродов наиболее распространены вибрирующий (рис. 58) и вращающиеся микроэлектроды. Величина диффузионного тока вибрирующего электрода зависит от частоты и амплитуды вибрации. Частота вибрации зависит от частоты переменного тока. Обычно частота переменного тока в сети составляет 50 Гц. При работе с разбавленными растворами можно повышать частоту переменного тока (тем самым повышая чувствительность) с помощью трансформаторного умножителя или звукового

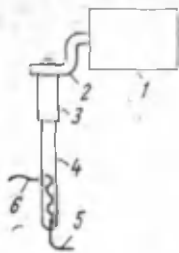


Рис. 58. Схема вибрирующего микроэлектрода:

1 — звонок; 2 — вибрирующий якорь; 3 — пластмассовая муфта; 4 — стеклянная трубка; 5 — платиновый электрод; 6 — соединительный провод.

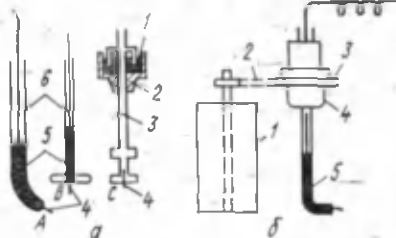


Рис. 59. Схема вращающихся микроэлектродов:

а — виды вращающихся микроэлектродов (А, В, С):
 1 — ртутный затвор; 2 — неподвижная часть; 3 — вращающийся железный вал, покрытый воском; 4 — платиновая игла; 5 — ртуть; 6 — медная проволока;
 б — установка с вращающимся платиновым микроэлектродом:
 1 — электромотор; 2 — шнур; 3 — шкив; 4 — муфта для крепления электрода; 5 — электрод.

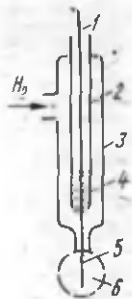


Рис. 60. Макающийся платиновый микроэлектрод:

1 — медная проволока; 2 — внутренняя стеклянная трубка электрода; 3 — внешняя стеклянная трубка электрода; 4 — ртуть; 5 — платиновая игла; 6 — пузырек газа.

генератора. Амплитуду вибрации рекомендуют поддерживать в пределах 0,5—0,7 мм.

Преимуществом вибрирующего электрода является возможность исследования микроколичеств анализируемого раствора (10^{-2} — 10^{-4} мл).

Наиболее часто в полярографии применяются вращающиеся платиновые или серебряные микроэлектроды (рис. 59). Для изготовления вращающегося платинового микроэлектрода используется платиновая проволока диаметром 0,5—0,8 мм и длиной до 10 мм, которую вплавляют в стеклянную трубку, а для тщательного перемешивания раствора к концу трубки приплавляют стеклянные «крылышки». Вращение электрода осуществляется электромотором со скоростью 600—1800 об/мин. При этом между концентрацией деполяризатора и величиной диффузионного тока наблюдается прямая пропорциональная зависимость. Макающийся платиновый электрод (рис. 60), предложенный Ю. С. Ляликовым, дает возможность проводить исследования не только в растворах, но и в расплавах солей при высоких температурах. Постоянное обновление приэлектродного слоя осуществляется при помощи газа (водород), который, выходя из трубки, оттесняет расплав от платиновой иглы, образуя пузырьки (64 пузырька в минуту).

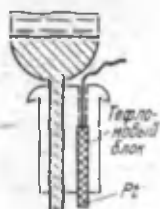


Рис. 61. Схема устройства крышки полярографической ячейки.

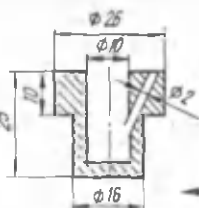


Рис. 62. Схема полярографической ячейки (размеры даны в миллиметрах).

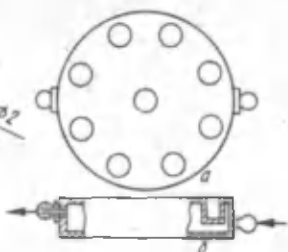


Рис. 63. Схема камеры для термостатирования (а) и ее боковой разрез (б).

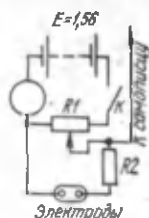


Рис. 64. Схема полярографической установки.

Основные теоретические и практические положения полярографического метода были разработаны при использовании ртутно-капельного электрода. Отечественные промышленные предприятия и зарубежные фирмы выпускают аппаратуру для полярографии с ртутно-капельным электродом.

Остановимся на некоторых вопросах и рекомендациях относительно изготовления простейшей полярографической установки для работы с твердыми электродами в лабораторных условиях.

Установка для проведения полярографического определения дыхания митохондрий состоит из системы питания электродов, полярографической ячейки с электродами и регистратора. В качестве рабочего электрода используется стационарный платиновый электрод, а в качестве электрода сравнения — насыщенный каломельный электрод. Платиновый электрод изготавливается из платиновой проволоки диаметром 0,5—2,0 мм и длиной 15—20 мм. Платиновый и каломельный электроды монтируются в тефлоновый блок, который одновременно служит крышкой полярографической ячейки (рис. 61).

Для платинового электрода в тефлоновом блоке просверливается отверстие на 0,1—2,0 мм меньше диаметра этого электрода. Платиновый электрод плотно вставляется так, чтобы между ним и тефлоном не оставалось щели, которая может стать причиной большого остаточного тока. Рабочую поверхность платинового электрода оставляют около 7 мм², а остальную поверхность покрывают пленкой клея БФ-2 или 1%-м раствором полистирола в несколько

приемов, каждый раз высушивая при комнатной температуре. Для обеспечения герметичности диаметр тefлонового блока должен быть равен диаметру полярнографической ячейки.

Полярнографическую ячейку изготовляют из тefлона или органического стекла объемом 1—2 см³. Для последовательного внесения компонентов инкубационной среды в ячейку делают боковое отверстие (рис. 62). Для перемешивания жидкости в ячейке служит магнитная мешалка. При серийных исследованиях нужно следить, чтобы перемешивание жидкости осуществлялось с постоянной скоростью, так как величина диффузионного тока зависит от числа оборотов. Измерения лучше проводить при постоянной температуре. Для этого ячейку помещают в камеру для термостатирования (рис. 63), которая соединена с водяным ультратермостатом.

Платиновый электрод хранят на воздухе, а каломельный — в насыщенном растворе хлорида калия.

Электроды включаются в электрическую схему питания и регистрации так, как показано на рис. 64. Напряжение от источника питания E подается на сопротивление $R1$ (150—200 Ом). При помощи этого сопротивления потенциал платинового электрода относительно электрода сравнения устанавливается на определенную величину (0,1—1,5 В). Ток, протекающий в цепи во время электрохимической реакции, обуславливает падение напряжения на сопротивлении $R2$ (100 Ом), которое регистрирует прибор.

Разница потенциалов между рабочим и вспомогательным электродами (электродом сравнения) контролируется ламповым вольтметром с входным сопротивлением около 10 Ом. Ток, протекающий через ячейку и соответствующий концентрации кислорода в исследуемой пробе, регистрируется на электронных автоматических потенциометрах ЭПП-09 или ЭПП-09-М-2. Чувствительность потенциометра можно увеличить подключением дополнительного сопротивления.

В лабораторных условиях применяются автоматические электронные полярнографы отечественного производства ЭП-312, ППТ-1, ПА-3, а также зарубежного производства ОН-101, LP-60, LP-70 и др.

Для измерения интенсивности поглощения кислорода митохондриями необходимо определить, при каком потенциале на электроде достигается ток насыщения. Значение потенциала может отличаться от теоретического в зависимости от омического сопротивления ячейки, электрода сравнения и других факторов. Плато предельного то-

ка диффузии должно находиться в пределах 0,4—0,9 В (рис. 55). Теоретическое значение потенциала составляет 0,65 В.

После определения потенциала электрода проверяют стабильность его работы, калибруют или устанавливают прямолинейность зависимости величины силы тока от концентрации кислорода на участке от нуля до максимальной концентрации.

Биологическая калибровка электрода проводится с интактными митохондриями или дрожжами. Суспензию дрожжей дважды промывают водопроводной водой от наполнителя и инкубируют в 0,9%-м растворе KCl с 1%-м раствором глюкозы 15 мин при температуре 37°C. Дрожжи или митохондрии помещают в ячейку и наблюдают за поглощением кислорода в среде. Одновременно определяют остаточный ток, т. е. ток, который остается после исчерпания кислорода в ячейке. Его величина зависит от разряда на электроде электрохимически активных примесей и от характеристик электрода. Остаточный ток i_2 должен составлять 2—4% диффузионного тока i_1 , обусловленного восстановлением свободно растворенного кислорода (рис. 65). Принимают, что при комнатной температуре и атмосферном давлении растворимость кислорода в исследуемых средах инкубации равна $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Зная, чему это количество кислорода соответствует в миллиметрах диаграммной ленты самописца, можно рассчитать цену 1 мм в микроатомах кислорода и перейти к определению интенсивности дыхания. Интенсивность дыхания выражают в микроатомах кислорода, который поглощается из раствора за 1 мин, на 1 мг белка использованного препарата.

Способы очистки твердых электродов. При использовании твердых электродов на их поверхности осаждаются продукты электролиза, что является причиной изменения

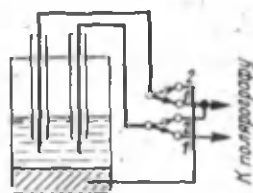
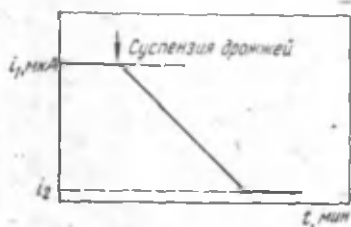


Рис. 65. Кривая поглощения кислорода суспензией дрожжей в полярографической ячейке.

Рис. 66. Очистка твердых платиновых электродов методом электрохимической деполаризации.

их качественных и количественных характеристик. Для очистки твердых электродов применяются механический, химический и электрохимический способы.

При механическом способе очистки срезают торцевую часть рабочей поверхности электрода или очищают его бритвой, тонкой наждачной бумагой либо иголкой.

Химический способ очистки заключается в обработке электродов теплой азотной кислотой (1 : 1) в течение 10—15 мин с последующей тщательной и многократной промывкой дистиллированной водой. Таким образом электрод очищается от большинства органических веществ, а также металлов и их оксидов.

Наиболее совершенным, быстрым и дающим воспроизводимые результаты является электрохимический способ очистки твердого электрода (например, платинового) путем попеременной подачи на него положительного и отрицательного потенциала. В качестве второго электрода используют также платину (рис. 66). Процесс очистки проводят переполаризацией в 0,1 н. растворе высокоочищенной серной кислоты, приготовленной из фиксанала, при напряжении 1,67 В. Продолжительность каждого периода переполаризации — 15—30 с, а вся очистка занимает 15 мин. Заканчивать очистку необходимо анодной поляризацией, обратной тому режиму, в котором обычно работает электрод. После этого электрод многократно промывают дистиллированной водой.

Определение окислительного фосфорилирования

Определение окислительного фосфорилирования основывается на регистрации поглощения кислорода и неорганического фосфата митохондриями печени из инкубационной среды. Интенсивность поглощения неорганического фосфата определяют по методу Кондрашевой и на основании данных опыта рассчитывают коэффициент фосфорилирования P/O , который представляет собой отношение количества этерифицированного неорганического фосфата к поглощенному количеству кислорода.

Выделение митохондрий. Митохондрии печени выделяют методом дифференциального центрифугирования. После декапитации животного печень быстро помещают в охлажденный 0,001 М раствор Na_2 -ЭДТА в 0,25 М растворе сахарозы (раствор А). 1 г печени измельчают охлажденными ножницами. Раствор сливают, а ткань переносят в стеклянный гомогенизатор Поттера — Эльвехейма с тefлоновым пестиком.

В гомогенизатор наливают раствор *A* в соотношении 1 : 10 (на единицу массы ткани берут 10 объемов раствора). Ткань гомогенизируют до разрушения клеток (1,5—2 мин). Гомогенат переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин при 600 об/мин и охлаждении до 1—3°C. В результате центрифугирования в осадок переходят ядра и остатки неизмельченных клеток. Надосадочную жидкость переносят в пробирку и снова центрифугируют 20 мин при 12000 об/мин. Осадок митохондрий промывают раствором *A* (1 : 10). Все операции проводят при охлаждении до 1—3°C. После промывания осадок митохондрий ресуспендируют в 0,25 *M* раствора сахарозы из расчета 1 мл раствора на объем митохондрий, выделенных из 1 г ткани.

Определение интенсивности дыхания митохондрий. Интенсивность дыхания митохондрий определяют с помощью полярографа ПА-3 или LP-60 с платиновым электродом. Полярограммы записывают в термостатированном сосуде при температуре 26°C, которая поддерживается ультратермостатом.

Полярографическое определение проводят в инкубационной среде такого состава (из расчета на 1 пробу) : 20 мкмоль KH_2PO_4 , 150 мкмоль глюкозы, 20 мкмоль субстрата (янтарной или α -кетоглутаровой кислоты), 150 мкмоль глюкозы, 5 мкмоль АТФ и 0,2 мг кристаллической гексокиназы.

Все реактивы, кроме АТФ и гексокиназы, помещают в полярографическую ячейку; перед записью полярограмм вносят также АТФ и гексокиназу. Опускают электроды и при напряжении 0,65 В фиксируют максимальное количество кислорода в инкубационной среде. После этого добавляют 0,2 мл суспензии митохондрий (3,5—4,5 мг белка) и регистрируют поглощение кислорода. Кривая поглощения кислорода митохондриями характеризуется прямолинейностью в средней части (рис. 67), по которой рассчитывают интенсивность дыхания митохондрий.

Для расчетов *D* (в микроатомах $\text{O}_2/\text{ч}$) пользуются формулой:

$$D = \frac{Vc}{M - N} (A - B) 60$$

где *V* — объем пробы, мл; *c* — концентрация кислорода в пробе при 26°C (0,5 микроатомов/мл); *M* — уровень максимального тока в условных делениях по шкале самописца; *A*, *B* — уровень тока в условных делениях, соответствующий двум точкам прямолинейной части кривой; *N* —

уровень минимального тока в условных делениях по шкале самописца; t — время, соответствующее данному отрезку прямолинейной части кривой, мин.

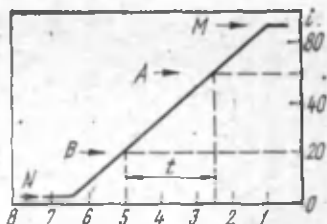


Рис. 67. Кривая поглощения кислорода митохондриями.

Определение неорганического фосфора. Исследуемую пробу инкубируют в течение 4 мин. Одновременно ставят контрольную пробу, в которую помещают все реактивы, кроме АТФ и гексокиназы. Через 4 мин в контрольную и исследуемую пробы добавляют по 0,5 мл 25%-го раствора трихлоруксусной кислоты, а в контрольную — митохондрии, АТФ и гексокиназу. Через 15 мин содержимое пробирок фильтруют, отбирают 0,1 мл фильтрата, добавляют 3 мл 96%-го этанола и 0,4 мл 10%-го раствора молибдата аммония в 8 н. растворе H_2SO_4 . Объем доводят водой до 5 мл, перемешивают и спектрофотометрируют в кварцевых кюветах шириной 1 см при длине волны 390 нм.

Содержание неорганического фосфата определяют по калибровочной кривой, которую строят, используя высушенный до постоянной массы KH_2PO_4 (интервал между пробами — 3,1 мкг).

Содержание поглощенного неорганического фосфата c рассчитывают по формуле:

$$c = Vc_1/V_1 \cdot 31 \cdot t,$$

где V — общий объем пробы, мл; c_1 — содержание неорганического фосфата по калибровочной кривой, мкг; V_1 — объем пробы, взятый для определения, мл; t — время инкубации, мин; 31 — коэффициент пересчета микрограммов в микроатомы.

Содержание белка в пробе определяется биуретовым методом и выражается в микроатомах фосфата за 1 мин на 1 мг белка митохондрий.

На основании данных опытов рассчитывают коэффициент Р/О.

Определение активности амилазы

Метод основан на том, что под действием амилазы на крахмал образуются молекулы глюкозы, имеющие восстановительные свойства.

Полярнографическим методом определяют наличие ионов Cu^{2+} в инкубационной смеси после действия на крахмал

амилазы, а в качестве контроля используют препарат с инактивированной амилазой. Активность фермента определяют по разнице между высотой волны поляризационной кривой контрольной и исследуемой проб.

Построение калибровочной кривой. К 10 мл 4%-го раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, добавляют 10 мл воды и по 10 мл реактива Фелинга I и II. (Для приготовления реактива Фелинга I 200 г сегнетовой соли и 150 г NaOH растворяют в колбе вместимостью 1 л и доводят водой до метки. Чтобы приготовить реактив Фелинг II, 40 г химически чистого и перекристаллизованного $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в колбе вместимостью 1 л и доливают водой до метки). После нагревания доводят объем до 100 мл (раствор А). Полярграфируют смесь 0,1—1,5 мл раствора А и 8 мл фона (аммиачный буферный раствор: 2 г NH_4Cl и 1,3 мл 25%-го раствора NH_4OH). Для освобождения от растворенного в воде кислорода применяют 2%-й (свежеприготовленный) раствор Na_2SO_3 .

Общий объем смеси для полярграфирования — 10 мл (x мл раствора А + 8 мл фона + 1 мл раствора Na_2SO_3 + y мл H_2O).

При построении графика значение высоты волны полярграфической кривой для меди (после вычитания высоты остаточного тока — 2 мм) откладывают на оси ординат, а концентрацию меди — на оси абсцисс.

Определение активности амилазы. До 20 мл 2%-го раствора крахмала (навеску крахмала растворяют в небольшом количестве холодной воды, порциями переносят в колбу с кипящей водой и кипятят несколько минут) добавляют раствор фермента (объем зависит от активности фермента) и воды до общего объема инкубационной смеси 30 мл. Перед смешиванием все растворы помещают в водяную баню при температуре инкубации 30°C. Период действия фермента — 15 мин. После этого 10 мл инкубационной смеси переносят в колбу вместимостью 100 см³, которая содержит по 10 мл реактива Фелинга I и II. После нагревания (3 мин) и выпадения осадка Cu_2O содержимое колбы количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³ и водой доливают до метки (проба). Для полного осаждения Cu_2O раствор оставляют на 30 мин. Неполное осаждение Cu_2O искажает результаты анализа, поэтому надосадочную жидкость нужно отбирать сверху осторожно, не перемешивая.

Для записывания полярграфических волн готовят смесь: 1 мл раствора А, 8 мл раствора Na_2SO_3 и 1 мл воды. Параллельно готовят контрольную смесь, в ко-

торой действие ферментативного препарата прекращают кипячением в течение 3 мин.

Записывают полярограммы, высоту волн h поляризационных кривых измеряют графическим методом. Количество меди рассчитывают по разнице высоты волн контрольной h_k и исследуемой h_n проб на калибровочной кривой. Разницу высот волн рассчитывают по формуле:

$$h = h_k - h_n.$$

Активность фермента выражают количеством меди, осажденной углеводами в виде Cu_2O .

Определение степени сопряженности препаратов митохондрий

Полярографическим методом (с применением кислородного электрода) исследуют действие различных ингибиторов на дыхание митохондрий, измеряют отношение АДФ/О (число молекул АДФ, которые превращаются в АТФ, в расчете на один атом поглощенного кислорода), а также изучают дыхательный контроль, который является мерой сопряженности дыхания и фосфорилирования.

Интактные митохондрии, выделенные в тщательно контролируемых условиях и суспендированные в среде, содержащей субстрат и фосфат, характеризуются низкой скоростью дыхания v^a (рис. 68). Добавление незначительных количеств АДФ резко увеличивает скорость дыхания (скорость поглощения кислорода v_3) до тех пор, пока вся АДФ не превратится в АТФ и дыхание снова тормозится до уровня $v^{ATФ}$. Отношение скорости дыхания в присутствии АДФ

к скорости дыхания после того, как весь АДФ превратится в АТФ, называется дыхательным контролем (ДК), или акцепторным контролем:

$$ДК = v_3/v_4^{ATФ}.$$

Значения дыхательного контроля изменяются от 1 до 10 в зависимости от сопряженности процессов дыхания и фосфорилирования. Высокое значение дыхательного контроля характерно для интактных митохондрий (прочно сопряженный препарат), а низкое — для поврежденных или

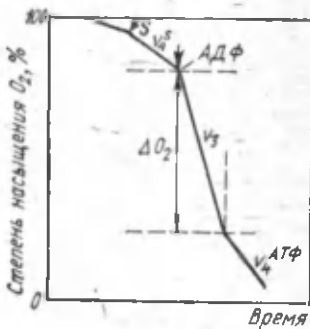


Рис. 68. Кривая поглощения кислорода митохондриями в зависимости от различных факторов.

«разобщенных» митохондрий такими реагентами, как 2,4-динитрофенол, силициланилиды и др.

Зная концентрации добавленной АДФ и количество поглощенного кислорода в состоянии v_3 , рассчитывают отношение АДФ/О, которое эквивалентно отношению

$$\frac{P}{O} = \frac{\text{Количество этерифицированного неорганического фосфата, микроатомы}}{\text{Количество поглощенного кислорода, микроатомы}}$$

Теоретическое значение отношения Р/О для окисления малата или α -кетоглутарата, в которых коферментом дегидрогеназ является НАД⁺, равно 3. Для окисления сукцината, коферментом которого является ФАД, это соотношение равно 2, для окисления аскорбата — 1.

Поскольку в процессе выделения митохондрий возможно частичное разобщение процессов окисления и фосфорилирования, а также действие мембранных АТФаз, получаемые экспериментально значения Р/О несколько ниже теоретических.

Ход определения. Выделение митохондрий из печени крыс описано на с. 157.

В полярографическую ячейку вносят по 2 мл инкубационной среды митохондрий: 0,015 М раствор КСl, 0,005 М раствор KH_2PO_4 , 0,15 М раствор сахарозы и 0,0025 М раствор MgCl (рН-7,4). В ячейку опускают электроды и устанавливают перо самописца в крайнее левое положение шкалы. В инкубационную среду вносят 0,05 мл суспензии митохондрий (3,5—6 мг белка). Через 1,5—2 мин в ячейку добавляют различные субстраты окисления, например сукцинат калия, аскорбиновая кислота (конечные концентрации для раствора сукцината 10 мМ и для смеси растворов аскорбиновой кислоты + ТМФД — 5 и 100 мМ соответственно). Основные растворы субстратов для окисления — 1 М раствор сукцината калия (рН = 7,4) и 0,5 М раствор аскорбиновой кислоты — (рН=7,4) готовят перед работой.

Регистрируют постоянную скорости дыхания и через 1—2 мин добавляют 200 мкМ раствор АДФ. После последовательного изменения скорости дыхания (переход $v_1 \rightarrow v_2 \rightarrow v_3 \rightarrow v_4^{\text{АТФ}}$) через 1—2 мин добавляют 100 мкМ раствор 2,4-динитрофенола. Регистрируют поглощение кислорода в ячейке до стадии анаэробноза. Проводят 2—3 определения для каждого субстрата окисления; рассчитывают коэффициент дыхательного контроля и коэффициент фосфорилирования.

Результаты определений записывают в таблицу. На основании полученных данных делают вывод о степени сопряженности полученного препарата митохондрий.

§ 19. МЕТОД АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРОВАНИЯ

Амперометрическое титрование является одним из электрохимических методов объемного анализа. Метод основан на измерении силы диффузионного тока, протекающего через электролизер, при постоянном потенциале. При этом величину потенциала следует выбирать так, чтобы титрование проводилось при предельных токах восстановления или окисления исследуемых веществ. В методе амперометрического титрования используют реакции осаждения, комплексообразования и окисления — восстановления.

В процессе амперометрического титрования диффузионный ток $i_{\text{диф}}$ прямо пропорционален концентрации вещества в растворе:

$$i_{\text{диф}} = Kc,$$

где K — коэффициент пропорциональности.

Такая зависимость соблюдается при условии, что в растворе (как и при полярографических исследованиях) присутствует посторонний электролит (фон).

При уменьшении концентрации электроактивного вещества (осаждением каким-либо реагентом) $i_{\text{диф}}$ уменьшается и в точке эквивалентности становится равным нулю или весьма малой величиной в зависимости от произведения растворимости осадка.

Точку эквивалентности в методе амперометрического титрования находят графически. На оси ординат откладывают силу тока, а на оси абсцисс — объем прибавленного реактива. Точка эквивалентности соответствует точке излома на кривой титрования, которую определяют графически экстраполяцией прямых отрезков до пересечения. Следует учесть, что возле точки эквивалентности в реакциях осаждения и комплексообразования (при увеличении растворимости осадка) могут получаться заметные отклонения точек от графически рассчитанных. Однако опыт показал, что графическое определение точки эквивалентности также дает точные результаты при определении малых количеств исследуемых веществ.

Если концентрации исследуемых веществ и реагента одинаковы или незначительно отличаются, при расчетах необходимо вводить поправку на разбавление:

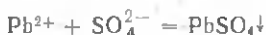
$$i_{\text{корр}} = i_{\text{изм}} \cdot \frac{V_1 + V_2}{V_1}$$

где $i_{\text{корр}}$ — плотность тока с учетом поправки на разбавление, мкА; $i_{\text{изм}}$ — измеренная плотность тока, мкА; V_1 — исходный объем жидкости, мл; V_2 — объем добавленного реактива, мл.

Согласно такой поправке увеличение объема раствора в десять раз приводит к соответственному уменьшению величины диффузного тока.

В зависимости от электроактивности исследуемых веществ на индикаторном электроде и от приложенного потенциала могут получаться различные виды кривых. Так, кривая на рис. 69, *а* соответствует взаимодействию определяемого вещества (восстанавливающегося) с реагентом, который не принимает участия в электродной реакции.

Такую кривую можно получить, например, при титровании ионов свинца растворимыми сульфатами (сульфатом натрия)



или оксалатами.

Диффузионный ток свинца по мере прибавления реактива (сульфата натрия) будет уменьшаться; в точке эквивалентности он становится равным нулю или принимает очень малое значение, соответствующее растворимости PbSO_4 . После полного осаждения свинца ток остается постоянным.

Кривая на рис. 69, *б* получится, если титровать невосстанавливающееся на электроде вещество (сульфат — ионы) восстанавливающимся реагентом (раствором нитрата свинца). При этом по мере прибавления реагента до точки эквивалентности ток будет оставаться постоянным. Увеличение диффузионного тока будет происходить за счет избытка ионов свинца в растворе.

Кривая на рис. 69, *в* получается в том случае, если в электродную реакцию вступают оба реагирующих вещества, например при титровании ионов свинца дихроматом:

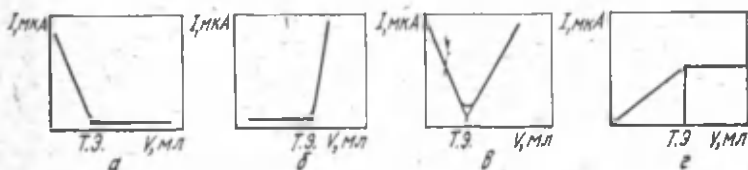
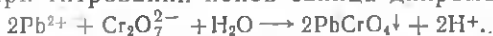
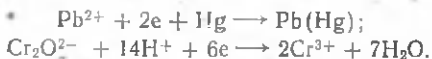


Рис. 69. Кривые амперометрического титрования:

а — титрование восстанавливающегося вещества невосстанавливающимся реагентом; *б* — титрование невосстанавливающегося вещества восстанавливающимся реагентом; *в* — титрование, при котором восстанавливаются определяемое вещество и реагент; *г* — полярографической активностью обладает продукт взаимодействия определяемого вещества и титранта.

Уменьшение диффузионного тока до точки эквивалентности связано с выпадением свинца в осадок в виде $PbCrO_4$. Появление свободных хромат-ионов приводит к увеличению предельного тока, что обусловлено восстановлением их до хрома низшей степени окисления:



Кривая на рис. 69, *г* описывает случай, когда в электродную реакцию не вступает ни одно из реагирующих веществ, а электроактивным является продукт их взаимодействия.

Так, при титровании арсенатов иодидом калия в электродную реакцию вступает образующийся в ходе реакции свободный иод:



Если в электродную реакцию не вступают реагирующие вещества и продукты их реакции, весьма перспективным является использование в амперометрическом титровании полярографического индикатора, который реагирует с титрантом после того, как исследуемое вещество полностью с ним прореагировало, а конечная точка титрования устанавливается по величине диффузионного тока индикатора. Этот метод дает возможность определить концентрации веществ, которые электрохимически не активны. Так, ионы кальция можно оттитровать оксалатом в присутствии электрохимически активного кадмия в качестве индикатора. Сначала реагирует с оксалатом кальций, а затем кадмий, по диффузионному току которого устанавливают конечную точку титрования.

Метод амперометрического титрования отличается от других электрохимических объемных методов высокой точностью определения незначительных концентраций исследуемых веществ, быстротой анализа. Относительная погрешность измерения при амперометрическом титровании составляет 1—5%, а для проведения анализа могут применяться довольно разбавленные растворы, например 0,001 М. Метод дает возможность проводить исследование мутных растворов. На результаты определения не оказывают влияние примеси посторонних веществ, если они не дают электродных реакций на электроде при потенциале определения. В большинстве случаев амперометрическое титрование проводят без удаления кислорода из раствора и добавления поверхностно-активных веществ. Благодаря тому, что на результаты амперометрического титрования не оказывает влияния фон, характеристика капилляра и давление ртути,

чувствительность определений выше, чем полярографического анализа. Применяемая аппаратура при амперометрическом титровании проще той, которая применяется в полярографии. Важным преимуществом метода является и то, что он дает возможность путем подбора соответствующих реагентов и электрохимически активных индикаторов определять концентрации таких веществ, которые электрохимически не активны.

Метод амперометрического титрования может быть использован как для анализа веществ, так и для исследования протекания разнообразных и взаимосвязанных электрохимических процессов, их кинетики, определения состава образующихся веществ, их растворимости, комплексообразования и т. д. В биохимии этот метод используется для определения SH-групп белков и S—S-связей в белках после их расщепления путем сульфитолиза, а также для определения некоторых микроэлементов, цистеина; SH — глутатиона.

Схема установок и электроды для амперометрического титрования

В качестве установок для амперометрического титрования можно использовать любые полярографы постоянного тока, содержащие индикаторный электрод (твердый или ртутно-капельный), электрод сравнения, источник тока, потенциометр для регулирования потенциала индикаторного электрода, милливольтметр для измерения напряжения и гальванометр для измерения величины тока в процессе титрования. Однако для проведения амперометрического титрования можно использовать и более простые установки, которые легко изготовить и собрать в лаборатории.

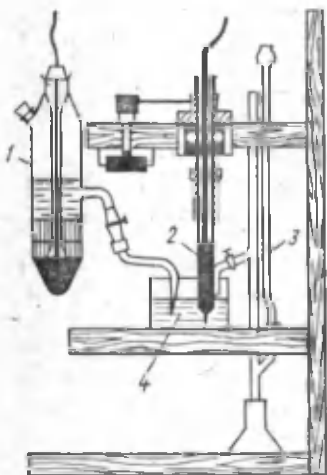


Рис. 70. Схема установки для амперометрического титрования с платиновым микроэлектродом.

Установка для амперометрического титрования с платиновым микроэлектродом (рис. 70) состоит из индикаторного (рабочего) платинового вращающегося электрода 2, в качестве электрода сравнения используется насыщенный каломельный электрод 1 (приготовление см. на с. 116).

Электролитное соединение платинового и каломельного электродов осуществляется с помощью «агаровых» сифонов — определенной формы стеклянных трубок, заполненных агаровым гелем, насыщенным хлоридом калия. Диаметр трубки должен быть небольшой, а длина и форма могут быть различными в зависимости от характера соединения с прибором для амперометрического титрования.

Заполняют агаровые сифоны так: в пробирку наливают 20 мл насыщенного раствора хлорида калия и 0,6 г агара. Смесь нагревают на водяной бане до образования прозрачного раствора. Старательно вымытый и высушенный сифон нагревают в сушильном шкафу до 60—80°C. В сифон наливают агаровый раствор, следя, чтобы в него не попали пузырьки воздуха. Сохраняют агаровые сифоны в насыщенном растворе хлорида калия.

В установках для амперометрического титрования в качестве индикаторного электрода лучше всего использовать вращающийся платиновый электрод. Это узкая (внутренний диаметр около 2—3 мм) стеклянная толстостенная трубка, в нижний конец которой впаивают платиновую проволоку диаметром 0,5—1 мм так, чтобы длина внешнего конца равнялась 10 мм, а внутреннего — 2—3 мм. Величина рабочей поверхности платинового электрода должна относиться к поверхности ртути в насыщенном каломельном электроде, как 1 : 1000, тогда на электроде происходят процессы концентрационной поляризации.

Чтобы осуществить контакт платинового электрода, в стеклянную трубку наливают чистую ртуть и опускают медный стержень, который соединяют с полюсом «—» измерительного прибора.

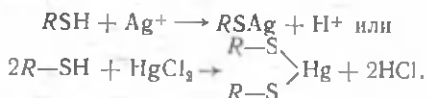
Платиновый электрод вращают электродвигателем переменного тока (600 об/мин). Для эффективного перемешивания исследуемого раствора к стеклянной трубке припаивают стеклянные «крылышки» (рис. 59).

Платиновый электрод может работать длительное время, если в схему прибора вмонтировать электрический переполяризатор и включать его после каждого измерения.

Титрование исследуемого раствора производят из микробюретки 3. При различных изменениях температуры в помещении электролитическую ячейку 4 термостатируют, так как изменению температуры на 1°C ведет к изменению величины предельного диффузионного тока на 1—2%. В лабораторных условиях для метода амперометрического титрования используют прибор ПАТ-1, а также полярографы ПА-3 или ЛП-60 со специально изготовленными приставками.

Определение SH-групп белков

Метод основывается на том, что при титровании раствора, содержащего SH-группы, последние связываются ионами Ag^+ или Hg^{2+} , образуя слабодиссоциирующие соединения:



Когда все SH-группы будут блокированы, т. е. свяжутся ионами Ag^+ или Hg^{2+} , в растворе появляются свободные ионы металлов, которые, восстанавливаясь на платиновом электроде, обуславливают появление диффузионного тока. Сила диффузионного тока пропорциональна концентрации ионов металла в растворе, а содержание SH-групп эквивалентно количеству AgNO_3 или половинному количеству HgCl_2 , израсходованному на титрование.

Для определения SH-групп в качестве фона применяют некоторые буферные растворы (аммиачный, ТРИС, ацетатный и др.).

Специфичность взаимодействия SH-групп с ионами Ag^+ повышается при использовании аммиачного буферного раствора (0,1 M раствор нитрата аммония и 0,1 M раствор гидроксида аммония). В результате взаимодействия ионов Ag^+ с аммиаком образуется комплекс $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$, который восстанавливается на платиновом электроде. Образование такого комплекса устраняет возможность отрицательного влияния хлорид-ионов на титрование SH-групп ионами Ag^+ . Титрование SH-групп ионами Ag^+ обычно проводят при pH=8,4, так как в кислой среде уже при потенциале $-0,1$ В ионы H^+ восстанавливаются на платиновом электроде, а титрование ионами Ag^+ проводят при потенциале $-0,2$ В и выше.

При титровании SH-групп раствором сулемы в качестве фона используют 0,9%-й раствор KCl (pH=7,0), раствор Рингера, так как хлорид-ионы повышают специфичность реакции ионов Hg^{2+} с SH-группами.

Ход определения. В сосуд для титрования наливают 10 мл физиологического или аммиачного буферного растворов и определенное количество исследуемого раствора (0,2 мл сыворотки крови, 0,2 мл гомогената ткани внутренних органов, 0,2 мл гемолизата крови или раствора цистеина различной концентрации). В приготовленный раствор опускают электроды. С помощью переменного сопротивления устанавливают внешнюю э.д.с. и следят, чтобы стрелка

гальванометра не отклонялась. Отсчет проводят от нуля или другого показателя, который условно принимают за нуль. Включают электромотор и сразу же титруют, так как длительное перемешивание раствора приводит к искажению результатов опыта.

Раствор AgNO_3 или HgCl_2 из микробюретки добавляют через каждые 15—20 с и после каждой добавленной капли фиксируют силу тока.

В начале титрования, когда ионы Ag^+ или Hg^{2+} реагируют со свободными SH-группами, диффузионный ток не возникает, и стрелка гальванометра не отклоняется. Излишек ионов Ag^+ или Hg^{2+} после связывания всех SH-групп обуславливает увеличение диффузионного тока. Титрование проводят до установления закономерности, когда каждая добавленная капля AgNO_3 или HgCl_2 обуславливает увеличение силы диффузионного тока на одну и ту же величину. Титрование проводят 3—5 раз.

Строят график зависимости силы тока (показания гальванометра) от добавленного объема раствора AgNO_3 или HgCl_2 (количество капель), откладывая на оси абсцисс добавленный объем, а на оси ординат — силу тока. В месте пересечения кривых находят точку эквивалентности и определяют содержание SH-групп в микромолях.

Пример расчетов. Допустим, что на титрование 0,2 мл сыворотки крови использовано 5,5 капель 0,001 M раствора HgCl_2 . Определив количество капель в 1 мл раствора HgCl_2 , рассчитывают объем одной капли. Содержание SH-групп x рассчитывают на 100 мл сыворотки по формуле:

$$x = nV \cdot 500,$$

где n — количество капель сулемы; V — объем одной капли, мл; 500 — коэффициент пересчета на 100 мл сыворотки, если в пробу добавляют ее 0,2 мл.

При определении содержания SH-групп в гомогенатах тканей внутренних органов навеску тканей берут 200 мг, печени — 100 мг (ткани гомогенизируют в 2 мл физиологического раствора). Для определения нужно 0,2 мл гомогената, а результат рассчитывают на 100 мг ткани по формуле:

$$x = nV \cdot 5,$$

где 5 — коэффициент пересчета на 100 мг ткани.

Для печени содержание SH-групп рассчитывают по формуле:

$$x = nV \cdot 10;$$

где 10 — коэффициент пересчета на 100 мг ткани печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев В. С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине. — М.: Медицина, 1973.— 336 с.
- Виноградова Е. Н., Галлай Э. А., Финогенов Э. М. Методы полярографического и амперометрического анализа. — М.: Изд-во МГУ, 1973.— 300 с.
- Мешкова Н. П. Физико-химические методы исследования в биологии.— М.: Изд-во МГУ, 1975.—182 с.
- Рейшахрит Л. С. Электрохимические методы анализа.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1970.—200 с.
- Иванов И. Д., Рыхлеева Е. Е. Полярография структуры и функции биополимеров. — М.: Наука, 1968.— 344 с.
- Гейровский Я., Кута Я. Основы полярографии. — М.: Мир, 1965.— 559 с.
- Димитров О. А. Модификация установки для полярографического измерения интенсивности дыхания. — Вестник Ленинградского университета. Серия биол., 1966, вып. 2, № 9, с. 79—83.
- Кармолицев Р. Х. Современные биохимические методы исследования в ветеринарии и зоотехнии. — М.: Колос, 1974.— 286 с.
- Кондрашева М. А., Лесогорова Т. А., Шноль С. Э. Метод определения неорганического фосфора на спектрофотометре по спектрам поглощения молибдатных комплексов в ультрафиолете. Биохимия. — 1965, т. 30, № 3, с. 567.
- Лопатин Б. А. Теоретические основы электрохимических методов анализа. — М.: Высшая школа, 1975.—295 с.
- Виноградов А. Д., Лейкин Ю. Н., Липская Т. Ю. Практическое руководство к занятиям по биохимии животных. Биоэнергетика. — М.: Изд-во МГУ, 1973.—47 с.
- Кочетов Г. А. Практическое руководство к занятиям по энзимологии.— М.: Изд-во МГУ, 1971.—352 с.
- Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. М. Франка. — М.: Наука, 1973.—234 с.
- Физико-химические методы анализа. Практическое руководство / Под ред. В. Б. Алексовского и К. Б. Яцимирского. — Л.: Химия, 1971.— 424 с.
- Бабко А. К., Пилипенко А. Т., Пятницкий И. В. и др. Физико-химические методы анализа. — М.: Высшая школа, 1968.—325 с.
- Мискиджьян С. П., Кравченко Л. П. Полярография лекарственных препаратов. — Киев: Вища школа, 1976.—232 с.
- Худякова Т. А., Крешков А. П. Кондуктометрический метод анализа. — М.: Высшая школа, 1975.—207 с.
- Майрановский С. Г., Страдинь Я. П., Безуглый В. Д. Полярография в органической химии. — Д.: Химия, 1975.—352 с.

Глава IV. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

§ 20. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптические методы исследования предполагают изучение взаимодействия электромагнитного излучения с веществом во всем диапазоне электромагнитного спектра, поддающемся измерению. В различных областях этого диапазона используются различные физические явления, дающие

возможность регистрировать энергетические изменения до и после взаимодействия излучения с исследуемым веществом.

Энергетическое состояние атома характеризуется энергией электронов, входящих в его состав, которая может принимать ряд дискретных значений, переход между которыми характеризуется изменением энергии на величину

$$E = h\nu, \quad (1)$$

где h — постоянная Планка; ν — частота перехода.

Энергетическое состояние молекулы зависит не только от энергии электронов, но и от взаимного расположения атомов, входящих в состав молекулы. В общем случае

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр},$$

где E — внутренняя энергия молекулы; $E_{эл}$ — электронная энергия; $E_{кол}$ — колебательная энергия; $E_{вр}$ — вращательная энергия.

Таким образом, энергетическое состояние молекулы определяется набором квантовых чисел, описывающих ее вращательное, колебательное и электронное состояние. Изменение $E_{эл}$, $E_{кол}$, $E_{вр}$ происходит не непрерывно, а дискретно. При этом разность энергий ΔE между двумя ближайшими энергетическими состояниями определяется уравнением (1), или

$$\Delta E = \Delta E_{эл} + \Delta E_{кол} + \Delta E_{вр}. \quad (2)$$

Обычно $\Delta E_{эл} \gg \Delta E_{кол} \gg \Delta E_{вр}$ и таким образом, переходы между соответствующими энергетическими уровнями лежат в различных частотных диапазонах, это облегчает их исследование и интерпретацию.

На рис. 71 представлены различные спектральные области электромагнитного излучения. Границы спектральных областей условны, но общеприняты. Спектральные диапазоны характеризуются длиной волны и другими спектральными параметрами:

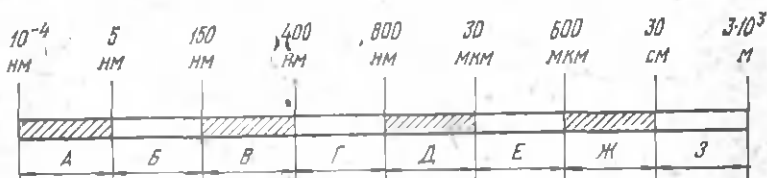


Рис. 71. Спектральные области электромагнитного излучения.

Диапазоны: А — рентгеновские и γ -лучи; Б — вакуумная УФ-область; В — ближняя и дальняя УФ-область; Г — видимая область; Д — ближняя ИК-область; Е — дальняя ИК-область; Ж — СВЧ-колебания; З — радиоволны.

λ — длина волны ($1 \text{ м} = 10^2 \text{ см} = 10^6 \text{ мкм} = 10^9 \text{ нм}$);

ν — частота; $\nu = \frac{c}{\lambda}$, где c — скорость света, м/с; λ —
длина волны, м;

ν — волновое число; $\nu = \frac{1}{\lambda}$, где λ — длина волны, см.

В различных разделах молекулярной спектроскопии рассматриваются законы взаимодействия излучения того или иного спектрального диапазона с веществом:

$\lambda < 5 \text{ нм}$ — рентгеноструктурный анализ;

ультрафиолетовая (УФ) и видимая область — спектрофотометрия в области электронных переходов и люминесценция;

инфракрасная (ИК) область — спектрофотометрия в области колебательных переходов;

СВЧ-область — спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР);

СВЧ и радиодиапазон — спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

В настоящем пособии рассматриваются физические основы и применение методов, изучающих взаимодействие видимого, УФ- и ИК-излучения с веществом.

Рассмотрим вопрос о том, в изменении каких параметров электромагнитного излучения должно проявиться его взаимодействие с изучаемым веществом.

Обычно каждому электронному энергетическому уровню молекулы соответствует несколько колебательных энергетических уровней, каждому из которых в свою очередь соответствует несколько вращательных энергетических уровней. Поэтому молекулярные спектры имеют не линейчатый характер, как атомные спектры, а представляют собой ряд полос с более или менее размытой тонкой структурой.

На рис. 72 вращательные уровни представлены только для колебательного уровня I-1, но подобная система вращательных уровней свойственна каждому колебательному уровню. Стрелки I-0 \rightarrow II- n соответствуют поглощению энергии, стрелки II-0 \rightarrow I- n — излучению.

Как видим на рис. 72, энергетические переходы осуществляются с нулевого колебательного уровня данного электронного уровня. Это объясняется тем, что заполнение колебательных уровней подчиняется статистике Максвелла — Больцмана:

$$n_i = n_0 e^{-E_i/KT}, \quad (3)$$

где n_i — число молекул на i -м колебательном уровне; n_0 —

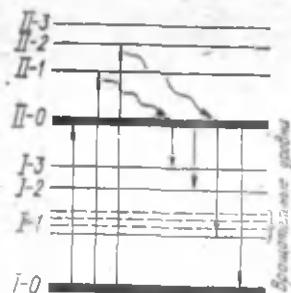


Рис. 72. Схема энергетических уровней и электронно-колебательных переходов в молекуле при поглощении (\uparrow) и излучении (\downarrow) света:

I-1; I-2, I-3, II-1, II-2 — колебательные уровни соответствующих энергетических уровней.

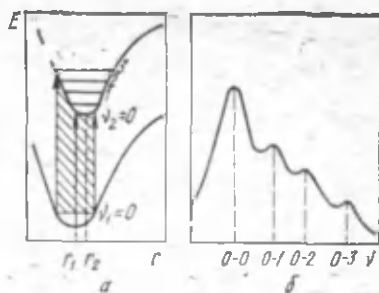


Рис. 73. Наиболее вероятные по принципу Франка — Кондона переходы с поглощением энергии между основным и возбужденным состоянием двухатомной молекулы (а) и спектр поглощения той же молекулы с полосами, соответствующими переходам с нулевого колебательного уровня основного состояния на один из колебательных уровней возбужденного состояния (б):

v_1 — колебательные уровни основного v_1 и возбужденного v_2 состояний; r — расстояние между атомами.

общее число молекул; E_i — колебательная энергия, соответствующая i -му уровню; K — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура.

При комнатной температуре в основном заполняется нулевой колебательный уровень. При электронном переходе колебательный уровень может изменяться (рис. 72). Объясняет это явление принцип Франка — Кондона, согласно которому в силу большой массы ядер и большой скорости перехода за время электронного перехода положение ядер атомов, входящих в состав молекулы, не изменяется. При этом происходят переходы с поглощением энергии между двумя электронными состояниями двухатомной молекулы и формируется соответствующий этим переходам спектр поглощения (рис. 73).

В зависимости от взаимного расположения потенциальных кривых возбужденного и невозбужденного электронных состояний можно судить, в каком колебательном состоянии окажется возбужденная молекула.

Потенциальные кривые молекулы для возбужденного и невозбужденного состояний сдвинуты друг относительно друга. Поэтому состоянию с минимальной энергией отвечают межъядерные расстояния r_1 и r_2 для невозбужденного и возбужденного состояний молекулы соответственно. Так

как в силу принципа Франка — Кондона межъядерные состояния не успевают измениться за время, в течение которого происходит поглощение энергии, то переходу с нулевого колебательного уровня основного состояния может соответствовать переход молекулы на 0-й, 1-й, 2-й и 3-й колебательные уровни возбужденного состояния (заштрихованная область на рис. 73, а). Эти же переходы проявятся в спектре поглощения молекулы (рис. 73, б). Интенсивность каждой полосы в спектре поглощения пропорциональна вероятности соответствующего электронного перехода.

Обычно для характеристики полосы поглощения вещества используют специальный параметр, называемый силой осциллятора f :

$$f = 4,33 \cdot 10^{-9} \int \epsilon(\nu) \cdot d\nu,$$

где $\epsilon(\nu)$ — коэффициент поглощения вещества на частоте ν .

Таким образом, сила осциллятора пропорциональна интегралу функции, описывающей спектр поглощения исследуемого вещества. Обычно этот интеграл вычисляют графически, измеряя площадь, ограниченную спектром поглощения. Часто также используют приближенный способ, принимая $\int \epsilon(\nu) \cdot d\nu \approx \epsilon_{\max} \Delta\nu_{1/2}$, где ϵ_{\max} — поглощение в максимуме спектра поглощения, а $\Delta\nu_{1/2} = \nu_1 - \nu_2$ — полуширина спектра (ν_1 и ν_2 — частоты на крыльях спектра, при которых $\epsilon = 1/2 \epsilon_{\max}$).

В какой же области электромагнитного спектра следует ожидать поглощения энергии исследуемым веществом? Так как поглощение энергии молекулой носит резонансный характер, то поглощаться будет излучение с частотой, соответствующей собственным частотам молекулы при изменении электронных, колебательных и вращательных состояний. Эти частоты можно приблизительно рассчитать так. Молекула состоит из двух типов частиц (ионов и электронов), которые можно охарактеризовать зарядом, массой и расстоянием между частицами. Рассмотрим тело с зарядом e массой m , вращающееся вокруг тела с тем же зарядом и массой на расстоянии r . Так как система находится в равновесии, то очевидно, что кулоновская сила равна центростремительной силе, т. е.:

$$\frac{e^2}{r^2} = m\omega^2 r,$$

где ω — круговая частота.

Учитывая, что $\omega = 2\pi\nu$, после преобразований получим:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m}},$$

где $K = \frac{e^2}{r^3}$.

Подставляя значения e и m для электрона, получим: $\nu \approx 10^{15} \text{ с}^{-1}$, что соответствует $\lambda \approx 100 \text{ нм}$. Для ионов масса примерно в 10^4 раз больше, чем масса электрона и $\nu = 10^{13} \text{ с}^{-1}$, что соответствует $\lambda \approx 10 \text{ мкм}$.

Следовательно, электронные переходы молекул должны проявиться в поглощении электромагнитного излучения в УФ-диапазоне, а колебательные переходы — в инфракрасном, что и наблюдается на практике.

Поглотив квант энергии, молекула переходит из основного состояния в возбужденное. Однако в этом новом состоянии молекула находится лишь малый промежуток времени и возвращается в основное невозбужденное состояние. При этом может происходить выделение кванта энергии. Соответствующие энергетические переходы изображены на рис. 72. Более подробный анализ изменения энергетического состояния молекулы при выделении кванта энергии будет приведен в § 22.

§ 21. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Спектрофотометрия в области электронных переходов

Электроны в молекуле обладают различной энергией и в соответствии с этим признаком могут быть классифицированы. Выделяют три типа электронов, способных к поглощению электромагнитного излучения: σ -, π - и n -электроны.

В составе молекулы часть электронов взаимодействует более чем с одним атомным ядром, в результате между атомами образуется химическая связь. Результирующая волновая функция связывающих электронов называется молекулярной орбиталью (МО). В сложных молекулах встречаются молекулярные орбитали двух типов: локализованные, принадлежащие только двум ядрам (σ -орбитали, образованные σ -электронами), и делокализованные, охватывающие более двух ядер, а в некоторых случаях принадлежащие всей молекуле (π -орбитали, образованные π -электронами).

Делокализованные π -орбитали характерны для ароматических соединений, например бензола, азотистых оснований (пуринов и пиримидинов), ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина), стероидных гормо-

нов и др. Простая одинарная связь — это обычно σ -связь, она образуется за счет перекрывания атомных s -орбиталей. Эта связь расположена вдоль оси, связывающей атомы молекулы, и не ослабляется при вращении вокруг этой оси. Двойная и тройная химические связи образуются за счет σ -связи и одной или двух π -связей. π -связи образуются за счет перекрывания атомных p -орбиталей, которые эффективно перекрываются только при определенной пространственной ориентации атомов. Следовательно, π -связь образуется лишь между определенным образом фиксированными в пространстве атомами и вращение вокруг нее невозможно. Это объясняет плоский характер ароматических соединений, пептидной связи и т. д. Одним из видов локализованных орбиталей является n -орбиталь. Она напоминает атомную орбиталь тем, что электрон, образующий эту орбиталь, в основном принадлежит одному атому и очень слабо взаимодействует с другими. Таким образом, n -орбиталь не является связывающей орбиталью.

При поглощении фотона электроны молекулы могут образовывать антисвязывающие (разрыхляющие) σ^* - и π^* -орбитали. Следовательно, систему молекулярных энергетических уровней можно изобразить так, как показано на рис. 74. Электроны, занимающие разрыхляющие орбитали, называются возбужденными. Переход электронов в возбужденное состояние может осуществляться только при поглощении фотона, величина энергии которого соответствует длине стрелок на рис. 74 и определяется равенством (1).

Как следует из рис. 74, возможны электронные переходы:

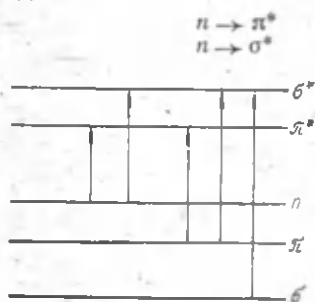


Рис. 74. Схема переходов между основным и возбужденным состояниями σ -, π - и n -электронов.

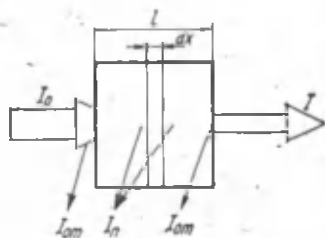


Рис. 75. Схема прохождения света через поглощающий раствор в кювете:

I_0 — интенсивность падающего светового потока; I — интенсивность светового потока, прошедшего через раствор; $I_{от}$ — интенсивность светового потока, отраженного от стенок кюветы; $I_{п}$ — интенсивность поглощенного светового потока.

Совокупность этих переходов образует электронный спектр поглощения молекулы. Переходы на σ^* -энергетический уровень возможны лишь при поглощении фотонов с высокой энергией и соответствующая часть спектра поглощения лежит в далекой (вакуумной) УФ-области, т. е. при $\lambda < 200$ нм. Переходы же $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ обычно определяют поглощение молекулы в видимой и ближней УФ-области спектра и представляют наибольший интерес для спектрофотометрии биологических макромолекул.

Рассмотрим количественные закономерности поглощения электромагнитного излучения веществом на примере прохождения света через поглощающий раствор в кювете (рис. 75).

Величина $I_{от}$ обычно мала по сравнению с $I_{п}$, поэтому в дальнейшем ее учитывать не будем. Выделим элемент объема вещества с шириной dx на пути светового потока. Тогда часть светового потока, поглощенную этим элементом объема, можно обозначить через dI . При этом dI будет пропорционально dx , концентрации вещества в данном объеме c и интенсивности светового потока I . Следовательно, можно записать:

$$dI = -\epsilon' c I dx,$$

где ϵ' — коэффициент пропорциональности, а знак минус означает уменьшение интенсивности светового потока.

Преобразуем и проинтегрируем уравнение:

$$\begin{aligned} \frac{dI}{I} &= -\epsilon' c dx, \\ \int \frac{dI}{I} &= -\int \epsilon' c dx, \\ \ln I &= \epsilon' c x \Big|_0^l + k, \end{aligned}$$

где k — постоянная интегрирования; l — длина светового пути.

Определим k при начальных условиях: $l=0$. В этом случае $k = \ln I_0$ и, значит, $\ln I = -\epsilon' c l + \ln I_0$, или $\ln I_0 / I = \epsilon' c l$. Обозначив $\lg I_0 / I = \frac{1}{2,303} \ln I_0 / I = D$ и $\epsilon = \frac{1}{2,303} \epsilon'$, получим:

$$D = \epsilon c l, \quad (4)$$

где D — оптическая плотность вещества.

Полученная формула является математическим выражением закона Бугера — Ламберта — Бера — основного закона фотометрии, описывающего поглощение света веществом в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра. Следует помнить, что сравнение результатов измерений возможно лишь для измерений, сделанных при одной и той же длине волны λ . Для разных λ будет отличаться коэффициент ϵ .

Физический смысл ϵ_λ заключается в следующем. Положим $l=1$ см, $c=1$ моль/л, тогда $\epsilon_\lambda=D$ ($\text{см}^{-1}\cdot\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}$) и называется коэффициентом молярной экстинкции.

Таким образом, коэффициент молярной экстинкции — это оптическая плотность вещества с концентрацией 1 моль/л при длине светового пути 1 см. Часто в справочниках приводится величина не ϵ_λ , а $\epsilon_\lambda^{1\%}$ — оптическая плотность 1%-ного раствора вещества.

Закон Бугера — Ламберта — Бера лежит в основе определения концентрации исследуемого вещества по величине его оптической плотности. Однако здесь необходимо учитывать следующее:

1. Область прямой зависимости между оптической плотностью и концентрацией. Часто, особенно для концентрированных растворов, зависимость между c и D нелинейна. Обычно это связано с межмолекулярными взаимодействиями в растворе. Поэтому для измерений следует использовать разбавленные растворы.

2. Точность и чувствительность спектральных измерений. Хотя для спектрометрических измерений можно выбрать любую длину волны в области спектра поглощения исследуемого вещества, однако точность и чувствительность измерений при этом будет неодинаковой.

Как следует из рис. 76, ΔD , измеренные при λ_{max} и λ_{min} , для одной и той же величины Δc различны и измеренная при λ_{max} величина ΔD больше. Следовательно, наивысшая точность измерений оптической плотности достигается при измерении в области максимума спектра поглощения исследуемого вещества.

Аппаратура, применяемая в спектрофотометрии. Схема для спектрофотометров, работающих в любой области спектра, общая (рис. 77), но конструкция отдельных узлов изменяется. Так, для измерений в ИК-области нужны другие источники излучения, монохроматоры и регистрирующие устройства, чем для измерений в видимой или УФ-областях спектра. Но в основном в спектрофотометрии, люминесцентной спектроскопии и спектрополяриметрии

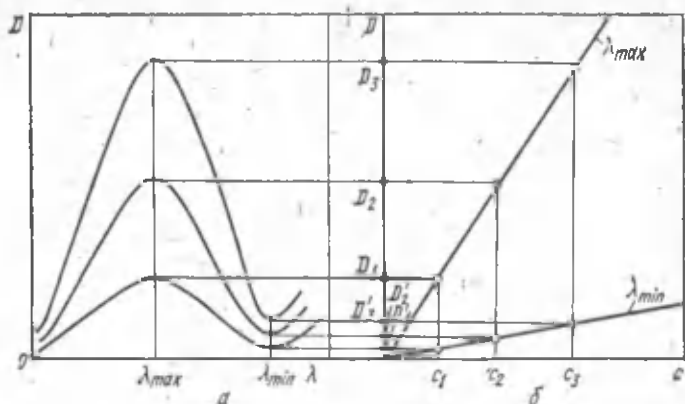


Рис. 76. Сравнение точности измерения оптической плотности раствора и определение концентраций при различных длинах волн:

a — спектры поглощения растворов одного вещества трех разных концентраций; *b* — зависимость оптической плотности раствора от длины волны измерения при λ_{max} и λ_{min} спектров, изображенных на графике *a*: $\Delta c = c_2 - c_1$; $\Delta D = D_2 - D_1$; $\Delta D' = D_2' - D_1'$.

применяются одинаковые или сходные конструктивные элементы.

Источники излучения. Классифицировать источники излучения можно, используя их различные характеристики: спектральный диапазон, изменение излучаемой энергии во времени, физические явления, лежащие в основе излучения, качество спектра, конструктивные особенности и др. В данном случае рассматриваются газоразрядные источники света УФ- и видимого диапазона, применяемые в оптических исследованиях. Технические характеристики некоторых из них приведены в табл. 5 и 6.

Обычно источники сплошного спектра применяют для измерения спектра поглощения.

Лампы накаливания. Все нагретые тела испускают электромагнитное излучение, спектральное распределение которого зависит от температуры источника. Чаще всего в качестве материала для таких источников использу-

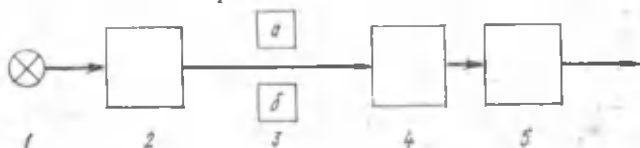


Рис. 77. Блок-схема спектрофотометра:

1 — источник излучения; 2 — монохроматор; 3 — блок с измерительной (*a*) и эталонной (*b*) кюветами; 4 — приемник излучения; 5 — регистрирующий прибор.

Таблица 5. Технические характеристики промышленных ламп накаливания

Тип лампы	Напряжение питания, В	Мощность, Вт	Световой поток, лм	Габаритная яркость, Мвт	Тип тела накала	Размер тела накала, мм	Диаметр колбы, мм	Длина лампы, мм	Средний срок службы, ч	Рабочее напряжение
СП-61	8	20	250	6,5	Спираль	∅20×2,8	21	56	100	Любое
КЭО	17	170	4420	29,5	Плоская спираль	6,5×4,3	27	155	20	Вертикальное
ОП12-100	12	100	2500	17,6	То же	5,5×2,5	51	88	25	Любое
СИ6-100	6	100	1300	8,7	Лента	2,1×8,5	45	155	200	Вертикальное
СИ8-200	8	200	—	9,6	Лента	2,1×10,5	85	110	300	То же
КГМ27-100	27	100	3450	—	Плоская спираль	2×6	10,8	85	15	→
КГМ9-75	9	75	2200	35	То же	2,6×2,6	10,8	42	55	→
КГМ10-90	10 (12)	90 (117)	2000(3400)	30(35)	Спираль	∅1,9×3,5	10,8	47	200(25)	→
КГМ12-100	12	100	3000	32	Плоская спираль	4×2,3	11	45	100	→
КГМ-6-15	6	15	210	12	Спираль	∅1×1,6	6	32	200	→

Таблица 6. Технические характеристики промышленных газоразрядных ламп

Тип лампы	Напряже- ние пита- ния, В	Напряже- ние на лампе, В	Мощ- ность, Вт	Рабочий ток, А	Световой поток, лм	Яркость в центре разряда, Мкг	Диаметр колбы, мм	Длина лампы, мм	Расстоя- ние между электрод- дами, мм	Срок службы, ч	Рабочее положение
ДРШ-100-2	60—120	20	100	5	—	1000	12	85	0,46	100	Вертика- льное
ДРШ-250-3	27	65	250	4	12500	100	25,5	145	4,3	250	То же
ДРШ-250-2	60—100	35	250	7	—	—	18	115	1,1	—	»
ДРШ-250-2М	60—100	35	250	7	—	—	18	115	2,5	—	»
ДРШ-200	70—100	50	200	4	—	—	15	120	2,4	—	»
СВД-120А	220	100	120	1,2	4200	—	12	140	30	250	Любое
ДКсШ-120	50—70	14	120	8,5	2000	—	12	102	0,5	100	Вертика- льное
ДКсШ-150	60—80	15	150	10	2300	400	15	102	1,0	200	То же

ется вольфрам. Максимум спектра излучения ламп накаливания обычно лежит в ближней ИК-области, но значительная часть энергии излучается также в видимой и даже УФ-областях спектра. Главная область применения ламп накаливания — спектрофотометрия в видимой и ближней УФ (до 300 нм)-областях спектра.

Водородные лампы. Водородные лампы могут быть высоковольтными (рабочее напряжение 2—3 кВ) и низковольтными (рабочее напряжение 20—30 В). В настоящее время чаще всего применяются низковольтные лампы.

Спектральная область излучения водородной лампы — 165—500 нм. Наибольшая энергия излучается при длинах волн менее 300 нм. Недостатком водородных ламп является малая мощность излучения, поэтому чаще всего они применяются в спектрофотометрии. В последнее время используются лампы, наполненные дейтерием, которые эффективнее водородных в области спектра 250—190 нм.

Газоразрядные лампы сверхвысокого давления. Лампы, наполненные инертными газами под высоким давлением, при электрическом разряде дают почти равномерный яркий сплошной спектр, на фоне которого слабо выделяются линии газов. Распределение энергии в спектре излучения таких ламп близко к солнечному и захватывает видимую и УФ-области спектра. Особенно часто применяются лампы, наполненные ксеноном. При работе в дальней УФ-области спектра применяются лампы, наполненные другими инертными газами.

Основными источниками линейного спектра являются ртутные лампы высокого и сверхвысокого давления. Ртуть имеет небольшое число ярких спектральных линий в УФ-, видимой и ближней ИК-областях спектра. Вводя в колбу разное количество ртути, можно создавать лампы, имеющие давление от 10^{-3} до 105 мм рт. ст. В спектроскопии часто применяют ртутные лампы ДРШ-250-2 и СВД-120А, спектральная яркость которых различна (рис. 78).

Импульсные лампы. Импульсные лампы предназначены для получения импульсных вспышек длительностью 10^{-2} — 10^{-6} с. Лампы обычно имеют трубчатую или шаровую форму и заполнены ксеноном под высоким давлением. Спектр излучения импульсных ламп зависит от мощности вспышки. При малой мощности вспышки спектр излучения близок к спектру ксеноновых ламп сверхвысокого давления. Импульсные лампы могут предназначаться для одиночных вспышек или для вспышек с определенной частотой.

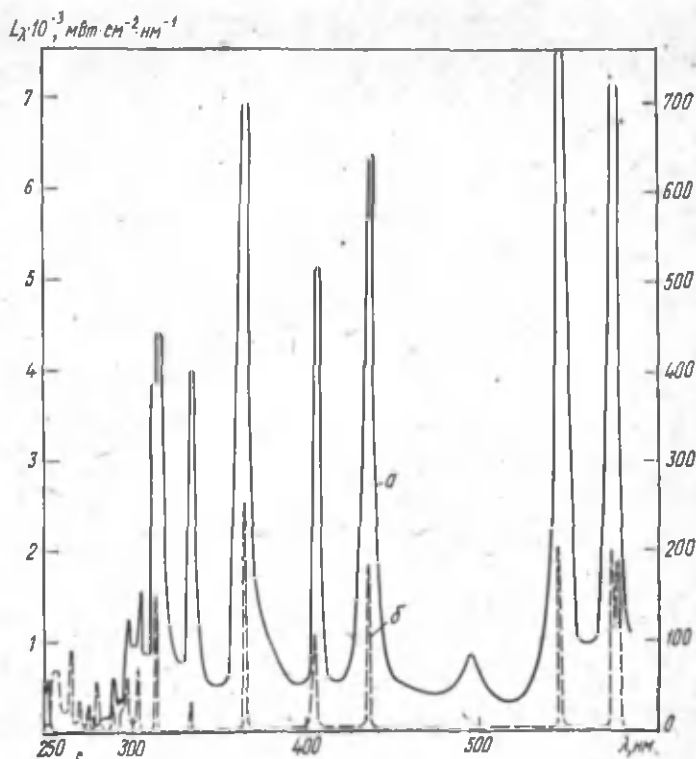


Рис. 78. Распределение яркости в спектре ртутных ламп ДРШ-250-2 (а) и СВД-120А (б) (по Л. С. Агроскину, 1978).

Светофильтры и монохроматоры. Светофильтрами называются устройства, меняющие спектральный состав или энергию падающей на них световой волны.

Монохроматором называется спектральный прибор, выделяющий излучение в некотором, обычно узком, интервале длин волн, который можно непрерывно перемещать по спектру.

Светофильтры и монохроматоры являются основным оптическим элементом любого спектрального прибора.

Выделяют следующие типы фильтров:

1. Абсорбционные фильтры. Ослабление света в них происходит за счет поглощения светового потока веществом фильтра.

2. Дисперсионные фильтры. Ослабление света в них зависит от изменения показателя преломления вещества с длиной волны.

Таблица 7. Светофильтры, выделяющие участки ультрафиолетовой и видимой областей спектра $T_{\max}=30\%$ (по А. Н. Зайдель и др.)

λ при T_{\max} , нм	$\Delta\lambda/2$	Марки стекла	Толщина стекла, мм, или λ пр., нм	λ при T_{\max} , нм	$\Delta\lambda/2$	Марки стекла	Толщина стекла, мм, или λ пр., нм
300	36	ЖС20 УФС5	5,0 4,0	510	30	ЖС17 (18) СЗС22	$\lambda_{\text{пр}}502$ 12,0
315— —320	28	ЖС3 УФС5	1,2 6,0	520	32	СЗС20 ЖС18	1,35 $\lambda_{\text{пр}}512$
340	38	БС4 БС6	2,2 1,6	530	35	СЗС22 ЖС18	11,0 $\lambda_{\text{пр}}523$
360	28	УФС2 БС7 УФС2	12,5 1,8 4,4	540	30	(ОС11) СЗС22 ОС11	6,25 — $\lambda_{\text{пр}}530$
380	24	БС8 УФС6	2,35 4,5	550	28	СЗС22 ПС7 ОС11	4,1 2,0 $\lambda_{\text{пр}}537$
400	26	ЖС10 ПС13	$\lambda_{\text{пр}}395$ 2,3	560	25	СЗС22 ПС7	3,0 3,0
410	34	ЖС10 ПС11	$\lambda_{\text{пр}}405$ 13,5	570	20	ОС12 ЗС7	$\lambda_{\text{пр}}545$ 3,0
420	42	СЗС21 ЖС10 ПС11	1,0 $\lambda_{\text{пр}}415$ 7,5	580	35	СЗС22 ОС13 ЗС7	1,9 $\lambda_{\text{пр}}563$ 3,0
430	35	СЗС21 ЖС11 ПС11	2,0 $\lambda_{\text{пр}}425$ 5,0	590	35	СЗС21 ОС14 ЖЗС18	4,0 $\lambda_{\text{пр}}570$ 10,0
440	30	СЗС21 ЖС11 (12) ФС6	2,5 $\lambda_{\text{пр}}430$ 1,86	600	32	СЗС21 ОС14 ЖЗС18 КС10	1,6 $\lambda_{\text{пр}}580$ 10,0 1,96 $\lambda_{\text{пр}}590$
450	34	СЗС21 ЖС11 (12) СС15	1,5 $\lambda_{\text{пр}}440$ 3,4	620	50	ЖЗС18 КС11 СЗС23	9,5 $\lambda_{\text{пр}}608$ 3,25
460	38	ЖС12 СС15	$\lambda_{\text{пр}}447$ 2,45	640	56	КС13 СЗС23	$\lambda_{\text{пр}}628$ 1,5
470	25	СЗС21 ЖС16 СС5	2,0 $\lambda_{\text{пр}}462$ 3,5	660	60	СЗС25 КС14 СЗС25	1,9 $\lambda_{\text{пр}}644$ 4,5
480	30	СЗС21 ЖС16 СЗС20	2,0 $\lambda_{\text{пр}}472$ 9,5	680	56	КС17 СЗС26 КС13	$\lambda_{\text{пр}}666$ 13,5
490	34	СЗС21 ЖС17 (18) СЗС20	1,2 $\lambda_{\text{пр}}482$ 7,05	700	60	ЗС7 СЗС26	—
500	35	СЗС21 ЖС17 (18) СЗС22 СЗС20	1,5 $\lambda_{\text{пр}}490$ 10,0 3,2				$\lambda_{\text{пр}}$ не нормируется 5,0 8,1

3. Интерференционно-поляризационные фильтры. Действие этих фильтров основано на интерференции поляризованных лучей света.

4. Интерференционные фильтры. Применение этих фильтров основано на интерференции параллельного луча, отраженного двумя зеркалами, расположенными на очень малом промежутке (порядка длины волны).

5. Отражающие фильтры. Действие этих фильтров основано на избирательном отражении света с определенной длиной волны.

Наиболее доступными и широко распространенными являются абсорбционные фильтры.

Пропускание некоторых из широко применяемых стеклянных светофильтров показано в табл. 7 и приложении 1. Путем набора определенных комбинаций стеклянных светофильтров можно выделять довольно узкую спектральную область.

Растворы некоторых веществ пропускают свет только определенного спектрального диапазона и могут быть использованы в качестве светофильтров. На рис. 79 показано пропускание некоторых жидкостей, а на рис. 80 — пропускание растворов некоторых веществ, используемых в видимой и УФ-областях спектра.

В спектроскопии применяются следующие типы монохроматоров:

1. Двойные монохроматоры. В этом случае в одном приборе применяются два последовательно соединенных монохроматора, у которых выходная щель первого служит входной щелью второго. Преимуществом двойных монохроматоров является ослабление рассеянного света.

2. Призмённые монохроматоры. Диспергирующий элемент у призмённых монохроматоров — стеклянная (для видимой области) или кварцевая (для УФ-области) призма. Основным недостатком призмённых монохроматоров является неравномерная дисперсия, так как показатель преломления стекла или кварца отличается для света с разной длиной волны.

3. Монохроматоры с дифракционной решеткой. Диспергирующий элемент у этого типа монохроматора — дифракционная решетка. В зависимости от спектральной области, в которой используется монохроматор, применяются дифракционные решетки с различной частотой нанесения штрихов на рабочую поверхность. Часто в спектральном анализе используются монохроматоры со сменными дифракционными решетками. Обычно решетки имеют 2400, 1200, 600 и 300 штрихов/мм.

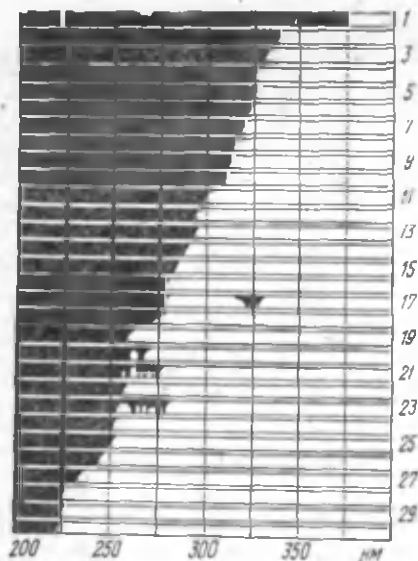


Рис. 79. Пропускание различных жидкостей в УФ-области спектра (по А. Н. Зайделю, 1972):

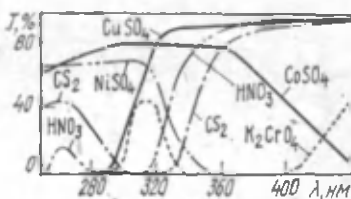
1 — сероуглерод; 2 — бензиловый спирт; 3 — пиридин; 4 — ацетон; 5 — тералин; 6 — этилметилкетон; 7 — амиловый спирт; 8 — бензин; 9 — этилацетат; 10 — н-бутиловый спирт; 11 — бензойный этил; 12 — петроляты; 13 — лигроин; 14 — кислород; 15 — толуен; 16 — бензол; 17 — бутилацетат; 18 — этилпропионат; 19 — четыреххлористый углерод; 20 — этилформиат; 21 — этилацетат; 22 — муравьиная кислота; 23 — амилацетат; 24 — уксусная кислота; 25 — изопропиловый спирт; 26 — хлороформ; 27 — глицероль; 28 — серный эфир; 29 — метиловый спирт; 30 — этиловый спирт.

Таблица 8. Технические характеристики фотоэлектронных

Параметры	ФЭУ-17А	ФЭУ-18А	ФЭУ-19А	ФЭУ-22	ФЭУ-27 (32)	ФЭУ-28
Максимальный диаметр, мм	48,5	48,5	48,5	48,5	30	34,5
Максимальная длина, мм	181	181	200	181	108	122
Диаметр катода, мм	16×5	16×5	34	16×5	25	25
Область чувствительности, нм	300—600	200—600	300—600	400—1000	300—800	400—1100
Спектральный максимум, нм	360—440	360—440	360—440	650—850	480—520	760—840
Число каскадов	13	13	13	13	11	11
Чувствительность фотокатода, мкА/лм	30	30	25	15	50	25
Порог чувствительности, лм·Гц ^{-1/2}	1·10 ⁻¹²	1·10 ⁻¹²	—	—	5·10 ⁻¹²	7·10 ⁻¹¹
Стабильность работы за 6 ч, %	3	3	3	3	3	3
Длительность фронта импульсов, нс	3	3	5—6	3	4	4
Анодная чувствительность, А/лм	10	10	100	10	1	1
Напряжение питания, В	750	750	1100	1400	1000	1250
Темновой ток, А	2·10 ⁻⁹	2·10 ⁻⁹	2·10 ⁻⁸	2·10 ⁻⁹	3·10 ⁻⁹	7·10 ⁻⁸

Рис. 80. Пропускание растворов некоторых веществ (по А. Н. Зайделю, 1972):

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 57 г/л H_2O , $l=10$ мм;
 K_2CrO_4 , 135 мг/л H_2O , $l=10$ мм;
 HNO_3 , 0,3 н. р-р, $l=10$ мм, $\text{NiSO}_4 \cdot \text{X}$
 $\times 7\text{H}_2\text{O}$, 492 г/л H_2O , $l=20$ мм;
 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 141 г/л H_2O , $l=20$ мм;
 CS_2 , 7 г/л H_2O , $l=10$ мм.



Приемники излучения. В качестве приемников излучения в спектральных приборах обычно используются:

1. Приемники излучения на основе внутреннего фотоэффекта — фоторезисторы, фотодиоды и фототранзисторы.
2. Приемники излучения на основе внешнего фотоэффекта — фотоэлементы и фотоэлектронные умножители (ФЭУ).

Рассмотрим принципы работы, конструкции и основные параметры ФЭУ (табл. 8 и 9).

В современных спектральных установках наиболее распространены приборы, которые содержат не два электрода, как фотоэлемент, а имеют в своем составе многоэлектрод-

умножителей для видимой области спектра

ФЭУ-31А	ФЭУ-37	ФЭУ-38	ФЭУ-51	ФЭУ-62	ФЭУ-64	ФЭУ-69	ФЭУ-79	ФЭУ-12
22,5	48,5	48,5	34	34,5	48,5	23	48,5	51,3
80	178	200	110	122	175	90	175	177
18	34	34	25	10	5	10	6	45
300—	300—	300—	300—	400—	300—	300—	300—	300—
600	600	820	820	1200	600	830	830	750
360—	360—	360—	360—	650—	360—	400—	400—	480±
440	440	440	440	850	440	440	440	20
8	11	13	11	11	11	10	11	12
50	50	100	100	25	50	—	200	50
$7 \cdot 10^{-12}$	—	—	$7 \cdot 10^{-13}$	$4 \cdot 10^{-11}$	—	$5 \cdot 10^{-12}$	$3 \cdot 10^{-13}$	—
3	2,5	3	3	3	2,5	—	3	3
10—20	5—6	5—6	10—20	10—20	4—5	—	—	10
I	10	100	10	1	100	10	100	15
750	800	1800	1300	1100	950	1550	1500	1700
$5 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-9}$	$2 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-10}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$3 \cdot 10^{-9}$	$8 \cdot 10^{-7}$

Таблица 9. Технические характеристики фотоэлектронных умножителей для ультрафиолетовой и видимой областей спектра

Параметры	ФЭУ-39А	ФЭУ-71	ФЭУ-100	ФЭУ-106	ФЭУ-112	ФЭУ-114
Спектральная характеристика	C-15	C-15	—	—	—	—
Область спектральной чувствительности, нм	160—600	160—600	170—830	170—830	230—1100	250—850
Рабочий диаметр фотокатода, мм	—	16	10	6	5	10
Интегральная чувствительность, мкА/лм	25	100	120	180	25	80
Спектральная чувствительность, А/Вт	—	$6,5 \cdot 10^{-2*}$	$5 \cdot 10^{-2*}$	$2 \cdot 10^{-2**}$	—	—
Анодная чувствительность, А/лм	—	1000	1000	1000	10	30
Напряжение питания, В	1200	1250	2300	2000	1500	1400
Темновой ток, А	$3 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-7}$	$5 \cdot 10^{-10}$
Порог чувствительности, лм/Гц ^{1/2}	—	$4 \cdot 10^{-13}$	$5 \cdot 10^{-13}$	$2 \cdot 10^{-13}$	$3 \cdot 10^{-11}$	$6 \cdot 10^{-13}$
Длина, мм	178	30	100	155	75	75
Диаметр, мм	48,5	31	34	48,5	21,5	21,5

* При $\lambda = 410$ нм.** При $\lambda = 694$ нм.

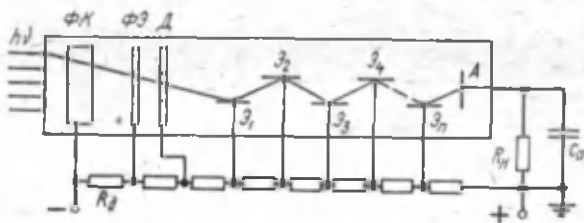


Рис. 81. Принципиальная схема фотоэлектронного умножителя:
 ФК — фотокатод; ФЭ — фокусирующий электрод; Д — диафрагма; Э₁ — Э_n —
 диноды; А — анод; R_д — сопротивление делителя напряжения; R_н — сопротив-
 ление нагрузки; С_д — емкость анода.

ную систему и называются фотоэлектронными умножителями. К системе электродов ФЭУ (динодной системе) приложена разность потенциалов, обеспечивающая вторичную электронную эмиссию из материала динодов, за счет чего происходит усиление фототока. Электромагнитное излучение, попадая на фотокатод (рис. 81), выбивает из материала фотокатода некоторое количество первичных электронов.

Количество электронов, выбиваемых из материала фотокатода в единицу времени, пропорционально числу квантов падающего на фотокатод излучения. Между фотокатодом и первым динодом расположена входная камера ФЭУ, в которой расположены электростатические линзы, осуществляющие фокусировку на первом диноде пучка электронов, выбитых из фотокатода. Эффективность сбора электронов на первом диноде учитывается коэффициентом сбора электронов k . Следовательно, общее число электронов, достигающих первого динода, равно nk . Эти электроны вызывают вторичную электронную эмиссию. Количество вторичных электронов зависит от материала динода и направления фотокатод — первый динод, которое определяет энергию первичных электронов. Общее число вторичных электронов равно $nk\sigma$, где σ — коэффициент вторичной эмиссии. Между динодами ФЭУ приложена разность потенциалов, ускоряющая поток электронов в направлении следующего динода. Обычно разность потенциалов между динодами ФЭУ создается делителем напряжения (рис. 81). На каждом i -м диноде происходит вторичная эмиссия электронов с эффективностью σ_i и потерями, определяемыми коэффициентом γ_i . Поэтому общее число электронов $n_{об}$, собираемых на анод А, равно произведению

$$n_{об} = nk \prod_{i=1}^n \sigma_i \gamma_i,$$

где m — число каскадов умножения. Следовательно, коэффициент усиления ФЭУ M равен:

$$M = \prod_{i=1}^m \sigma_i \gamma_i.$$

Для характеристики ФЭУ важна величина анодного тока, которая равна

$$I_a = I_k \sigma^m,$$

где I_a — анодный ток ФЭУ; I_k — ток, создаваемый первичными фотоэлектронами, выбитыми из фотокатода.

Для современных ФЭУ величина M может достигать нескольких миллионов. Поэтому ФЭУ при необходимости можно использовать в качестве счетчика единичных фотонов.

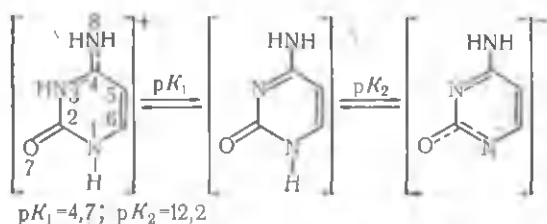
Регистрирующие устройства. Сигнал на выходе ФЭУ при регистрации слабых световых потоков требует дальнейшего усиления и преобразования. С этой целью используются усилители постоянного или переменного тока. Сигнал с выхода усилителя обычно подается на вход электронного потенциометра, который осуществляет запись сигнала на диаграмму. Иногда используют работу ФЭУ в режиме счета импульсов. В этом случае каждый импульс, возникающий в анодной цепи ФЭУ, усиливается и регистрируется счетчиком импульсов.

Описанные выше узлы (источники излучения, монохроматоры, приемники излучения и регистрирующие устройства) включают большинство современных спектральных приборов.

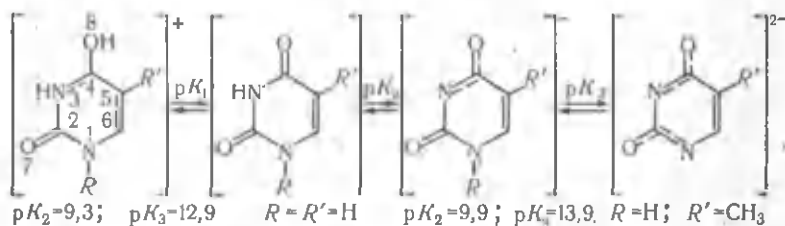
Спектры поглощения нуклеотидов и полинуклеотидов. Известно, что азотистые основания, нуклеозиды, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты эффективно поглощают ультрафиолетовый свет, что дает основание предполагать наличие π - и n -орбиталей в составе этих молекул. Действительно, азотистые основания (пуррины и пиримидины) обладают системой делокализованных π -электронов, а также имеют в составе своих колец гетероатомы азота, обладающие неподеленной парой n -электронов (рис. 82).

На энергетическом состоянии электронов молекулы сказывается ионизация атомных группировок, входящих в ее состав. Кроме того спектры поглощения зависят от таутомерной формы азотистого основания, присутствующей в растворе. Знание особенностей ионной и таутомерной форм азотистых оснований (которые имеют характерные спектры поглощения) важно для объяснения молекулярных механизмов многих биологических процессов.

Ниже приведены кислотно-основные равновесия азотистых оснований:

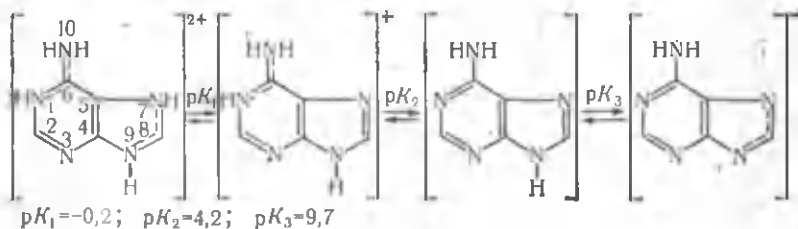


Цитозин

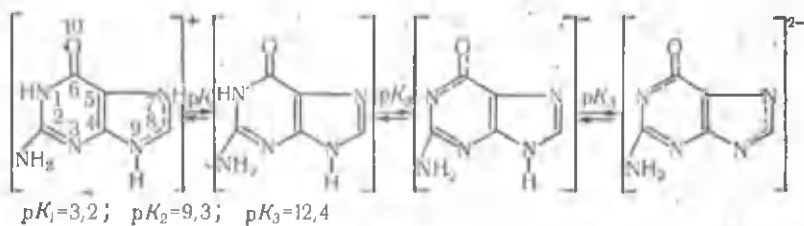


Урацил

Тимин



Аденин



Гуанин

Спектры поглощения этих пяти основных нуклеотидов, входящих в состав нуклеиновых кислот, имеют характерные особенности (рис. 83) и могут быть использованы для первичной идентификации исследуемого вещества. Поглощение нуклеотидов обусловлено в основном $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходами. Эти два перехода различаются по интенсивно-

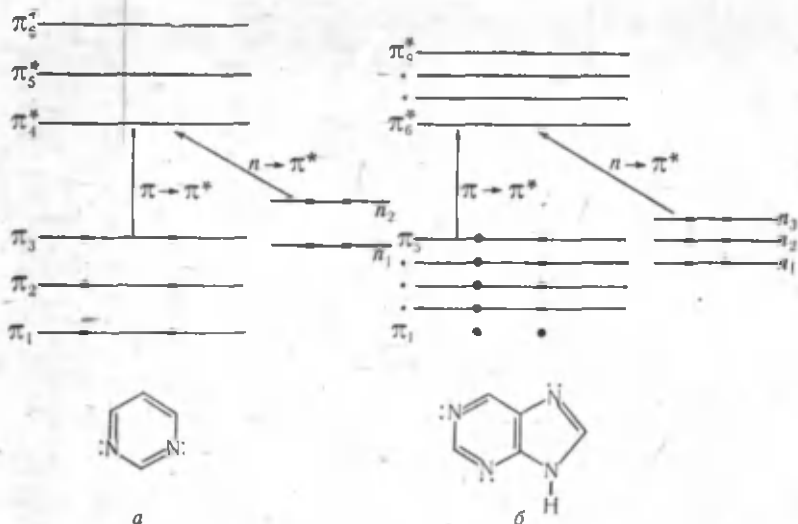
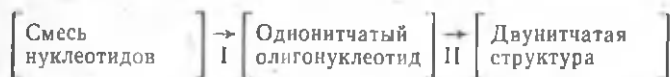


Рис. 82. Схема энергетических уровней пиримидина (а) и пурина (б).
Стрелками указаны $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходы электронов.

сти и поляризации: $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы более интенсивны и поляризованы в плоскости оснований, $n \rightarrow \pi^*$ -переходы менее интенсивны и поляризованы в плоскости, перпендикулярной основаниям. Характерная полоса поглощения с λ_{max} около 260 нм проявляется в результате $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -переходов. Основной вклад при этом дают $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы, а $n \rightarrow \pi^*$ -переходы видны лишь в виде небольшого плеча в длинноволновой области спектра поглощения.

Процесс образования нуклеиновых кислот из нуклеотидов можно представить схемой:



Эта схема отражает лишь типы структур, в состав которых входят азотистые основания и, конечно, не соответствует процессу репликации, в результате которого в клетке из набора нуклеотидов образуется молекула ДНК.

При полимеризации нуклеотидов образуются соединения (олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты), спектр поглощения которых представляет собой сумму спектров поглощения мономерных звеньев. Однако коэффициент экстинкции мономеров уменьшается при включении их в состав полимерной цепи. При образовании двунитчатых структур

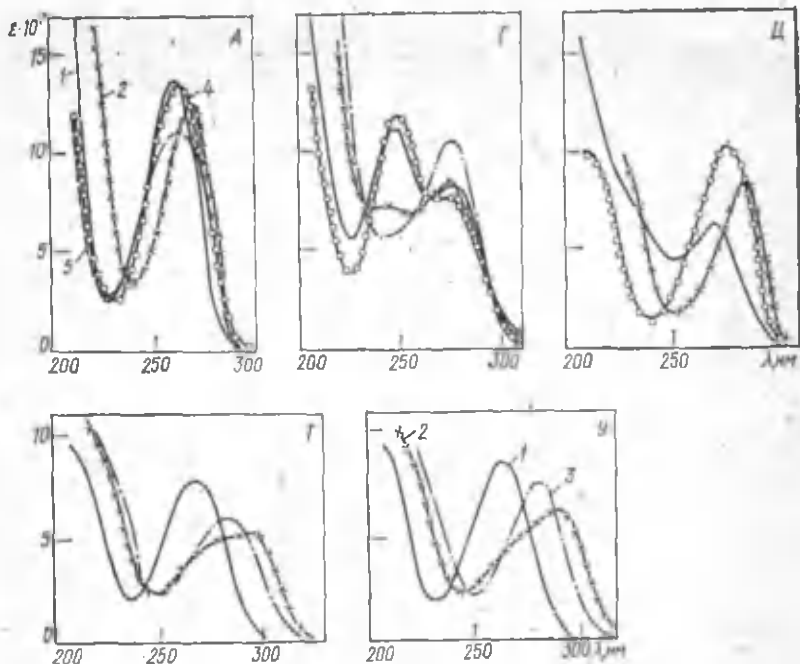


Рис. 83. Ультрафиолетовые спектры поглощения аденина (А), гуанина (Г), цитозина (Ц), тимина (Т) и урацила (У) (по А. В. Бородавкину и сотр., 1977):

1 — нейтральная форма; 2 — моноанион; 3 — дианион; 4 — монокатион; 5 — дикатион.

(ДНК, «шпильки» РНК) коэффициент экстинкции азотистых оснований еще более уменьшается. Такое уменьшение коэффициента экстинкции нуклеотидов при образовании нативной структуры называется гипохромным эффектом *H*. При этом основной вклад в гипохромный эффект дает стадия II (см. схему). Гипохромный эффект обусловлен в основном не образованием водородных связей между комплементарными основаниями, а взаимодействием оснований вдоль цепи (так называемые «стекинг-взаимодействия»). Весь вклад в гипохромный эффект дают $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы, поскольку они, как было указано выше, ориентированы вдоль плоскости оснований. Естественно, что при «плавлении» двуиитчатой структуры изменяется угол между осцилляторами $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходов, что приводит к изменению интенсивности поглощения. Следующий эксперимент подтверждает вышеизложенное: плечо при 280 нм ($n \rightarrow \pi^*$ -переход) в спектрах поглощения нуклеиновых кис-

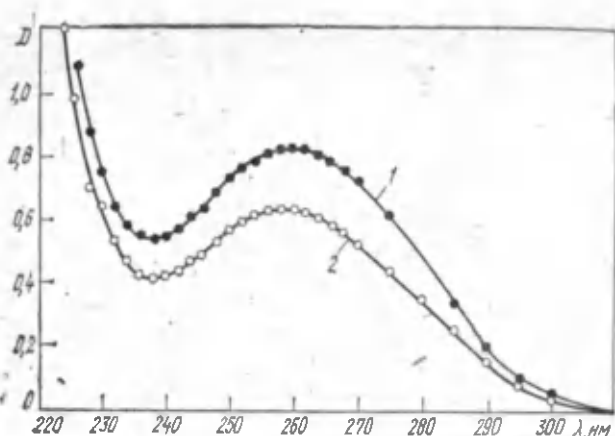


Рис. 84. Изменения спектра поглощения ДНК при гидролизе дезоксирибонуклеазой:

1 — ДНК после гидролиза; 2 — нативная ДНК.

лот не дает вклада в гипохромный эффект при образовании двунитчатой структуры. Величину гипохромного эффекта обычно выражают в процентах:

Если воспользоваться данными рис. 84, то величина гипохромного эффекта H равна:

$$H = \frac{D_n - D_{\text{ДНК}}}{D_n} = \frac{0,82 - 0,62}{0,82} \cdot 100\% \approx 25\%, \quad (5)$$

где D_n — оптическая плотность смеси нуклеотидов, эквивалентной исследуемой ДНК; $D_{\text{ДНК}}$ — оптическая плотность ДНК.

Иногда используют при расчетах понятие гиперхромного эффекта H' . Исходя из тех же данных, он равен:

$$H' = \frac{D_n - D_{\text{ДНК}}}{D_{\text{ДНК}}} = \frac{0,82 - 0,62}{0,62} \cdot 100\% \approx 32\%.$$

Благодаря высокой точности, наличию прецизионных спектрометров, возможности работать с разбавленными водными растворами и другим преимуществам, спектрофотометрические методы широко применяются при исследовании нуклеиновых кислот.

Определение нуклеотидного состава по кривой плавления. Зависимость величины гипохромного эффекта от температуры отражает эффект разрушения внутримолекулярных связей биополимера и переход его в новое «денатурированное» состояние. Процесс этот

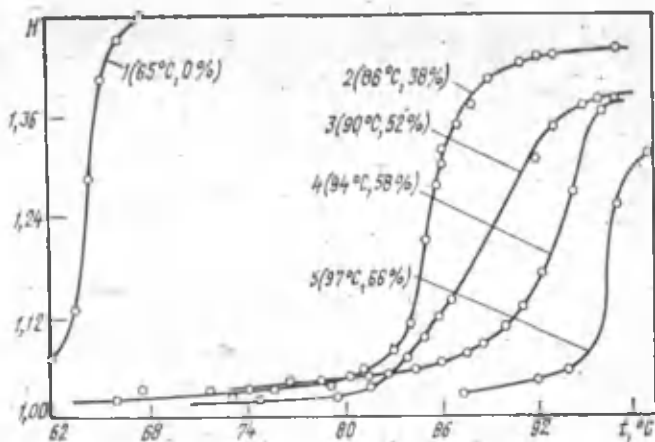


Рис. 85. Плавление двуспиральных молекул ДНК (по Г. Стенту, 1981): 1 — искусственно синтезированная ДНК, содержащая только АТ-пары оснований; 2 — ДНК *Diplococcus pneumoniae*; 3 — ДНК *E. coli*; 4 — ДНК *S. maraesens*; 5 — ДНК *M. phlei*. Цифры в скобках означают температуру плавления и содержание в соответствующей ДНК ГЦ-пар оснований.

кооперативный, подобный фазовому переходу кристалла в жидкое состояние и по аналогии кривая, описывающая этот процесс называется кривой плавления. Для построения кривых плавления пригоден любой метод, регистрирующий относительную концентрацию нативных и «расплавленных» молекул (например, измерение вязкости). Но наиболее удобным для этой цели является измерение оптической плотности.

Зависимость величины гипохромного эффекта для нуклеиновых кислот различного нуклеотидного состава приведена на рис. 85, из которого следует, что с увеличением содержания Г—Ц-пар температура плавления ДНК увеличивается. В определенном диапазоне содержания Г—Ц эту зависимость можно описать уравнением:

$$\Delta\epsilon_{\lambda} = (1 - \alpha) \cdot \Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{АТ}} + \alpha \Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{ГЦ}}, \quad (6)$$

где α — доля ГЦ-пар в составе ДНК; $\Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{АТ}}$, $\Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{ГЦ}}$ — эмпирически найденные коэффициенты, отражающие гипохромный эффект при плавлении АТ и ГЦ в составе ДНК.

Уравнение (6) справедливо в диапазоне $\alpha = 0,3—0,7$. Важно отметить, что величины $\Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{АТ}}$ и $\Delta\epsilon_{\lambda}^{\text{ГЦ}}$ нельзя определить из кривых плавления синтетических полинуклеотидов поли(ГЦ) и поли(АТ); эти величины определяются эмпири-

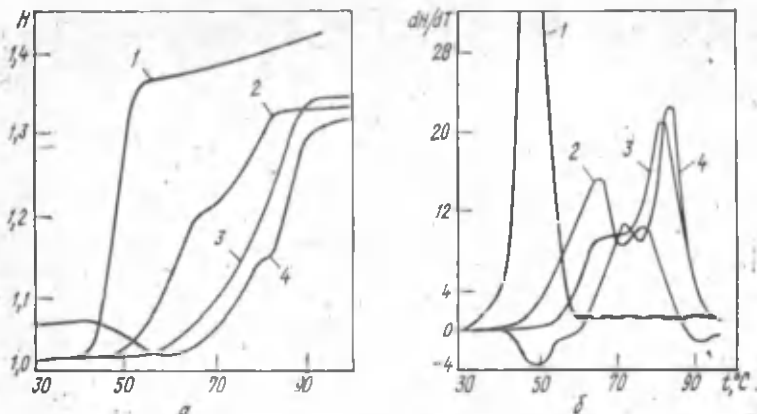


Рис. 86. Кривые плавления (а) и дифференциальные кривые плавления (б) ДНК и хроматина (по А. Т. Ансевину и др. 1971):

1 — ДНК тимуса теленка; 2 — хроматин в 5М растворе мочевины; 3 — хроматин в 2М растворе мочевины; 4 — хроматин без мочевины.

чески из калибровочных графиков, построенных для ДНК с известным содержанием ГЦ.

Дифференциальные кривые плавления нуклеиновых кислот. Если на графике, подобном рис. 85, отложить зависимость не абсолютной величины гипохромного эффекта, а его производную по температуре, то информативность метода значительно возрастает. Вместо незначительных перегибов на кривой плавления дифференциальные спектры обладают выраженной структурой. В настоящее время измерение дифференциальных кривых плавления применяется в основном в двух направлениях.

1. Для изучения структуры сложных нуклеопротеидных комплексов, например хроматина. Так, дифференциальные кривые плавления хроматина тимуса теленка, в различной степени диспергированного в растворе мочевины, (рис. 86, б), имеют три четких максимума, интенсивность которых изменяется при увеличении концентрации мочевины в растворе. В то же время на кривых плавления чистой ДНК и хроматина (рис. 86, а) видны лишь незначительные перегибы.

2. Создание теории, на основании которой можно было бы построить кривые плавления для ДНК с любой заданной последовательностью нуклеотидов. В последнее время в этом направлении достигнуты значительные успехи, связанные, с одной стороны, с усилиями теоретиков и, с другой стороны, с достижениями экспериментаторов, которые расшифровали первичную структуру некоторых природных

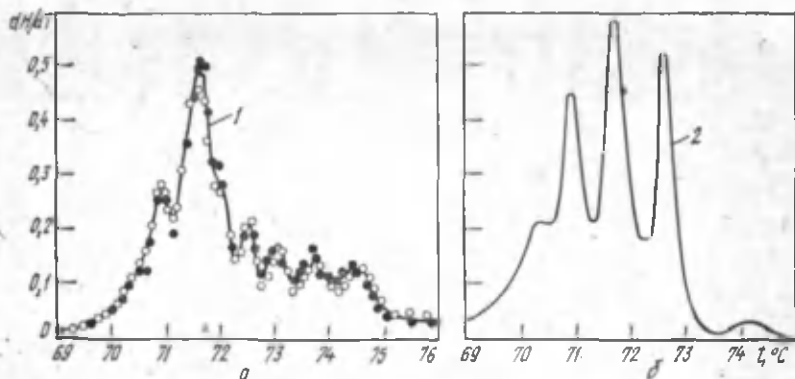


Рис. 87. Экспериментальная (а) и теоретическая (б) дифференциальные кривые плавления репликативной открытой формы ДНК фага фх-174 (по Ю. С. Лазуркину, 1977).

ДНК. Это дало возможность сравнить теоретические кривые плавления, построенные путем анализа известных нуклеотидных последовательностей, с экспериментальными (рис. 87). Основные пики на таких кривых точно совпадают. Экспериментальные и теоретические подходы к изучению тонкой структуры кривых плавления бурно развиваются, и достижения в этой области исследований очень велики. Например, замена одной пары оснований из ста может привести к смещению пика на $0,4^\circ$, что можно измерить в опыте.

Спектрофотометрия белков. Из хромофорных групп, входящих в состав белков, которые определяют их поглощение в УФ-области, назовем пептидную связь и ароматические аминокислоты.

Пептидная (амидная) связь частично двойная, так как π -орбитали локализованы по трем атомам (С, О, N). $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход поляризован в плоскости группы, а $n \rightarrow \pi^*$ -переход запрещен, так как электронные облака n - и π -состояний практически не перекрываются. Амидная группа определяет коротковолновую подосу поглощения белков с $\lambda_{\text{max}} \approx 190$ нм. Полоса эта очень интенсивная: для клубковой конформации $\epsilon_{190} = 6950$ л·моль⁻¹·см⁻¹ из расчета на 1 моль аминокислотных остатков. Следует ожидать, что взаимодействия, в которых участвуют атомы, образующие пептидную связь в белках, скажутся на эффективности поглощения УФ-света этой группы. Действительно, включение амидной группы в состав α -спирали значительно уменьшает интенсивность поглощения: для спиральной конформации $\epsilon_{190} = 4300$ л·моль⁻¹·см⁻¹. Наблюдается гипохромный

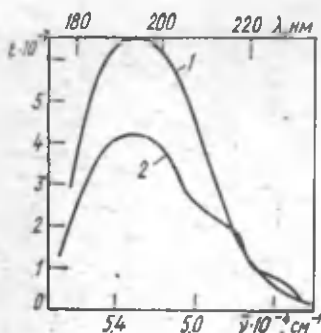


Рис. 88. Спектр поглощения клубкообразной (1) и спиральной (2) поли-L-глутаминовой кислоты.

эффект, подобный тому, который наблюдался при структурных изменениях нуклеиновых кислот.

На рис. 88 приведены спектры поглощения полиглутаминовой кислоты, которая при $\text{pH}=4,9$ имеет вид α -спирали, а при $\text{pH}=8$ — клубковую конформацию. Измеряя гипохромный эффект при 190 нм, удобно фиксировать структурные изменения, которые происходят при конформационных переходах или денатурации белков.

Ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин и фенилаланин) являются основными хромофорами, определяющими поглощение белка при длине волны свыше 220 нм. Кроме того определенный вклад в поглощение белка вносят гистидин и серусодержащие аминокислоты (метионин и цистеин).

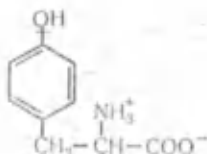
Структурные формулы и коэффициенты молярной экстинкции в экстремальных точках спектров поглощения ароматических аминокислот следующие:

Тирозин

$$\epsilon_{\text{max}(275)} = 1,34 \cdot 10^3$$

$$\epsilon_{\text{min}(245)} = 170$$

$$\epsilon_{\text{max}(222)} = 8 \cdot 10^3$$

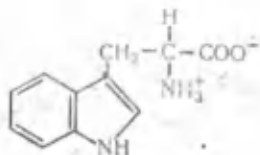


Триптофан

$$\epsilon_{\text{max}(280)} = 5,4 \cdot 10^3$$

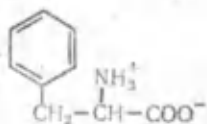
$$\epsilon_{\text{max}(218)} = 33,5 \cdot 10^3$$

$$\epsilon_{\text{min}(243)} = 1,9 \cdot 10^3$$



Фенилаланин

$$\epsilon_{\text{max}(257)} = 195$$



На рис. 89 приведены спектры поглощения ароматических аминокислот.

Таким образом, спектр поглощения белка можно пред-

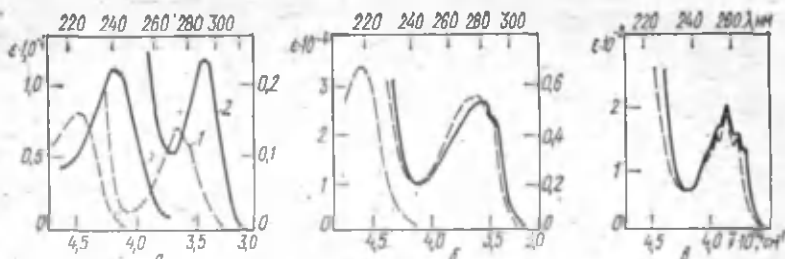


Рис. 89. Спектры поглощения ароматических аминокислот тирозина (а), триптофана (б) и фенилаланина (в):

1 — 0,1 н. раствор HCl; 2 — 0,1 н. раствор NaOH. На графиках шкала справа — коэффициент молярной экстинкции для длинноволновой части спектра, шкала слева — для коротковолновой части спектра.

ставить как интегральную кривую, вклад в которую обеспечивают все перечисленные выше хромофоры. Однако вклад этих хромофоров при различных длинах волн будет различным. Поэтому в спектре поглощения белка можно выделить ряд характерных областей и определить примерный вклад в поглощение различных хромофоров, а также ориентировочный коэффициент молярной экстинкции. При этом основной вклад в поглощение белков при 280 нм дают лишь две аминокислоты — триптофан и тирозин. Величина молярной экстинкции $\epsilon_{280} = 87,7 \cdot 10^3$ является удобным параметром для предварительной оценки концентрации неизвестного белка в растворе (для белка с молекулярной массой 100 000).

Исходя из физической природы электронных спектров поглощения белков, можно определить несколько областей исследования белков, в которых применение метода спектрофотометрии перспективно.

1. Определение концентрации белка и содержания в нем отдельных хромофорных групп.

2. Изучение содержания аминокислотных остатков в спиральных областях молекулы белка по гипохромному эффекту в области 180—200 нм.

3. Оценка состояния хромофора в составе белковой молекулы («доступен» растворителю или «спрятан» внутри глобулы).

При этом используются методы спектрофотометрического титрования, сольвентной и температурной пертурбации и дифференциальной спектрофотометрии.

Рассмотрим методы, позволяющие оценить состояние хромофоров в составе белковой молекулы.

Метод спектрофотометрического титрования. Метод основан на различии в спектрах поглоще-

ния хромофора в нейтральном и ионизированном состояниях. Особенно эффективен метод при исследовании расположения тирозина в составе белковой молекулы, так как в кислой и нейтральной областях рН тирозин имеет спектр с максимумом при 276 нм ($\epsilon = 1,34 \cdot 10^3$), а в щелочной области рН — спектр с максимумом при 295 нм ($\epsilon = 2,35 \times 10^3$) (рис. 89). Следовательно, при изменении рН от 7 до 12 приращение оптической плотности при 295 нм должно быть $2350 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для полностью «доступного» тирозина.

Для остатков тирозина в составе белковой молекулы величина ΔD_{295} будет зависеть от соотношения «экспонированных» и «спрятанных» тирозилов. Таким образом, доля ионизированных тирозилов $n_{\text{тир}}$ будет равна:

$$n_{\text{тир}} = \frac{\Delta \epsilon_{295}^{\text{б}}}{\Delta \epsilon_{295}^{\text{тир}}} \quad (7)$$

где $\Delta \epsilon_{295}^{\text{б}}$, $\Delta \epsilon_{295}^{\text{тир}}$ — приращение оптической плотности при 295 нм для белка и свободного тирозина соответственно.

Выделяют четыре группы белков на основании ионизируемости тирозилов, входящих в их состав:

1. Ионизация тирозилов идет обратимо и с нормальным рК (политирозин, кортикотропин, β -лактоглобулин, инсулин).

2. Ионизация тирозилов обратима, но рК аномально высок (лизозим, сывороточный альбумин).

3. Часть тирозилов ионизируется с нормальным рК, а часть — после денатурации.

К этой группе относится большинство белков.

4. Все тирозилы титруются необратимо.

Как следует из рис. 90, на кривых спектрофотометрического титрования видны характерные точки перегиба, по которым можно оценить количество ионизированных тирозилов, находящихся внутри белковой глобулы и недоступных для действия растворителя. После денатурации эти точки перегиба исчезают и все тирозилы титруются с рК = 9,8–10,0, характерным для свободного тирозина.

Дифференциальная спектрофотометрия. В отличие от метода интегральной спектрофотометрии, при котором оптическую плотность образцов измеряют относительно растворителя, в методе дифференциальной спектрофотометрии измерение оптической плотности исследуемого белка проводят относительно того же белка в эталонных условиях.

Преимущества метода дифференциальной спектроскопии следующие:



Рис. 90. Кривые спектрофотометрического титрования нативной (1), частично денатурированной (2) и полностью денатурированной (3) рибонуклеазы, (по Г. А. Когану, 1973).

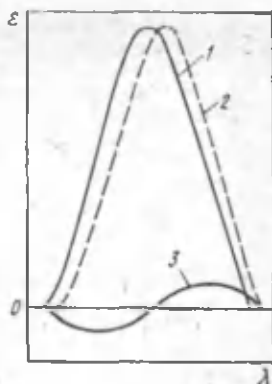


Рис. 91. Механизм возникновения дифференциального спектра поглощения:

1 — спектр поглощения вещества в обычных условиях; 2 — спектр поглощения вещества при воздействии пертурбанта; 3 — дифференциальный спектр поглощения.

1. Возможность выявления эффекта на фоне больших оптических плотностей.

2. Непосредственная регистрация результата воздействия пертурбанта.

3. Повышение точности измерений.

Последний пункт можно проиллюстрировать следующим примером. Пусть сравниваются два образца с оптическими плотностями 1,0 и 1,05. Соответствующие величины пропускания растворов равны:

$$T_1 = \frac{I_1}{I_0} = 0,10 \text{ и } T_2 = \frac{I_2}{I_0} = 0,09.$$

Спектрофотометр позволяет измерять пропускание с погрешностью 1%, т. е. разность $T_1 - T_2$ лежит на границе погрешности метода.

При изменении разностного спектра измеряется пропускание:

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{0,1}{0,09} = 1,11.$$

Различие в пропускании образцов теперь уже на порядок превышает погрешность метода:

$$\frac{I_1}{I_2} - \frac{I_1}{I_1} = 1,11 - 1,0 = 0,11.$$

Часто в раствор с белком вводят небольшое количество нейтрального вещества (пертурбанта) с таким расчетом, чтобы он не изменил структуру белка в растворе, но заметно изменил спектр поглощения тех хромофоров в составе молекулы белка, которые находятся в контакте с растворителем («открыты»). В то же время хромофоры, погруженные вглубь молекулы в гидрофобные области, начинают испытывать влияние пертурбанта только тогда, когда в белке происходят структурные изменения, и хромофоры, ранее погруженные внутрь белковой глобулы, выходят на ее поверхность.

В качестве пертурбантов обычно используются 2%-с растворы этиленгликоля, метанола, тяжелой воды и др. Такой метод называется методом сольвентной пертурбации (возмущения растворителем). Часто в качестве возмущающего фактора применяют не химическое вещество, а температуру. При этом между измерительной и эталонной кюветами создается постоянная разность температур, что приводит к возмущению электронных уровней «экспонированных» хромофоров. Этот метод называется методом температурной пертурбации. Данный метод применим при исследовании белков с лабильной вторичной и третичной структурой, когда введение пертурбанта может привести к пертурбации оптических свойств хромофора не только за счет изменения физических параметров среды, но и за счет структурных изменений молекул исследуемого вещества, происходящих при добавлении пертурбанта в среду.

Предположим, что в результате изменения микроокружения хромофора произошло изменение энергетических уровней π -электронов, входящих в его состав. В результате изменятся резонансные частоты, на которых возможно поглощение энергии, что проявится в смещении спектров поглощения. Если теперь измерить разность оптических плотностей исследуемого вещества в экспериментальных условиях и того же вещества в эталонных условиях, то будет измерен дифференциальный спектр поглощения данного вещества (рис. 91). При этом если произошел длинноволновый сдвиг спектра поглощения, то дифференциальный спектр будет иметь длинноволновый положительный и коротковолновый отрицательный максимумы.

Каковы же физические основы интерпретации особенностей дифференциальных спектров поглощения? Предполагается, что спектр поглощения хромофоров (например, ароматических аминокислот в составе белков) зависит от макропараметров, характеризующих физические свойства

среды — диэлектрической проницаемости и показателя преломления. Спектр поглощения зависит также от непосредственного взаимодействия хромофора с молекулами растворителя. При этом «доступные» хромофоры, расположенные на поверхности белковой глобулы, будут в полной мере испытывать возмущающее действие растворителя. В то же время «спрятанные», расположенные внутри белковой глобулы, хромофоры такого возмущения испытывать не будут. Следовательно, спектры поглощения «доступных» хромофоров зависят, а «недоступных» не зависят от состава растворителя, т. е. пертурбант, введенный в состав растворителя будет возмущать оптические свойства только «доступных» хромофоров. В случае температурной пертурбации изменение температуры также приводит к изменению эффективности взаимодействия только «доступных» хромофоров с растворителем.

Характер изменения спектра поглощения хромофора определяется правилом Кундта, согласно которому полоса поглощения хромофора смещается в длинноволновую область с возрастанием показателя преломления среды.

Измерения при дифференциальной спектрофотометрии проводятся на обычных спектрофотометрах. Разностное поглощение чаще всего составляет лишь несколько процентов от величины абсолютного поглощения, поэтому в эксперименте предъявляются особые требования к выравниванию концентраций в экспериментальной и эталонной кюветках, учету собственного поглощения кювет, пертурбантов, изменению концентрации за счет температурного объемного расширения и др. Обычно в измерительный канал помещают две кюветы, в одной из которых находится белок, растворитель и пертурбант, а в другой — только растворитель. В эталонном канале помещаются также две кюветы, в одной из которых находится белок и растворитель, а другой — растворитель и пертурбант. При этом оптическая плотность в измерительном канале будет равна:

$$D_{\text{изм}} = D_{\text{экс}}^{\delta} + D_{\text{р}} + D_{\text{пер}},$$

а в эталонном:

$$D_{\text{эт}} = D_{\text{эт}}^{\delta} + D_{\text{р}} + D_{\text{пер}},$$

где $D_{\text{изм}}$; $D_{\text{эт}}$ — оптическая плотность образцов в измерительном и эталонном каналах соответственно; $D_{\text{экс}}^{\delta}$, $D_{\text{эт}}^{\delta}$ — оптическая плотность белка в экспериментальных и эталонных условиях соответственно; $D_{\text{р}}$, $D_{\text{пер}}$ — оптическая плотность растворителя и пертурбанта.

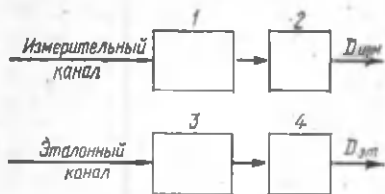


Рис. 92. Схема установки кювет в спектрофотометре при измерении дифференциальных спектров поглощения:

1 — белок+растворитель+пертурбант; 2 — растворитель; 3 — белок+растворитель; 4 — растворитель+пертурбант.

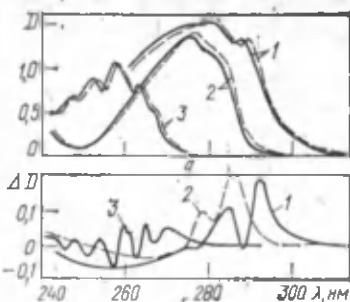


Рис. 93. Смещение спектров поглощения (а) и пертурбационные дифференциальные спектры (б) N-ацетилэтиловых эфиров триптофана (1), тирозина (2) и фенилаланина (3) (по Г. А. Когану, 1972):

— спектры в воде; — спектры в 20%-м растворе диметилсульфоксида.

Так как в дифференциальной спектрофотометрии измеряется $\Delta D = f(\lambda)$, то при описанном наборе кювет регистрируется $\Delta D = D_{изм} - D_{эт} = D_{акс}^b - D_{эт}^b$, что и является целью эксперимента. Сказанное иллюстрируется схемой на рис. 92.

Оценка относительного количества «доступных и «недоступных» хромофоров в составе белка. Рассмотрим изменение интегральных и дифференциальных спектров поглощения эфиров ароматических аминокислот при введении в состав растворителя в качестве пертурбанта 20%-го раствора диметилсульфоксида. Как следует из рис. 93, введение пертурбанта вызывает очень малые сдвиги спектров поглощения (< 1 нм). Однако эти сдвиги проявляются в характерных дифференциальных спектрах. Дифференциальный спектр поглощения триптофана имеет характерные максимумы при 282 и 293 нм, тирозина — при 280 и 287 нм, а в спектре фенилаланина проявляются колебательные переходы при длине волны меньше 270 нм. В спектре белка должны проявляться компоненты всех трех ароматических аминокислот. Для оценки «доступности» хромофоров в составе белка для действия растворителя обычно используют не разность экстинкций, а относительную величину $\Delta \epsilon_{max} / \epsilon_{max}$, где $\Delta \epsilon_{max}$ — величина соответствующего пика в дифференциальном спектре поглощения, а ϵ_{max} — молярная экстинкция в максимуме спектра поглощения.

Величина $\Delta \epsilon_{\max}/\epsilon_{\max}$ удобна для экспериментального определения, так как при этом не нужно измерять величину молярной экстинкции, а достаточно измерить величину $\Delta D_{\max}/D_{\max}$, где ΔD_{\max} — оптическая плотность в максимуме интегрального спектра.

На основании закона Бугера — Ламберта — Бера

$$\frac{\Delta D_{\max}}{D_{\max}} = \frac{\Delta \epsilon_{\max} c l}{\epsilon_{\max} c l} = \frac{\Delta \epsilon_{\max}}{\epsilon_{\max}}$$

Таким образом, нет необходимости в точном учете концентраций исследуемого вещества. Методика измерения доли «доступных» хромофоров в составе белка R сводится к определению:

$$R = \frac{(\Delta D_{\max}/D_{\max})_б}{(\Delta D_{\max}/D_{\max})_{\text{мод}}} \cdot F, \quad (8)$$

где в числителе индекс «б» означает описанные выше параметры для исследуемого белка; индекс «мод» в знаменателе означает те же параметры для модельного соединения, имитирующего полностью «доступные» хромофоры в том же количестве, что и в исследуемом белке; F — поправочный коэффициент, зависящий от выбора модельного соединения.

В качестве модельных «реперных» соединений можно выбрать смесь ароматических аминокислот в пропорции, соответствующей их содержанию в исследуемом белке или исследуемый белок в денатурированном состоянии, обычно в 8M растворе мочевины.

Однако, как следует из рис. 94, спектр модельной смеси не полностью эквивалентен спектру денатурированного белка, поэтому в уравнении (8) параметр, стоящий в знаменателе, определяют по спектру для белка в 8M растворе мочевины. Чтобы учесть пертурбирующее действие 8M раствора мочевины, вводят поправочный коэффициент:

$$F = \frac{(\Delta D_{\max}/D_{\max})_{8M}}{(\Delta D_{\max}/D_{\max})_{H_2O}}$$

где параметр, стоящий в числителе, определяется для эквивалентной смеси аминокислот в 8M растворе мочевины, а в знаменателе — для той же смеси в воде. Так как F обычно изменяется в пределах 0,8—1,2, то, если требуемая точность эксперимента 80—90%, можно принять $F=1$.

Еще раз напомним, что в уравнении (8) величина ΔD_{\max} соответствует величине пика в дифференциальном спектре поглощения. Обычно для триптофана это пик при 293 нм, а для тирозина — при 287 нм. Величина D_{\max} соответствует

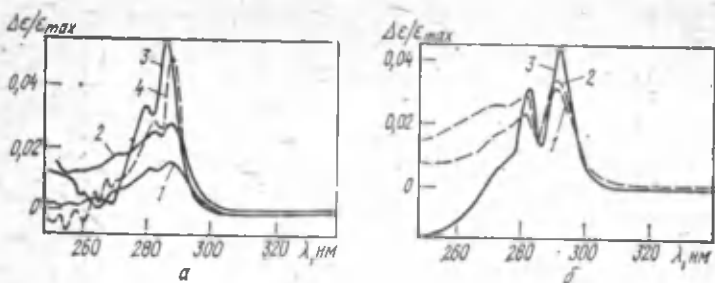


Рис. 94. Пертурбационные дифференциальные спектры сывороточного альбумина (а), лизоцима (б) и их модельных смесей в 20%-м растворе глицерина (по Г.А.Когану, 1973).

Сывороточный альбумин: 1 — нативный белок, рН=7,6; 2 — белок при рН=2,1; 3 — белок с разорванными дисульфидными связями в 8 М растворе мочевины, рН=4,5; 4 — спектры модельной смеси, рН=3,5. Концентрация белка — 0,3%. Лизоцим: 1 — нативный белок; 2 — денатурированный белок в 8 М растворе мочевины, рН=5,1; 3 — спектры модельной смеси, рН=5,8. Концентрация белка — 0,1%.

оптической плотности препарата в максимуме интегрального спектра поглощения. Обычно D_{\max} измеряется при 280 нм, если же в исследуемом белке нет триптофана (например, в инсулине, РНКазе, гистонах), то D_{\max} измеряется при 276 нм.

Исследование топографии белковой молекулы с помощью дифференциальной пертурбационной спектрофотометрии. Понятие «доступный» и «недоступный» хромофор относительны. «Доступность» хромофора, находящегося в складке на поверхности белковой глобулы, будет зависеть от размера этой складки и от размера пертурбанта. Это положение является предпосылкой для исследования топографии белковой молекулы с помощью набора пертурбантов. Наиболее часто используемые пертурбанты и их размеры следующие, нм:

Сахароза	0,97	Диметилсульфок-	0,40
Глюкоза	0,71	сид	
Глицерин	0,51	Метанол	0,28
Этиленгликоль	0,43	Эритритоль	0,58
D ₂ O	0,22	ПЭГ-300	0,92

Влияние размера пертурбанта на дифференциальные спектры поглощения сывороточного альбумина быка в зависимости от рН показано на рис. 95.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) имеет размер больше 0,5 нм, этиленгликоль — 0,43 нм. Следовательно, увеличение на 20% в области рН=4—5 числа доступных для ПЭГ тирозил в составе сывороточного альбумина быка можно

объяснить тем, что эти тирозилы «спрятаны» в «щель» размером $\sim 0,5$ нм.

Гипотезы, объясняющие сдвиги электронных спектров поглощения белков. Одна из гипотез предполагает неспецифическое действие среды на оптические свойства хромофора. При этом возможны: «красный» сдвиг — сдвиг спектра в длинноволновую область и «голубой» сдвиг — сдвиг спектра в коротковолновую область. Величина «красного» сдвига определяется правилом Кундта. Действительно, было измерено, что величина положительных максимумов в дифференциальных спектрах поглощения пропорциональна показателю преломления среды

независимо от вводимого в среду вещества (нейтральные соли, органические растворители, сахара, мочевины и др.). Это положение вполне объясняет изменение дифференциальных спектров поглощения аминокислот. Однако для белков внутренняя среда представляет собой область, обогащенную неполярными гидрофобными радикалами. Показатель преломления этой гидрофобной области равен 1,5—1,6, т. е. выше, чем показатель преломления раствора любого пертурбанта, используемого в дифференциальной спектрофотометрии. Следовательно, контакт с пертурбантом хромофоров, расположенных на поверхности белковой глобулы, приведет к «красному» сдвигу в интегральном спектре поглощения и соответственно к росту положительного пика в дифференциальном спектре поглощения. Если же в результате конформационных изменений в контакт с пертурбантом вступит хромофор, «спрятанный» до этого внутри глобулы, то это означает перевод его из среды с большим в среду с меньшим показателем преломления и, соответственно, к «голубому» сдвигу в интегральном спектре поглощения и уменьшению положительного пика в дифференциальном спектре поглощения.

Согласно другой гипотезе возможно специфическое взаимодействие пертурбанта с хромофором. Эта гипотеза объясняет, главным образом, изменения тирозиловой компоненты в дифференциальных спектрах поглощения. Тирозин содер-

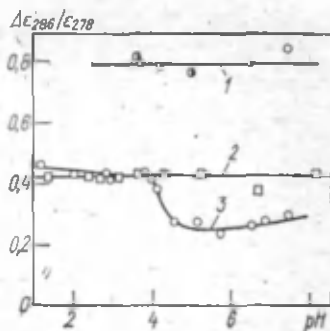


Рис. 95. Влияние размера пертурбанта на дифференциальные спектры поглощения нативного (2, 3) и денатурированного (1) сывороточного альбумина быка в зависимости от pH (по Г. А. Когану, 1973):

Пертурбанты: 1, 3 — полиэтиленгликоль; 2 — этиленгликоль.

жит ОН-группу в составе фенольного радикала, которая способна образовывать водородную связь с акцепторами протона. В качестве акцепторов протонов может выступать карбоксильная группа дикарбоновых аминокислот. В результате образования таких внутримолекулярных водородных связей спектр поглощения тирозина смещается в длинноволновую область. Естественно, что введение в среду пертурбанта, способствующего разрыву водородных связей, приводит к «голубому» сдвигу спектра поглощения. Возможно также образование межмолекулярных водородных связей между боковым радикалом тирозина и молекулой пертурбанта.

Инфракрасная спектроскопия

Колебания атомов в составе молекулы имеют собственные резонансные частоты в ИК-области спектра. Следовательно, резонансное поглощение энергии молекулой должно наблюдаться именно в этой области. В сложных полимерных молекулах и, в частности, в составе биополимеров микроокружение атомов одного типа различно. Следовательно, можно предполагать, что колебательные энергетические уровни биополимеров будут различаться. По этому различию, если его удастся зафиксировать, можно будет судить о микроокружении соседних атомов в составе молекулы, а следовательно, о ее структуре.

В настоящее время можно выделить три направления применения ИК-спектроскопии в биохимии, биофизике и молекулярной биологии: анализ структурных изомеров, определение структурных формул и изучение пространственной конформации биополимеров.

Методика эксперимента. Обычная область исследования ИК-спектроскопии 1—25 мкм. В ИК-спектрофотометрии чаще применяется шкала волновых чисел. Напомним, что волновое число ν — это величина, обратная длине волны, выраженной в сантиметрах. Следовательно, длинам волн 1—25 мкм соответствуют волновые числа 10 000—400 см^{-1} .

Спектрофотометры, применяемые для регистрации ИК-спектров, имеют принципиальную схему ту же, что и УФ-спектрофотометры. Отличие затрагивает лишь конструкцию отдельных узлов.

В качестве источников излучения в ИК-спектрофотометрах применяются следующие излучатели:

силитовый стержень (стержень из SiC, глобар), спектральная область 300—5 000 см^{-1} ;

штифт Нернста (спрессованная смесь ZrO_2 , CeO_2 , Y_2O_3 , ThO_2), спектральная область 300—5 000 см^{-1} ;

лампа накаливания с вольфрамовой нитью, спектральная область 5000—25 000 см⁻¹.

Основным элементом монохроматора является диспергирующий элемент — призма или дифракционная решетка. К материалу дифракционной решетки не предъявляется особых требований и в ИК-спектроскопии могут использоваться те же дифракционные решетки, что и в видимой области. Ограничения накладываются лишь на частоту нанесения штрихов на рабочую область решетки. Основное уравнение дифракционной решетки:

$$a \sin \varphi = n\lambda, \quad (9)$$

где a — расстояние между штрихами; λ — длина волны; n — целое число (порядок спектра); φ — угол дифракционного максимума.

Если в УФ и видимой областях применяются решетки, на которых нанесено 1200 или 2400 штрихов/мм, то при больших длинах волн (ИК-диапазон) соответственно уменьшается a в уравнении (9) и применяются решетки 600 или 300 штрихов/мм. Больше ограничений предъявляется к призмным монохроматорам, так как материал призмы должен быть прозрачным в исследуемом спектральном диапазоне.

Границы прозрачности материалов, применяемых в ИК-спектроскопии, следующие:

кварц — до 4,5 мкм	KBr, AgCl — до 35 мкм
LiF — до 8 мкм	Ge — до 25 мкм
CaF ₂ (флюорит) — до 11 мкм	Si — до 500 мкм
NaCl — до 22 мкм	

В ИК-спектроскопии в качестве приемника излучения используется чаще всего болометр — прибор, основу которого составляет терморезистор, изменяющий свое сопротивление при изменении температуры. Трудности при регистрации ИК-спектров связаны с тем, что большинство растворителей также поглощают ИК-излучение (рис. 96). Те растворители, которые поглощают слабо (хлороформ, четыреххлористый углерод, сероуглерод), для исследования биополимеров мало пригодны. В них хорошо растворяются лишь липиды и стероиды. Поэтому в ИК-спектроскопии не всегда удается получить спектры растворов, а чаще используются другие методы приготовления образцов, описанные ниже.

Методы приготовления образцов. Суспензия в иммерсионной среде. Образец растирают в фарфо-

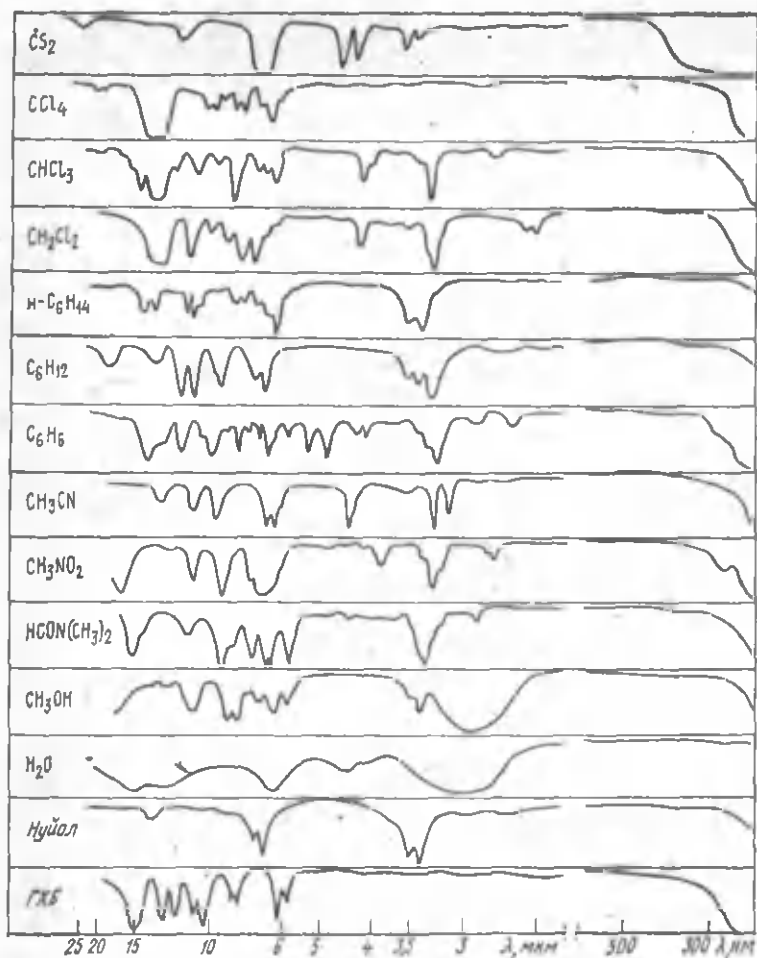


Рис. 96. ИК- и УФ-спектры поглощения некоторых растворителей.
Толщина слоя вещества — 0,1 мм.

ровой ступке с каплей масла в соотношении 1 : 100 до получения однородной пасты, затем пасту размазывают между двумя пластинками из KBr или NaCl и снимают спектры поглощения.

Недостатки метода: невозможность точного контроля толщины, наличие полос иммерсионной среды в спектре, невозможность воздействовать на объект, так как он находится в инертной среде.

Метод прессованных таблеток. Вещество

смешивают в пропорции 1 : 300 с КВг и прессуют при давлении $\sim 5 \cdot 10^8$ Па.

Недостаток метода: при высоком давлении возможны изменения кристаллического состояния вещества и частичное разрушение сложных молекул, волокон и т. п.

Метод изучения пленок. Раствор с исследуемым веществом наносят на подложку и растворитель испаряется.

Недостаток метода: изменение состава среды (ионной силы, рН) при испарении, поэтому образцы должны готовиться на дистиллированной воде, но многие биополимеры растворяются лишь при определенных рН и ионной силе.

Изучение растворов. Основная трудность при изучении растворов заключается в преодолении альтернативы: растворитель должен хорошо растворять исследуемое вещество и не должен поглощать в исследуемой области спектра. Поэтому в одном и том же растворителе практически не удается зафиксировать весь спектр. Приходится растворять вещество в нескольких растворителях и снимать для каждого раствора спектры в тех областях, где прозрачен данный растворитель.

Используются многие растворители: метанол, этанол, диоксан, многокомпонентные смеси, содержащие серную, соляную, муравьиную, уксусную и другие кислоты, а также их хлор- и фторпроизводные. Поиск растворителей является важной проблемой ИК-спектроскопии.

Конечно, главный интерес для биологов представляет исследование водных растворов. Но H_2O имеет богатый спектр в ИК-области, поэтому для преодоления трудностей снимаются спектры вещества в H_2O и D_2O . Так как ИК-спектры H_2O и D_2O не совпадают, то они оставляют «окна» в различных спектральных диапазонах. Совмещение этих «окон» может помочь получить полный ИК-спектр исследуемого вещества.

Основы интерпретации ИК-спектров. Предположим, что:

- 1) в ИК-области поглощается свет только тех частот, которые равны частотам колебаний атомов в молекуле;
- 2) молекулу можно рассматривать как набор точечных масс, связанных между собой упругими пружинками, которые и удерживают систему в равновесии.

Для описания ИК-спектров введем ряд терминов.

Форма колебания — набор параметров, характеризующий движение атомов: изменение длины связи, изменение расстояний между атомами, изменение валентных углов и т. д.

Силловые коэффициенты — коэффициенты упругости связей и валентных углов.

Нормальное колебание — движение атомов молекулы, при котором они одновременно проходят положение равновесия. Общее число нормальных колебаний равно $3N - 6$, где N — число атомов в молекуле.

Существуют два типа колебаний в ИК-спектрах: скелетные — нормальные колебания, вытекающие из свойств молекулы как целого, и характеристические (локализованные) — нормальные колебания молекулы, вытекающие из свойств ее отдельных группировок.

Колебания могут быть отнесены к характеристическим при условии, что:

а) регистрируется или рассчитывается нормальное колебание для группировки как для отдельной молекулы (т. е. считают, что в растворе есть только эта группировка, не связанная с полимером);

б) регистрируется или рассчитывается спектр нормальных колебаний для биополимера как для целого;

в) совпадение одной из полос нормального колебания (б) с характеристической полосой (а) принимается за критерий характеристичности данного колебания.

Анализ именно характеристических колебаний имеет основное значение при интерпретации ИК-спектров. Молекула полимера почти всегда состоит из повторяющихся звеньев, при этом характеристическое колебание отражает изменения, происходящие в этом звене. Примером такого повторяющегося звена является пептидная группа в белках.

Инфракрасная спектрофотометрия полипептидов и белков. В состав полипептидов и белков входит повторяющаяся единица — пептидная группа. С помощью рентгеноструктурного анализа установлено, что связь N—C равна 0,132 нм, что гораздо меньше расстояния 0,147 нм, характерного для связи N—C в органических соединениях. Следовательно, связь N—C частично двойная за счет смещения электронной плотности к кислороду, поэтому пептидная группа имеет четыре атома, находящихся в одной плоскости.

Вдоль цепи пептидные группы связаны друг с другом системой связей C—C и C—N, вокруг которых возможно вращение. За счет поворота вокруг этих связей создается структурное разнообразие полипептидов. Минимуму потенциальной энергии молекулы отвечает образование максимального числа внутримолекулярных связей. При этом возможно образование нескольких устойчивых структурных

форм: α -спирали, параллельной β -конформации, антипараллельной β -конформации, структуры типа полиглицин II, структуры типа поли-L-пролин II, а также участки полипептидной цепи, не участвующие в образовании внутримолекулярных водородных связей, образуют структуру неупорядоченного клубка.

Структура типа поли-L-пролин II характерна для фибриллярных белков, например коллагена. В последнее время некоторые исследователи поддерживают точку зрения, согласно которой многие участки полипептидной цепи, которым ранее приписывалась конформация неупорядоченного клубка, имеют структуру типа поли-L-пролин II, но все же для описания конформации полипептидной цепи наиболее важны структуры α -спирали, β -конформации и неупорядоченного клубка. Структуру большинства белков можно описать с помощью набора этих трех конформаций. Так как образование этих структур связано с образованием водородных связей между атомами O и H, входящими в состав пептидной группы, то следует ожидать, что частоты нормальных характеристических колебаний, присущих этим группам (если конечно их удастся идентифицировать в ИК-спектрах), должны измениться. Поэтому ИК-спектроскопия может дать такую важную информацию о структуре молекулы в растворе, как способ ее укладки, а также количество радикалов, уложенных в соответствующую структуру. Однако для получения подобной информации важно выделить соответствующие характеристические нормальные колебания.

Рассмотрим ИК-спектр пленки гидрохлорида тетраглицина, которая была получена высушиванием водного раствора этого соединения. Спектр основных колебаний молекулы занимает диапазон $30-3600 \text{ см}^{-1}$ ($1000-1,5 \text{ мкм}$) (рис. 97).

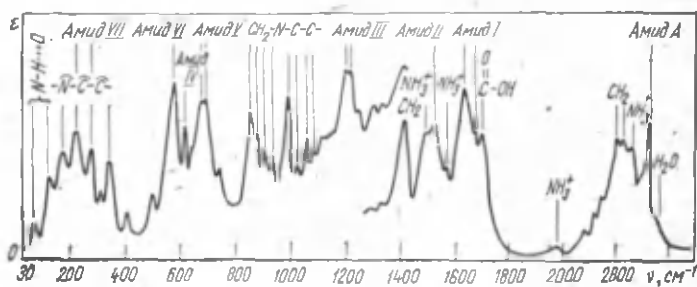


Рис. 97. ИК-спектр поглощения кристаллической формы гидрохлорида тетраглицина (по Ю. Н. Чиргадзе, 1973).

Спектр имеет сложную структуру (~ 50 полос). В этом спектре выделены отдельные колебания, затрагивающие атомы, входящие в пептидную (амидную) группу (табл. 10).

Т а б л и ц а 10. Характеристики колебаний амидных групп

Название полосы	Частота, см ⁻¹	Характер колебания
Амид А	3300 3100	N—H(ν)
Амид I	1643	C=O(ν), C—N(ν)
Амид II	1520	CNH (δ, в плоскости) C—N(ν)
Амид III	1200 1216	N—H (δ, в плоскости) C—N (δ)
Амид IV	623	CON (δ, в плоскости)
Амид V	685—700	N—H (δ, вне плоскости)
Амид VI	590	C=O (δ, вне плоскости)
Амид VII	225 285	Торсионное колебание вокруг связи C—N

Примечание. ν — Валентное колебание (вдоль связи); δ — деформационное колебание (изменяет валентный угол).

В качестве примера отнесения характеристического колебания к той или иной атомной группировке рассмотрим метод дейтерозамещения. При этом методе исследуемое вещество выдерживают достаточно долго в тяжелой воде. В результате этого все протоны будут замещены на дейтерий. Те частоты, в образовании которых участвует группировка, содержащая протон, сместятся в более низкочастотную область, характерную для дейтерия.

Измерением интенсивности амидных полос можно исследовать структуру белка. Основная трудность при этом заключается в учете сомножителей в уравнении Бугера — Ламберта — Бера. Кроме того нужно найти такую полосу в спектре, интенсивность которой достаточно отличалась бы для разных конформаций. В этом отношении наиболее изучена полоса Амид I.

Для полосы Амид I частоты характеристических колебаний значительно отличаются для разных конформаций. Еще важно то, что при дейтерозамещении полоса Амид I не изменяет своего положения, тогда как полоса Амид II сдвигается в сторону низких частот. Это позволяет изучать сложный контур Амид I при наложении характеристических колебаний от нескольких структурных форм.

Проверка характеристичности полосы. При использовании дипептидов с различными радикалами

полоса Амид I изменялась, не больше чем на 10%. Были вычислены значения ν , ϵ , полуширина полосы Амид I для дипептида с незаряженными концевыми группами (аналог состояния в белке) на основании спектров для NH_3^+ и COO^- . Для полосы Амид I были изучены вклады различных структурных форм. Основная трудность при этом заключается в невозможности получения чистой упорядоченной структурной формы. Некоторые синтетические полипептиды (например, поли- γ -бензилглутамат) могут образовывать α -структурную форму с 100%-м содержанием α -спиралей. Используя эту систему в качестве стандарта, каким-нибудь другим методом определяют содержание α -спиральных участков в исследуемом белке. Затем проводят оценку содержания β - и неупорядоченной конформаций.

Суть метода состоит в следующем. Снимают ИК-спектр «реперных» полипептидов или белков в неупорядоченной и β -конформациях. Исходя из этих данных (табл. 11), вычисляют коэффициенты молярной экстинкции соответствующих конформаций.

Таблица 11. Параметры полосы Амид I

Компоненты полосы Амид I	Частота, см^{-1}	Полуширина, см^{-1}	ϵ_m , $\text{л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$
Неупорядоченное состояние			
ν_1	1650	45	350
ν_2	1675	25	60
β -Конформация			
ν_1	1620	19	1000
ν_2	1690	10	250
α -Спираль			
ν	1636	37	460

Исходя из предположения, что разные типы конформаций вносят независимый вклад в интенсивность соответствующей спектральной полосы и пользуясь законом Бугера — Ламберта — Бера, вычисляют содержание неупорядоченной и β -конформаций в исследуемом белке. Например, при определении коэффициента поглощения растворов фиброина шелка *Wormbux tog1* из спектра (рис. 98) был выделен контур полосы с максимумом при 1650 см^{-1} , принадлежащий неупорядоченной конформации. Разностный

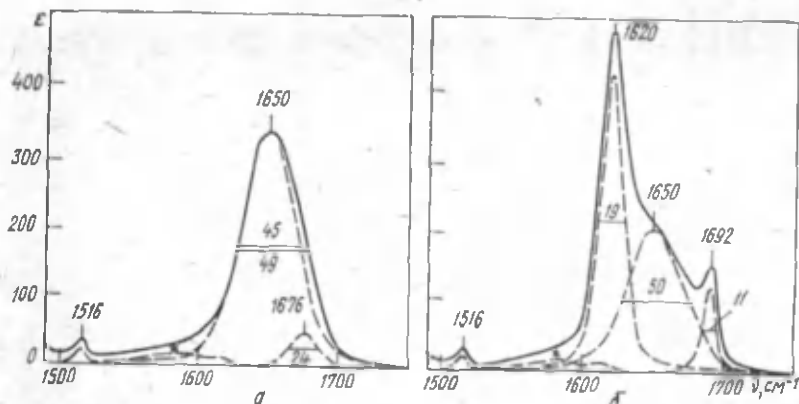


Рис. 98. Коэффициент поглощения растворов фиброина шелка *Bombyx mori* в тяжелой воде (по Ю. Н. Чиргадзе, 1973):

a — в неупорядоченной конформации; *b* — частично в виде β -конформации. Концентрация белка — 1%, содержание β -конформации 40%. Звездочкой в области 1500—1620 см^{-1} отмечен вклад в поглощение боковых групп аминокислотных остатков тирозина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

спектр с максимумом при 1620 см^{-1} определял вклад β -конформации в полосу поглощения. По интенсивности полос при 1620 см^{-1} и 1650 см^{-1} , пользуясь данными табл. 11, можно вычислить содержание неупорядоченной и β -конформаций в составе фиброина шелка.

Как видим из табл. 11, наибольшую чувствительность метод ИК-спектроскопии имеет к определению β -конформации в составе белков ($\epsilon_{1620} = 1000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Относительная погрешность определения — 5—10%.

Изучение структуры глобулярных белков. Трудности, встречающиеся при этом, следующие:

- 1) молекула белка содержит все три типа конформаций, которые к тому же могут быть деформированы;
- 2) поглощение боковых групп дает вклад в ИК-спектр, который трудно учесть;
- 3) исследования надо проводить в водных растворах;
- 4) протоны, находящиеся внутри белковой глобулы, с трудом замещаются на дейтерий.

Вследствие этих трудностей конформацию белка в ИК-спектроскопии изучают используя данные не только о параметрах полосы Амид I, но также данные и о других полосах ИК-спектров белков.

ИК-спектроскопия нуклеиновых кислот. Информативность ИК-спектроскопии для изучения структуры нуклеиновых кислот меньше, чем для белков. Основные причины заключаются в малой характеристичности полос, так как

большинство нормальных колебаний — скелетные, а также в сложности структурной формулы азотистых оснований по сравнению с пептидной группой. Это приводит к тому, что в спектре нуклеиновых кислот проявляется не одна, как у белков, а несколько характерных групп, которые накладываются друг на друга.

Параметры ИК-спектров нуклеиновых кислот приведены в табл. 12.

Таблица 12. ИК-спектры нуклеиновых кислот

Частоты, см ⁻¹	Обозначения колебаний ¹	Отнесение колебаний
2800—3500	$\left\{ \begin{array}{l} \nu(\text{OH}) \\ \nu(\text{NH}) \\ \nu(\text{CH}) \end{array} \right.$	H ₂ O, сахар Азотистые основания Сахар и основания
1500—1800	$\left. \begin{array}{l} \nu(\text{C}=\text{O}) \\ \nu(\text{C}=\text{N}) \\ \nu(\text{C}-\text{C}) \\ \delta(\text{NH}) \end{array} \right\}$	Основания, смешанные колебания
~1200	$\delta(\text{HON})$	H ₂ O
1000—1100	$\left\{ \begin{array}{l} \nu(\text{PO}_2^-) \\ \nu(\text{CO}) \end{array} \right.$	Антисимметричное, валентное Симметричное, валентное Сахар
700—1000	$\left\{ \begin{array}{l} \nu(\text{PO}) \\ \nu(\text{CO}) \\ \tau(\text{NH}) \end{array} \right.$	Фосфат Сахар Основания, неплоское, деформационное колебание
300—600		Скелетные деформации

¹ ν — Валентные, δ и τ — деформационные колебания.

§ 22. ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

Энергия фотона, поглощенного веществом, переходит во внутреннюю энергию возбуждения молекулы. Процесс поглощения и диссипации энергии может происходить в чрезвычайно короткие, но измеримые промежутки времени. Процесс поглощения происходит за время порядка 10^{-15} с, а естественное время жизни возбужденных $\pi \rightarrow \pi^*$ - и $n \rightarrow \pi^*$ -состояний составляет примерно 10^{-9} — 10^{-6} с. Поглощаемая энергия может расходоваться молекулой различными способами:

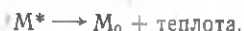
1) радиационным (излучательным):



где $h\nu$ — квант излучения (люминесценции), M^* , M_0 — мо-

лекула в возбужденном и основном состояниях соответственно;

2) безизлучательным:



При этом энергия поглощенного фотона переходит во внутреннюю колебательную энергию молекулы. Возможна также внутренняя конверсия — внутримолекулярный безрадиационный переход между радиационными уровнями одинаковой мультиплетности (синглет \rightarrow синглет, триплет \rightarrow триплет). Возможна также интеркомбинационная конверсия — внутримолекулярный безрадиационный переход между электронными уровнями и различной мультиплетности (синглет \rightarrow триплет, триплет \rightarrow синглет);

3) расходование энергии электронного возбуждения на химические превращения. Эту область превращения энергии изучает фотохимия;

4) миграция энергии возбуждения на соседние молекулы и дальнейшее расходование ее перечисленными выше тремя способами.

Рассмотрим схему, поясняющую механизм возникновения люминесценции (рис. 99).

Молекула обладает двумя системами энергетических уровней: синглетными и триплетными. До поглощения кванта света молекула находится в основном невозбужденном состоянии S_0 . Поглощение кванта света приводит к переходу молекулы на один из синглетных возбужденных уровней S_1, S_2, \dots, S_n на один из колебательных подуровней, определяемый правилом Франка — Кондона. Совокупность этих энергетических переходов определяет электронный спектр поглощения молекулы. Время жизни возбужденного состояния хотя и мало, но значительно больше времени внутренней конверсии. Поэтому за время, много меньшее времени жизни возбужденного состояния, молекула окажется на нижнем колебательном подуровне возбужденного синглетного уровня S_1 независимо от того, на какой энергетический уровень перевел молекулу поглощенный фотон (S_2, S_3, \dots, S_n). Излучение поэтому возможно лишь в соответствии с переходом $S_1 \rightarrow S_0$, такое излучение называется флуоресценцией.

Многие молекулы (в том числе белки и нуклеиновые кислоты) обладают системой триплетных энергетических уровней. За время жизни возбужденного состояния возможен переход молекулы из синглетного на триплетный энергетический уровень (интеркомбинационная конверсия). Переходы из триплетного состояния в основное запрещены

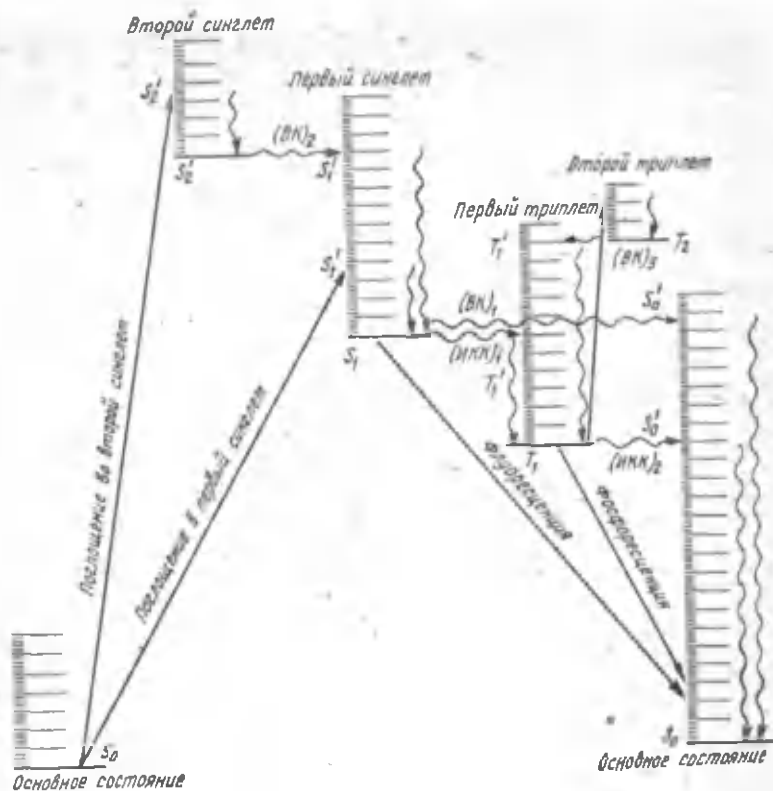


Рис. 99. Схема, поясняющая механизм возникновения люминесценции (по А. П. Головной и Л. В. Левшину, 1978):

S_n, T_n — синглетные и триплетные состояния; S_n', T_n' — колебательные состояния синглетных и триплетных уровней; *ВК* — внутренняя конверсия; *ИКК* — интеркомбинационная конверсия (\rightarrow) — безизлучательные переходы.

в соответствии с правилами отбора квантовой механики. Однако это не означает, что они вообще не происходят; просто вероятности таких переходов очень малы. Поэтому время жизни триплетного состояния велико (от миллисекунд до нескольких секунд). Излучение, связанное с переходом $T_1 \rightarrow S_0$, называется ф о с ф о р е с ц е н ц и е й. Таким образом, основное различие между этими двумя видами люминесценции связано с различием времени жизни возбужденного состояния: $\tau_{\text{фл}} \approx 10^{-8} - 10^{-9}$ с, $\tau_{\text{фосф}} \approx 10^{-3}$ с — единицы секунд.

Существует также замедленная флуоресценция, при которой излучение происходит с первого синглет-

ного возбужденного уровня и, следовательно, по спектру совпадает с флуоресценцией, но время жизни значительно больше. Возникновение замедленной флуоресценции можно объяснить так. Путем интеркомбинационной конверсии молекула переходит в одно из метастабильных энергетических состояний. Это может быть триплетный энергетический уровень. Так как переход из метастабильного состояния в основное запрещен, то молекула может находиться в этом состоянии достаточно долго. За это время возбужденная молекула может поглотить еще один квант энергии, достаточный для ее перехода вновь в синглетное возбужденное состояние. Из этого синглетного состояния молекула переходит в основное невозбужденное состояние путем излучения кванта флуоресценции. Из рис. 99 видим, что для перехода $T_1 \rightarrow S_1$ необходима небольшая энергия. Зачастую для этого достаточно высокоэнергетического теплового кванта.

Следует отметить, что иногда фосфоресценцию называют метастабильной, или триплетной, флуоресценцией. Однако деление люминесценции на фосфоресценцию, флуоресценцию и замедленную флуоресценцию наиболее употребительно.

Существует еще классификация люминесценции, основанная на способе перевода молекулы из основного в возбужденное состояние. В связи с этим различают фотолюминесценцию, хемилюминесценцию (частный случай — биолюминесценция), катодолюминесценцию, триболюминесценцию и др. Ниже будут рассмотрены закономерности только фотолюминесценции, т. е. излучения энергии, поглощенной молекулой в виде кванта ультрафиолетового или видимого света.

Основные характеристики люминесценции

Спектр излучения — это зависимость интенсивности излучения данного вещества от длины волны. Определяется величиной кванта излучения с нулевого колебательного подуровня синглетного возбужденного уровня на один из колебательных подуровней основного состояния (рис. 99). К основным параметрам, характеризующим спектр излучения, относятся λ_{max} — длина волны, при которой наблюдается максимальная интенсивность излучения, $\Delta\lambda_{1/2}$ — полуширина спектра.

$$\Delta\lambda_{1/2} = \lambda_1 - \lambda_2,$$

где λ_1 и λ_2 — длина волн на крыльях спектра, при которых

интенсивность излучения составляет половину максимальной интенсивности.

Энергетический и квантовый выходы. Энергетический выход η характеризует отношение излученной энергии к поглощенной в течение какого-то времени, т. е. это отношение излученной и поглощенной мощности:

$$\eta = \frac{E_{\text{изл}}}{E_{\text{погл}}} \quad (10)$$

Предполагается, что измерение ведется в стационарном режиме, т. е. при $t \gg \tau$.

Квантовый выход флуоресценции φ равен отношению числа излученных за единицу времени квантов $n_{\text{изл}}$ к числу поглощенных квантов $n_{\text{погл}}$:

$$\varphi = \frac{n_{\text{изл}}}{n_{\text{погл}}}$$

Следовательно, φ — это вероятность того, что молекула, поглощая квант возбуждающего света, испустит квант излучения флуоресценции. Запишем:

$$\begin{aligned} E_{\text{изл}} &= h\nu_{\text{изл}}n_{\text{изл}}, \\ E_{\text{погл}} &= h\nu_{\text{погл}}n_{\text{погл}}, \\ \eta &= \frac{E_{\text{изл}}}{E_{\text{погл}}} = \frac{h\nu_{\text{изл}}n_{\text{изл}}}{h\nu_{\text{погл}}n_{\text{погл}}}. \end{aligned}$$

Отсюда

$$\eta = \varphi \frac{\nu_{\text{изл}}}{\nu_{\text{погл}}} \quad (11)$$

Длительность люминесценции. Для характеристики длительности люминесценции введем обозначения: p — вероятность излучения кванта одной молекулой за единицу времени, n — число возбужденных молекул. Тогда за время dt совершится $pndt$ радиационных переходов.

Так как один акт излучения означает переход одной молекулы из возбужденного в невозбужденное состояние, то убыль возбужденных молекул dn за время dt составит:

$$dn = -pndt,$$

$$\int \frac{dn}{n} = - \int p dt,$$

$$\ln n - \ln c = -pt. \quad (*)$$

Определим постоянную интегрирования c , для чего примем начальные условия $t=0$. Тогда $\ln n = + \ln c$, т. е. $c = n$ при $t=0$, или $c = n_0$.

Потенцируя уравнение (*), получим:

$$n = n_0 e^{-pt}.$$

Обозначив $\tau_0 = 1/p$, получим:

$$n = n_0 e^{-t/\tau_0}, \quad (12)$$

где τ_0 — естественное время жизни возбужденного состояния молекулы, т. е. время, в течение которого число возбужденных молекул уменьшится в e (2,72) раз; τ_0 является молекулярной характеристикой вещества и не зависит от взаимодействия со средой, наличия тушителей и других факторов, если они не изменяют электронной структуры молекулы.

Поляризация флуоресценции. Как известно, электромагнитное излучение представляет собой поперечную волну, которая может быть описана двумя взаимно перпендикулярными векторами напряженности электрического (E) и магнитного (H) полей, изменяющихся синфазно и перпендикулярных к направлению распространения волны. Векторы E и H являются равноправными световыми векторами и изменяются синхронно, но для спектроскопии имеет важное значение электрический вектор.

Если при распространении световой волны любое направление электрического вектора в плоскости, перпендикулярной направлению распространения волны, равновероятно, то такой свет называется неполяризованным. Если же колебания электрического вектора происходят так, что проецируются на одну линию в плоскости, перпендикулярной направлению распространения волны, то такой свет называется линейно поляризованным. Простейший излучатель всегда испускает линейно поляризованный свет, однако естественный свет чаще всего неполяризован, так как испускается источниками, состоящими из большого числа хаотически ориентированных диполей.

При возбуждении линейно поляризованным светом флуоресценция растворенного вещества также будет частично поляризована. Почему же молекулы, которые ориентированы случайно в растворе, испускают поляризованный свет? Линейно поляризованным светом будут возбуждаться преимущественно молекулы, у которых осциллятор поглощения ориентирован в том же направлении, что и вектор поляризации (молекулы A_1 , рис. 100). Молекулы A_2 , у которых осциллятор поглощения перпендикулярен электрическому вектору возбуждающего света, возбуждаться не будет. Молекулы A_3 имеют промежуточную вероятность поглотить

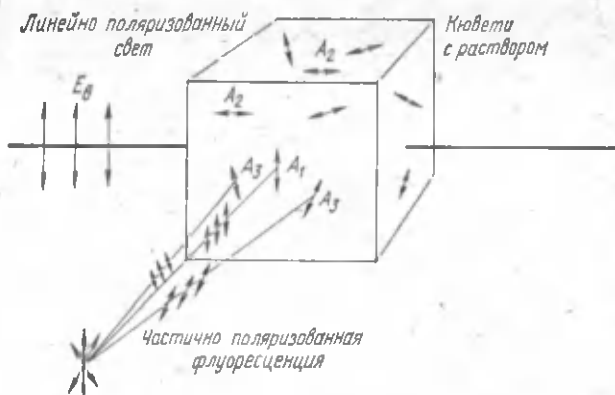


Рис. 100. Схема возникновения частичной поляризации флуоресценции раствора при возбуждении поляризованным светом.

квант возбуждающего света. В результате в растворе будут возбуждены молекулы с некоторой преимущественной ориентацией, и, как следствие, флуоресценция такого раствора будет частично поляризована. В эксперименте обычно используют параметры, характеризующие поляризацию излучения: степень поляризации P , анизотропию r и поляризационный спектр.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}; \quad r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}},$$

где I_{\parallel} , I_{\perp} — компоненты флуоресценции, поляризованные соответственно параллельно и перпендикулярно осциллятору излучения.

Поляризационный спектр — это зависимость степени поляризации флуоресценции от длины волны возбуждающего света. Если осцилляторы поглощения и испускания направлены под углом β друг к другу, то предельная степень поляризации P_0 равна:

$$P_0 = (3 \cos^2 \beta - 1) / (\cos^2 \beta + 3) \text{ — для вертикально поляризованного света;} \quad (13)$$

$$P_0^I = (3 \cos^2 \beta - 1) / (7 - \cos^2 \beta) \text{ — для неполяризованного возбуждающего света.} \quad (14)$$

Рассмотрим предельные случаи для уравнений (13) и (14).

Если $\beta = 0$, то $P_0 = 1/2$; $P_0^I = 1/3$.

Если $\beta = \pi/2$, то $P_0 = -1/3$; $P_0^I = -1/7$.

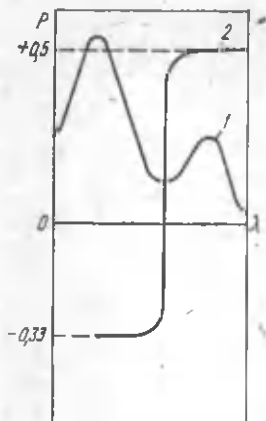


Рис. 101. Взаимосвязь между спектром поглощения (1) и поляризованным спектром возбуждения флуоресценции (2) (по С. Паркеру, 1972).

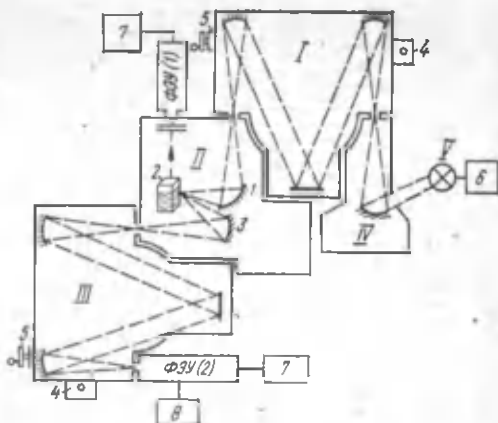


Рис. 102. Блок-схема спектрофлуориметра: I — монохроматор возбуждения; II — кюветное отделение; III — монохроматор излучения; IV — оптическая система источника возбуждения; V — источник возбуждения; 1, 3 — зеркала; 2 — измерительная кювета; 4—8 — вспомогательные узлы.

Предположим, что вещество имеет две полосы в спектре поглощения. Для первой полосы поглощения осцилляторы поглощения и излучения параллельны, а для второй полосы — перпендикулярны друг другу. Спектр поглощения этого вещества и его поляризованный по возбуждению спектр приведены на рис. 101. Из этого рисунка можно сделать важный вывод: по поляризованным спектрам можно установить наличие перекрывающихся полос поглощения, для которых не совпадают направления осцилляторов поглощения. Кроме того, определив экспериментально P_0 или P'_0 , можно из уравнения (13) или (14) определить β .

Техника эксперимента

Рассмотрим блок-схему спектрофлуориметра (рис. 102). Свет от источника света V фокусируется на входной щели монохроматора возбуждения I. Монохроматическое излучение направляется зеркалом 1 на измерительную кювету 2. Флуоресценция собирается и фокусируется зеркалом 3 на входной щели монохроматора излучения III. Конструкция предусматривает развертку по спектру возбуждающего света при фиксированной длине волны излучения; при этом

регистрируется спектр возбуждения исследуемого вещества. Возможна также развертка по спектру света флуоресценции при фиксированной длине волны возбуждающего света; при этом регистрируется спектр флуоресценции исследуемого вещества. Развертка осуществляется синхронными двигателями 4 монохроматоров возбуждения I и излучения III. Регистрация флуоресценции осуществляется ФЭУ, затем усиливается и записывается регистрирующим устройством.

Возможны два основных режима регистрации фототока: режим измерения постоянного тока и режим счета импульсов. В режиме измерения постоянного тока анодный ток фотоэлектронного умножителя усиливается усилителем постоянного тока, выход которого подключается к самопишущему устройству. В режиме счета импульсов импульсы фототока вначале усиливаются импульсным усилителем и подаются на вход интегрирующего устройства. Интегратор преобразует частоту импульсов входного сигнала в уровень постоянного напряжения, который регистрируется самопишущим регистратором.

Импульсный режим регистрации имеет ряд преимуществ перед режимом постоянного тока, в частности позволяет использовать счетно-решающие устройства без дополнительных преобразователей.

Измерение спектров флуоресценции. При регистрации спектров излучения необходимо учитывать спектральную чувствительность установки, для чего любой спектрофлуориметр должен быть откалиброван по источнику излучения с известным энергетическим распределением в спектре. Это довольно сложная методическая проблема, так как, если в видимой области спектра можно в качестве эталонного источника использовать лампу накаливания, с достаточной степенью точности принимая спектр ее излучения близким к спектру излучения абсолютно черного тела, то для УФ-области спектра таких источников не существует. Часто используют для калибровки спектрометра в УФ-области спектра водородную или дейтериевую лампы.

Измерение квантового выхода флуоресценции. Следует различать измерение абсолютного и относительного квантовых выходов флуоресценции. Измерение первого связано со значительными методическими трудностями, так как необходимо сравнить скорость поглощения возбуждающего света со скоростью испускания флуоресценции при всех длинах волн и во всех направлениях. Обычная относительная погрешность этих методов 5—10%. В качестве эффективного способа измерения абсолютного квантового выхода флуоре-

сценции назовем метод Вебера и Тила, которые сравнили интенсивность флуоресценции исследуемого вещества с интенсивностью возбуждающего света, рассеиваемого раствором гликогена известной оптической плотности. На практике часто бывает достаточно измерить относительный квантовый выход, т. е. отношение квантовых выходов флуоресценции исследуемого вещества в экспериментальных и эталонных условиях, или отношение квантовых выходов исследуемого и эталонного вещества.

Отношение интенсивности флуоресценции двух веществ равно:

$$\frac{F_2}{F_1} = \frac{S_2}{S_1} = \frac{\varphi_2}{\varphi_1} \cdot \frac{D_2}{D_1},$$

где F_2, F_1 — интенсивность флуоресценции; S_2, S_1 — площадь под спектрами флуоресценции; φ_2, φ_1 — квантовые выходы флуоресценции; D_2, D_1 — оптическая плотность препаратов на длине волны возбуждающего света.

Таким образом, чтобы измерить относительный квантовый выход флуоресценции исследуемого вещества φ_2/φ_1 , надо знать интенсивность флуоресценции, равную площади под спектром флуоресценции, и оптическую плотность исследуемых препаратов. Все эти величины можно измерить с высокой точностью. На практике часто используют не площадь под спектрами флуоресценции, а значения максимальных интенсивностей флуоресценции в спектре. В табл. 13 приведены значения квантового выхода флуоресценции для некоторых веществ, которые можно использовать в качестве эталонных.

Измерение степени поляризации. Для поляризационных измерений обычно в схему флуориметра (рис. 102) вводят поляризационные призмы — поляризатор в канал возбуждения и анализатор в канал излучения.

Степень поляризации P равна:

$$P = I_{\parallel} / (I_{\parallel} + I_{\perp}), \quad (15)$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} — поляризованные и неполяризованные компоненты. Максимальный и минимальный сигналы, регистрируемые фотоумножителем, равны:

$$I_{\max} = I_{\parallel} + I_{\perp} / 2;$$

$$I_{\min} = I_{\perp} / 2;$$

$$P = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}} \quad (16)$$

Таким образом, для измерения степени поляризации флуоресценции достаточно измерить интенсивность флуоре-

Таблица 13. Значения квантового выхода флуоресценции для различных веществ (по С. Паркеру)

Вещество	Растворитель	Метод	Длина волны возбуждения, нм	Φ_f
Аценафтен	Этанол	A_a (0,30)	313	0,39
	Циклогексан	ДФА (1,0)	303	0,60
	Этанол	A_a (0,30)	366	0,46
Акридиновый оранжевый с HCl Антрацен	Бензол	Абсолютн.	366	0,26
	То же	То же	366	0,29
	>	X (0,55)	366	0,24
	Этанол	Абсолютн.	366	0,27
	То же	То же	254	0,30
	>	X (0,55)	366	0,30
	>	X (0,55)	366	0,30
	Гексан	Абсолютн.	254	0,31
	То же	X (0,55)	366	0,29
	Циклогексан	ДФА (1,0)	254	0,36
Антрахилоновая кислота 1,2-Бензантрацен	Бензол	Абсолютн.	366	0,58
	Этанол	То же	366	0,59
	То же	A_a (0,30)	366	0,20
Бензол	>	A_a (0,30)	248	0,04
	Циклогексан	ДФА (0,1)	254	0,07
	Этанол	A_a (0,30)	366	0,42
Бенз-(а)-пирен Хлорофилл а	То же	Абсолютн.	644	0,23
	Метанол	То же	644	0,23
	То же	>		0,24
	Эфир	Абсолютн.	644	0,32
	То же	То же		0,24
	Этанол	>	644	0,10
	Метанол	>	644	0,10
Хлорофилл b	То же	>		0,06
	Эфир	>	644	0,12
	То же	>		0,11
	Этанол	A_a (0,30)	313	0,17
	Циклогексан	ДФА (1,0)	313	0,14
	Этанол	A_a (0,30)	366	0,89
9, 10-Диметил- антрацен 9, 10-Дифенил- атрацен	Бензол	Абсолютн.	366	0,84
	То же	X (0,55)	366	0,81
	>	A_a (0,24)	366	0,80
	Этанол	Абсолютн.	366	0,81
	То же	X (0,55)	366	0,76
	>	A_a (0,29)	366	1,0
	>	A_a (0,30)	366	0,89
	Вода	Абсолютн.	366	0,16
Эозин	Водный NaOH	То же	366	0,19
	То же	PB (0,73)	467	0,23
	>	PB (0,73)	492	0,21
	>	PB (0,73)	366	0,23
Флуорантен Флуорен	Этанол	A_a (0,30)	366	0,21
	То же	Абсолютн.	254	0,54

Вещество	Растворитель	Метод	Длина волны возбуждения, нм	η
Флуоресцеин	Гексан	То же	254	0,54
	Циклогексан	ДФА (1,0)	265	0,80
	Водный NaOH	Абсолютн.	366	0,92
	То же	То же	436	0,79
	>	>		0,84
	>	>		0,85
	>	>		0,85
	>	РБ (0,73)	467	0,85
			или	
			492	
1-Метоксинафталин	Этанол	A ₂ (0,30)	313	0,53
N-Метилакридинийхлорид	Вода	Абсолютн.	366	1,01
2-Метилантрацен	Этанол	A _n (0,29)	336	0,24
9-Метилантрацен	То же	A ₂ (0,30)	366	0,33
	>	A _n (0,29)	366	0,38
Нафталин	Циклогексан	ДФА (1,0)	254	0,35
	Этанол	Абсолютн.	254	0,12
	То же	A ₀ (0,30)	313	0,21
	Гексан	Абсолютн.	254	0,10
	Циклогексан	ДФА (1,0)	265	0,23
2-Нафтиламин	Бензол	Абсолютн.	366	0,50
Перилен	То же	То же	366	0,89
	>	—	—	0,98
	Этанол	Абсолютн.	366	0,87
Фенантрен	Циклогексан	ДФА (1,0)	254	0,94
	Этанол	Абсолютн.	254	0,10
	То же	A _n (0,30)	313	0,13
	>	A _n (0,30)	248	0,16
Фенол	Вода	Абсолютн.	254	0,22
9-Фенилантрацен	Циклогексан	ДФА (1,0)	265	0,08
	Этанол	A _n (0,30)	366	0,49
	То же	A ₂ (0,29)	366	0,52
	Изопропанол	X (0,55)	366	0,46
	Циклогексан	ДФА (1,0)	365	0,49
Профлавина хлорид	Этанол	A _n (0,30)	366	0,40
Пирен	То же	A _n (0,30)	313	0,72
	Циклогексан	ДФА (1,0)	313	0,32
Хинина гидро-сульфат	1,0 н. раствор H ₂ SO ₄	Абсолютн.	366	0,55
Родамин Б	Этанол	То же	535	0,97
	То же	X (0,55)	366	0,73
Рубрен	n-Гептан	Абсолютн.	436	1,02
Тионин	0,1 н. раствор H ₂ SO ₄	РБ (0,73)	546	0,02
Толуол	Гексан	—	254	0,23
	Циклогексан	ДФА (1,0)	265	0,17

Вещество	Растворитель	Метод	Длина волны возбуждения, нм	Φ_f
Трифенилен	Этанол	A_a (0,30)	313	0,09
	Циклогексан	ДФА (1,0)	265	0,08

Примечание. Значения, приведенные в столбце 3, относятся к следующим стандартным растворам: A_a — антрацен в этаноле, A_b — антрацен в бензоле, ДФА — 9,10-дифенилантрацен в циклогексане, X — гидросульфат хинина в разбавленной H_2SO_4 , РБ — родамин Б в этаноле; Φ_f — абсолютный квантовый выход.

сценции при двух положениях поляризатора и анализатора, соответствующих максимальному и минимальному сигналам флуоресценции.

Измерение времени жизни возбужденного состояния. Время жизни триплетного возбужденного состояния (от миллисекунд до секунд) может быть легко измерено, в то время как для измерения времени жизни синглетного возбужденного состояния (в наносекундах) нужны специальные методические приемы.

Время жизни синглетного возбужденного состояния измеряется приборами, которые называются флуорометрами (в отличие от флуориметров, измеряющих интенсивность флуоресценции). Существуют два основных метода флуорометрии.

В основе применения метода фазовой флуорометрии лежит следующий принцип: если промодулировать возбуждающий свет с определенной частотой, то люминесценция будет также промодулирована с той же частотой. Однако между возбуждающим светом и излучением появится фазовый сдвиг, связанный с временем жизни возбужденного состояния соотношением:

$$\operatorname{tg} \varphi = \omega \tau, \quad (17)$$

где φ — фазовый сдвиг; τ — время жизни возбужденного состояния; ω — круговая частота, равная $2\pi f$ (f — частота модуляции).

Следовательно, измерив $\operatorname{tg} \varphi$, можно вычислить τ . Однако реализовать принцип фазовой флуорометрии очень сложно вследствие того, что из-за малого значения τ даже значительная частота модуляции приводит к малым фазовым сдвигам, для измерения которых нужны сложные электронные устройства. Для применения высокой частоты модуля-

ции требуются высокоскоростные оптические затворы. От указанных недостатков свободен второй метод.

Идея метода импульсной флуорометрии также несложна. Если подать для возбуждения люминесценции образца импульс света, а после его окончания измерять изменение интенсивности флуоресценции во времени, то это изменение будет происходить по экспоненциальному закону. Зарегистрировав затухание флуоресценции, можно вычислить постоянную, которая равна времени жизни возбужденного состояния в соответствии с уравнением (12). Важное прикладное значение измерения кривой затухания люминесценции состоит в том, что в случае, если эта кривая имеет сложную форму, ее можно разложить на экспоненциальные составляющие. При этом количество составляющих соответствует количеству гетерогенных люминесцирующих центров в исследуемом веществе. В настоящее время, в связи с развитием лазерной техники и созданием импульсных лазеров, имеющих длительность световых импульсов порядка наносекунд и даже пикосекунд, метод импульсной флуорометрии стал основным методом для измерения времени жизни возбужденного состояния молекулы.

Основные законы люминесценции

Независимость спектров люминесценции от длины волны возбужденного света. Физическая природа этого закона подробно описана выше. Она основана на том, что излучение идет всегда с низшего возбужденного синглетного уровня независимо от того, на какой энергетический уровень перешла молекула после поглощения кванта возбуждения (см. рис. 99). Следует отметить, что правило независимости спектров излучения соблюдается для сложных многоатомных молекул. Для атомов и простых молекул в спектре излучения могут быть отмечены полосы, соответствующие переходам между различными синглетными уровнями и, следовательно, их спектры будут зависеть от величины поглощенного кванта.

Закон Стокса. Правило, согласно которому свет люминесценции всегда имеет большую длину волны, чем поглощенный возбуждающий свет, называется законом Стокса.

Физическая интерпретация закона Стокса основана на том, что молекула может поглотить квант энергии, соответствующий любому из переходов $S_0 \rightarrow S_n$, но излучение всегда соответствует переходу $S_1 \rightarrow S_0$. Следовательно, величина поглощенного кванта больше величины кванта излученного, и поэтому спектр излучения молекулы должен лежать

в более длинноволновой области, чем ее спектр поглощения. Однако практически спектры излучения и поглощения всегда имеют область перекрывания, так называемую антистоксовскую область, в которой длина волны излучения может быть меньше длины волны возбуждающего света. Это явление связано с тем, что переход $S_0 \rightarrow S_1$ может произойти с высокого колебательного уровня S_0 на низший колебательный подуровень уровня S_1 . А излучение может произойти с высокого колебательного подуровня уровня S_1 на низший колебательный подуровень уровня S_0 . В результате величина поглощенного кванта будет меньше величины излученного кванта. На рис. 99 эти переходы во избежание перегрузки чертежа не обозначены, но их легко можно определить самостоятельно.

Правило зеркальной симметрии спектров поглощения и люминесценции (правило Левшина). Согласно этому правилу, нормированные (приведенные к максимуму) спектры поглощения и люминесценции, изображенные в функции частот, зеркально симметричны относительно прямой, проходящей перпендикулярно к оси частот через точку пересечения обоих спектров. Это правило справедливо не для всех молекул, и по отклонению спектров конкретных веществ от правила Левшина можно судить об энергетическом состоянии молекул этих веществ.

Универсальность формы полос поглощения и люминесценции и универсальное соотношение между спектрами поглощения и люминесценции (соотношение Степанова). Б. И. Степановым была выведена общая формула, описывающая соотношение между спектрами поглощения и люминесценции любых молекул, исходя из общих термодинамических предпосылок:

$$I_\nu / \alpha_\nu = D(T) \cdot \nu^3 e^{-h\nu/kT}, \quad (18)$$

где I_ν — мощность люминесценции при частоте ν (число переходов с излучением, отношение к единице времени); α_ν — коэффициент поглощения при частоте ν ; $D(T)$ — постоянная, зависящая от условий возбуждения и температуры T ; k — постоянная Больцмана.

При выводе этого соотношения Б. И. Степанов исходил из предположения, что за время, меньшее средней длительности возбужденного состояния, устанавливается равновесное распределение возбужденных молекул по колебательным уровням их возбужденного электронного состояния в соответствии с температурой окружающей среды. В этом случае распределение энергии в спектре люминесценции исследуемых молекул должно совпадать с распределением энергии

в спектре их теплового излучения, определяемого законом Кирхгофа.

С помощью соотношения (18) по экспериментально измеренному спектру поглощения вещества можно вычислить контур его полосы теплового испускания, а, следовательно, и тождественный ему контур полосы люминесценции. Аналогично решить и обратную задачу.

Соотношение (18) имеет важное практическое значение, так как оно теоретически обосновывает малую информативность такого параметра, как полуширина спектра излучения и позволяет связать индивидуальные свойства молекулы лишь с таким спектральным параметром, как значение λ_{\max} .

Закон Вавилова. Согласно этому закону, в стоковской области спектра поглощения квантовый выход флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света. В антистоксовской области спектра поглощения квантовый выход флуоресценции быстро уменьшается с увеличением длины волны. В настоящее время существует точка зрения, согласно которой невыполнение закона Вавилова в антистоксовской области спектра поглощения не является универсальным правилом, а объясняется влиянием малых количеств гетерогенных поглощающих центров в основной массе исследуемого вещества (примесей различных ионных форм, ассоциированных молекул и др.). При исключении этих поглощающих центров квантовый выход флуоресценции остается постоянным и для антистоксовской области спектра.

Люминесцентный анализ в биологических исследованиях

Способность молекулы вещества расходовать часть поглощенной энергии в виде излучения, а также параметры этого излучения, отражают особенности структуры излучающей молекулы. Если поглотившая квант света молекула претерпевает какие-либо физико-химические превращения в возбужденном состоянии, то это также накладывает отпечаток на параметры ее люминесценции. Исходя из этих предпосылок, люминесцентный метод в биологии применяется для решения двух основных задач: изучение пространственной организации биополимеров в растворе и в составе клеточных структур и выяснение физических механизмов фундаментальных биологических процессов (фотосинтеза, ферментативного катализа, реакций с участием радикалов и др.). В составе биополимеров выделяют три типа излучающих хромофоров: собственные хромофоры, люминесцирующие хромофоры, присоединенные к изуча-

емому объекту с помощью ковалентных связей — люминесцентная «метка», люминесцирующие хромофоры, присоединенные к изучаемому объекту с помощью нековалентных связей — люминесцентные «зонды». Объектом люминесцентного анализа может быть как молекула биополимера, так и сложное надмолекулярное образование — хлоропласт, рибосома, биологическая мембрана, хроматин и др.

Собственная люминесценция белков. Ранее упоминалось, что в составе белков основными хромофорами, поглощающими свет в средней и УФ-области, являются ароматические аминокислоты: триптофан, тирозин, фенилаланин. Детальные исследования показали, что люминесценция белков также определяется ароматическими аминокислотами, которые входят в их состав. Тот факт, что люминесценция не определяется молекулой белка в целом, а принадлежит лишь локальным участкам молекулы, в которых находятся ароматические аминокислоты, является предпосылкой высокой информативности применения люминесцентного метода для исследования пространственной организации белковой молекулы. В самом деле, зная как то или иное изменение условий окружения влияет на параметры люминесценции, можно по изменению люминесцентных параметров белковой молекулы судить о ее локальных конформационных изменениях.

На рис. 103 приведены спектры флуоресценции водных растворов триптофана, тирозина и фенилаланина. В соответствии с законом Стокса спектры флуоресценции ароматических аминокислот сдвинуты в более длинноволновую

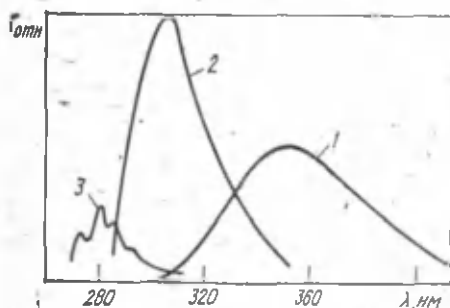


Рис. 103. Спектры флуоресценции водных растворов триптофана (1), тирозина (2) и фенилаланина (3) (по Э. А. Бурштейну, 1976).

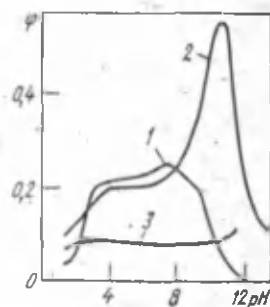


Рис. 104. Влияние pH на квантовый выход флуоресценции тирозина (1), триптофана (2) и метилового эфира N-ацетилтриптофана (3).

область по сравнению со спектрами поглощения тех же аминокислот (см. рис. 89).

Т р и п т о ф а н. При комнатной температуре спектр флуоресценции триптофана имеет максимум примерно при 350 нм, полуширина спектра около 60 нм. Квантовый выход флуоресценции 0,2 ($pH=7,0$; $25^{\circ}C$). Спектр в кислой среде на 3—4 нм сдвинут в коротковолновую область, а в щелочной среде — в длинноволновую. Квантовый выход флуоресценции триптофана также зависит от pH среды (рис. 104).

Усиление флуоресценции при $pH=9-10,5$ можно объяснить диссоциацией аминокруппы, а ослабление при $pH=11$ — тушащим действием гидроксильных ионов. Тушение флуоресценции в кислой среде совпадает с кривой диссоциации карбоксильной группы (видимо, диссоциация этой группы и является причиной тушения). В неполярных растворителях происходит сдвиг спектра флуоресценции триптофана на 30—40 нм в коротковолновую область, но спектр поглощения не изменяется. Поэтому объяснить такой сильный сдвиг можно взаимодействием растворителя с возбужденным индольным кольцом триптофана, в результате чего происходит перестройка электронной структуры этого кольца.

Т и р о з и н. В водном растворе при комнатной температуре тирозин имеет спектр флуоресценции с максимумом при 303—304 нм, полушириной 34 нм (рис. 103). Квантовый выход флуоресценции 0,21. Характерной особенностью флуоресценции тирозина является постоянное положение максимума спектра при изменении условий окружающей среды. В то же время квантовый выход флуоресценции тирозина изменяется при изменении условий окружающей среды (рис. 104).

Ф е н и л а л а н и н. В водных растворах при комнатной температуре фенилаланин обладает характерным спектром флуоресценции с максимумами при 275, 282, 289 и 304 нм (рис. 103) и квантовым выходом флуоресценции, равным 0,038—0,045.

При низкой температуре ($-196^{\circ}C$) люминесценция ароматических аминокислот приобретает ряд характерных особенностей. Спектр флуоресценции триптофана сдвигается на 20—30 нм в коротковолновую область. Также в коротковолновую область сдвинут (на 4—6 нм) спектр флуоресценции тирозина. Спектр флуоресценции фенилаланина при $-196^{\circ}C$ не претерпевает значительных изменений (возможен лишь небольшой длинноволновый сдвиг). Наряду с изменением спектров флуоресценции при $-196^{\circ}C$ в спект-

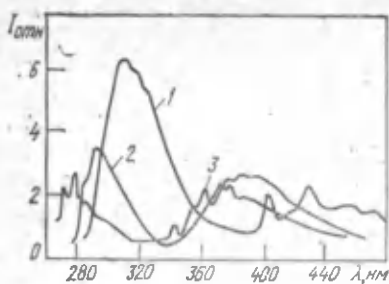


Рис. 105. Спектры люминесценции триптофана (1), тирозина (2) и фенилаланина (3) при $t = -196^\circ\text{C}$ (по Э. А. Бурштейну, 1976).

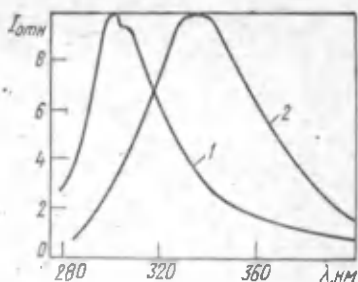


Рис. 106. Спектры флуоресценции белков классов А и В: 1 — зеин; 2 — сыrovоточный γ -глобулин.

рах люминесценции всех ароматических аминокислот появляется интенсивная длинноволновая компонента — спектр фосфоресценции (рис. 105).

В зависимости от содержания ароматических аминокислот все белки по их люминесцентным свойствам можно разделить на несколько классов.

Белки класса А (содержат тирозин, фенилаланин и не содержат триптофан). К этим белкам относятся РНКазы А, инсулин, гистоны, зеин, тропомиозин, адренотоксин, малатдегидрогеназа и некоторые другие.

Примером спектров флуоресценции белков класса А может быть спектр флуоресценции зеина (рис. 106).

Особенностью спектров флуоресценции белков класса А является совпадение их максимумов с максимумом спектра флуоресценции тирозина (303—304 нм) и отсутствие измеримого вклада флуоресценции фенилаланина. Однако квантовый выход флуоресценции тирозина при включении в белок снижается значительно. У большинства белков он ниже 0,04 (у РНКазы А — 0,017, инсулина — 0,037), но может достигать 10—14% (например, у гистонов). Максимум спектра флуоресценции тирозина при включении в белок, а также при структурных перестройках белковой молекулы не изменяется. Этот факт коррелирует с постоянством положения спектра при изменении условий окружающей среды водного раствора тирозина и отражает слабое взаимодействие возбужденного фенольного радикала со средой. Уменьшение квантового выхода тирозина при включении в белок, вероятно, отражает тушающее действие полярных и серусодержащих радикалов в его микроокружении в составе белковой молекулы.

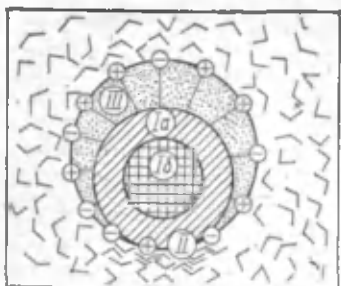


Рис. 107. Модельная схема структурно-физических зон белковой молекулы в растворе (по Э. А. Бурштейну, 1976).

ном (рис. 107). На этой схеме изображена «трехслойная» структура белковой глобулы. Область *Ib* состоит из гидрофобных боковых радикалов аминокислот и обладает низкой полярностью. По некоторым данным показатель преломления гидрофобного ядра белковой глобулы равен 1,5—1,6. Область *Ia* содержит большое количество полярных групп, подвижность которых резко снижена. Область *III* содержит высокоподвижные полярные группы и находится в контакте с молекулами воды, не связанными с молекулой белка. Область *II* содержит полярные группы с низкой подвижностью, взаимодействующие со связанными молекулами воды. Попадание хромофора в описанные структурные области определяет различное микроокружение хромофора и по-разному проявится в его флуоресцентных свойствах. Задача исследователя и состоит в том, чтобы по изменению параметров флуоресценции составить представление об изменении микроокружения хромофора, а следовательно, об особенностях структурных изменений молекулы белка.

В спектрах флуоресценции белков класса В можно выделить вклад тирозиновых и триптофановых остатков. Основной вклад в большинство спектров дают остатки триптофана, что связано с его большей экстинкцией, большим квантовым выходом в составе полипептидной цепи, а также с миграцией части поглощенной энергии с остатка тирозина на триптофан. Однако с помощью специальных методических приемов удалось выделить тирозиновую компоненту в спектрах флуоресценции и измерить квантовый выход тирозина, который не отличается от квантового выхода флуоресценции тирозина в составе белков класса А. В отличие от тирозина положение спектра флуоресценции

Белки класса В (содержат все три ароматические аминокислоты). Большинство природных белков относится к этому классу. Спектры флуоресценции γ -глобулина (рис. 106) могут служить примером спектров флуоресценции белков класса В. Интерпретации спектральных изменений флуоресценции триптофана может помочь модельная схема структурно-физических зон белковой молекулы в растворе, предложенная Э. А. Бурштейном

триптофана изменяется при его включении в полипептидную цепь, что отражает сильное взаимодействие индольного хромофора с окружающей средой. Спектр флуоресценции белков класса В сдвинут на 10—25 нм в коротковолновую область по сравнению со спектром свободного триптофана. Опыты с модельными соединениями показали, что коротковолновый сдвиг спектра флуоресценции триптофана в составе белковой молекулы можно объяснить снижением полярности окружения и увеличением жесткости структуры при включении триптофана в состав полипептидной цепи. Изменения полярности и жесткости окружения триптофана могут происходить при локальных структурных изменениях молекулы белка, например при переходе триптофана из зоны III в зону II или зону I согласно рис. 107. Кроме того, изменение оптических свойств триптофана может происходить при образовании комплексов возбужденного хромофора с окружающими молекулами (эксиплексов). При изменении микроокружения изменяется не только положение спектра, но и квантовый выход, причем в широких пределах: от 0,05 до 0,5.

Белки класса С (содержат фенилаланин и не содержат тирозин и триптофан). Известно небольшое количество таких белков — это парвальбумины рыб (рис. 108), гепатокупреин лошади, рибосомный белок L7E.coli.

Спектры флуоресценции белков класса С имеют хорошо разрешенную тонкую структуру и сдвинуты на 2 нм в длинноволновую область по сравнению со спектрами свободного фенилаланина. Белки класса С имеют очень высокий квантовый выход флуоресценции, который может в 7 раз превышать квантовый выход флуоресценции фенилаланина в водном растворе (парвальбумин карпа).

Перенос энергии в молекуле белка. Кроме изменения микроокружения, на флуоресценцию хромофоров в составе белковой молекулы существенное влияние оказывает межхромофорная миграция энергии. Например, замена всего лишь одного из десяти остатков фенилаланина на тирозин в составе парвальбумина приводит к практически полной миграции энергии с остатков фенилаланина на тирозин, в результате чего в спектре флуоресценции этого белка проявляется только тирозиновая компонента. Наиболее эффективно осуществляется межхромофорный гомо- и гетероперенос в направлении: фенилаланин → тирозин → триптофан. Обратный перенос хоть и возможен, но значительно менее вероятен.

Метод тушения флуоресценции. С. И. Вавилов выделил два типа тушения флуоресценции.

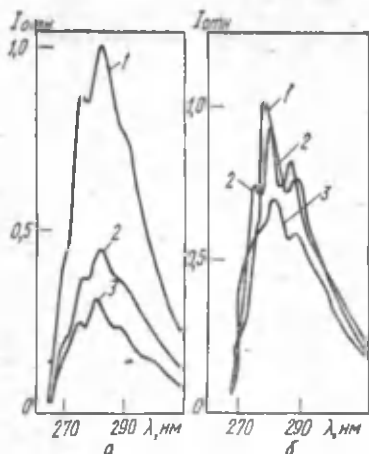


Рис. 108. Спектры флуоресценции парвальбумина карпа (1), парвальбумина мерлузы (2) и фенилаланина (3) при 20°C (а) и -196°C (б) (по Э. А. Бурштейну, 1976).

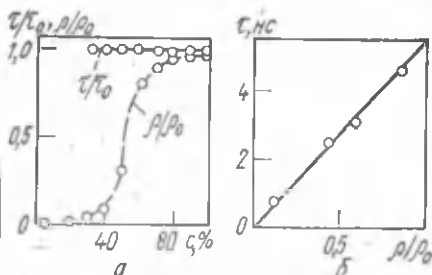


Рис. 109. Соотношение между квантовым выходом ρ/ρ_0 и длительностью флуоресценции τ/τ_0 для различных случаев тушения (по Л. А. Тумерману, 1967):

а — для флуоресценции хлорофилла в водно-спиртовых смесях (тушение водой); б — раствор хлорофилла в ацетоне (тушение хиноном).

1. Тушение I рода — это внутренняя конверсия (превращение) энергии электронного возбуждения.

В случае тушения I рода энергия фотона, поглощенного молекулой вещества, «мгновенно», т. е. за время, много меньшее времени жизни возбужденного состояния, передается по тепловым степеням свободы и молекула оказывается в невозбужденном состоянии, но с запасом колебательной энергии, которая быстро передается окружающей среде.

2. Тушение II рода, которое происходит в результате межмолекулярных взаимодействий за счет:

а) соударения возбужденной молекулы с молекулами растворителя или примеси. В этом случае эффективность тушения будет определяться диффузией и зависеть от температуры и вязкости среды;

б) индуктивной (резонансной) миграции энергии.

Экспериментально определить, какой тип тушения (I или II рода) наблюдается в данном конкретном случае можно, сопоставляя изменение квантового выхода флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния. Теоретические предпосылки при этом следующие. По определению, процесс тушения I рода протекает за время, значительно меньшее времени жизни возбужденного состояния

($t \ll \tau_0$). Следовательно, в данный момент в растворе есть либо возбужденные либо невозбужденные молекулы. При этом экспоненциальный закон затухания флуоресценции не изменяется (значит $\tau_0 = \text{const}$), но квантовый выход флуоресценции будет изменяться, так как он определяется соотношением количества возбужденных и невозбужденных молекул. Следовательно, должно действовать правило: при тушении I рода $\tau_0 = \text{const}$ и не коррелирует с изменением квантового выхода.

На рис. 109 представлены результаты измерений длительности флуоресценции и квантового выхода флуоресценции хлорофилла при добавлении в водный раствор спирта и хинона. Анализируя данные рис. 109 и применяя сформулированное выше правило о корреляции времени жизни и квантового выхода флуоресценции, можно сделать вывод, что в водно-спиртовых растворах наблюдается тушение I рода, а хинон приводит к тушению II рода флуоресценции хлорофилла.

Применение метода спектрофотометрического титрования при исследовании белков дало возможность выделить в составе белковой молекулы два класса остатков тирозина: «недоступных» и «доступных». «Доступность» тирозина может быть выявлена также химическим методом — иодированием, а «доступность» триптофана — окислением N-бромсукцинимидом. Однако применение этих методов всегда оставляет открытым вопрос: не изменяется ли структура белковой молекулы (а значит и «доступность» хромофора) под действием зондирующего агента? Более тонким методом изучения «доступности» хромофоров в составе белковой молекулы является метод тушения флуоресценции тирозина и триптофана низкомолекулярными тушителями. При этом происходит тушение II рода, которое описывается уравнением Штерна — Фольмера:

$$F/F_0 = 1/(1 + Kc) \quad (19), \text{ или } \phi/\phi_0 = 1/(1 + Kc), \quad (20)$$

где F_0 , ϕ_0 — интенсивность и квантовый выход флуоресценции без тушителя; F , ϕ — то же в присутствии тушителя; c — концентрация тушителя; K — константа тушения.

Чаще всего уравнение Штерна — Фольмера используется в виде

$$Q = Kc; \quad (21)$$

где $Q = F_0/F - 1$ — эффективность тушения.

Формула (21) справедлива при наличии в растворе одной формы флуоресцирующих хромофоров. В случае наличия в растворе двух форм хромофоров — «доступных» и

«недоступных» — тушение флуоресценции будет подчиняться следующему выражению:

$$F = \frac{a_1 E_0}{1 + K_1 c} + \frac{a_2 F_0}{1 + K_2 c}, \quad (22)$$

где a_1 и a_2 — вклады «доступных» и «недоступных» хромофоров в суммарную флуоресценцию F_0 .

Вводя параметр Q , можно записать:

$$Q = F_0/F - 1 = \frac{(a_1 K_1 + a_2 K_2)c + K_1 K_2 c^2}{1 + (a_1 K_2 + a_2 K_1)c}. \quad (23)$$

При малых концентрациях тушителя

$$1 \gg (a_1 K_1 + a_2 K_2)c \gg K_1 K_2 c^2.$$

Следовательно, при малых значениях c график, построенный по уравнению (23), представляет собой прямую с наклоном, равным $(a_1 K_1 + a_2 K_2)$.

При больших концентрациях тушителя

$$1 \ll (a_1 K_2 + a_2 K_1)c \ll K_1 K_2 c^2.$$

Следовательно, при больших значениях c кривая тушения может быть аппроксимирована прямой с наклоном, равным $K_1 K_2 / (a_1 K_2 + a_2 K_1)$.

Изложенные положения являются теоретической предпосылкой для использования метода тушения флуоресценции для исследования пространственной организации белковой молекулы. В качестве тушителей флуоресценции используются многие анионные, катионные и нейтральные тушители. На рис. 110 и 111 приведены данные по тушению флуоресценции триптофана и тирозина некоторыми анионными тушителями. Графики на рис. 110 и 111 построены в координатах Штерна — Фольмера в соответствии с формулой (21).

Для исследования белков лучшими являются тушители I^- и Cs^+ . Однако, как следует из уравнения (23), при наличии в составе белковой молекулы больше одного флуоресцирующего центра график, построенный в координатах Штерна — Фольмера, не может иметь вид прямой линии. Действительно (рис. 112), кривая тушения РНКазы анионами отличается от прямой линии. Поэтому при исследовании белковой флуоресценции часто применяют модифицированное уравнение Штерна — Фольмера.

Предположим, что в состав белковой молекулы входят m хромофоров с константой тушения K , соответствующей константе тушения для свободного хромофора, и n хромо-

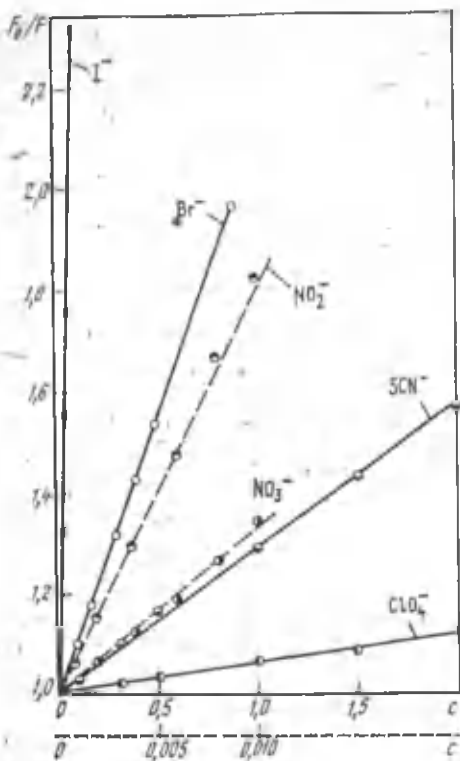


Рис. 110. Тушение флуоресценции триптофана различными анионами ($pH=7,0$, $t=25^\circ C$, концентрация триптофана $10^{-5} M$). Концентрация тушителя c — моль/л.

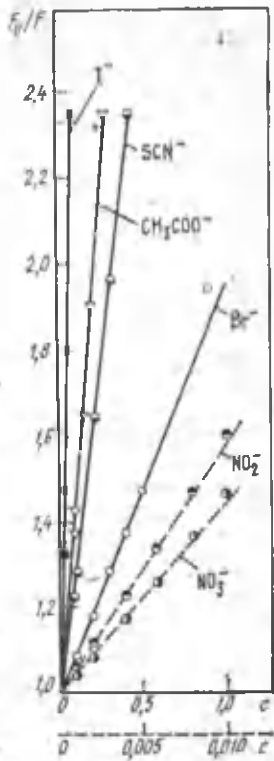


Рис. 111. Тушение флуоресценции тирозина различными анионами ($pH=7,0$, $t=25^\circ C$, концентрация тирозина $10^{-5} M$).

форов с $K=0$, т. е. полностью «недоступных» молекулам тушителя. В этом случае уравнение (23) примет вид:

$$Q = \frac{a_1 K_1 c}{1 + a_1 K_1 c}$$

или, преобразуя уравнение (22),

$$F_0/\Delta F = 1/a_1 K_1 c + 1/a_1, \quad (24)$$

где $\Delta F = F_0 - F$.

В этом случае зависимость $F_0/\Delta F$ от $1/c$ будет выражаться прямой линией, для которой наклон равен $1/a_1 K_1$. Эта прямая отсекает от оси ординат отрезок, равный $1/a_1$. Сле-

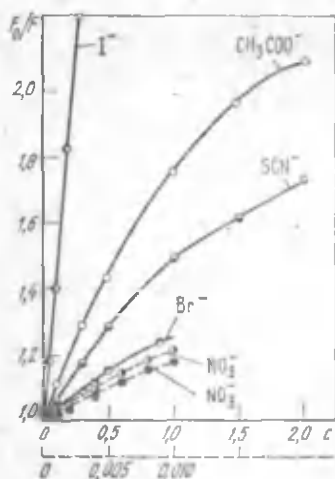


Рис. 112. Тушение флуоресценции РНКазы анионами ($pH=7,0$, $t=25^\circ C$).

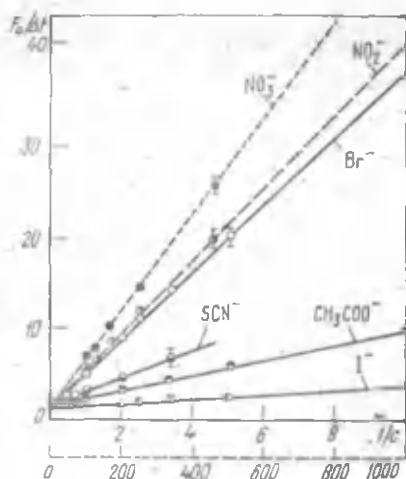


Рис. 113. Тушение флуоресценции РНКазы анионами. Экспериментальные данные те же, что и на рис. 112, но отложены в модифицированных координатах Штерна — Фольмера.

довательно, построив зависимость в координатах $F_0/\Delta F$ и $1/c$, можно получить данные о вкладе «доступных» и «недоступных» хромофоров в суммарную флуоресценцию белка. В качестве примера на рис. 113 приведены те же данные, что и на рис. 112, но график построен в модифицированных координатах Штерна — Фольмера в соответствии с уравнением (24).

Напомним, что метод тушения флуоресценции может дать важную информацию о наличии и знаке электрического заряда в микроокружении хромофора. Действительно, тот факт, что экспериментальные данные (рис. 113) совпадают с теоретическими (уравнение (24)), означает, что для заряженных молекул белковая глобула непроницаема. В то же время гидрофобные молекулы, такие как молекулярный азот или оксид азота, эффективно тушат флуоресценцию «недоступных» хромофоров.

Исследования поляризации флуоресценции. Связь физических характеристик люминесцирующих хромофоров со степенью поляризации флуоресценции описывается формулой Перрена — Вавилова:

$$1/P - 1/3 = (1/P_0 - 1/3)(1 + 3\tau/\theta), \quad (25)$$

где P — степень поляризации флуоресценции; P_0 — предель-

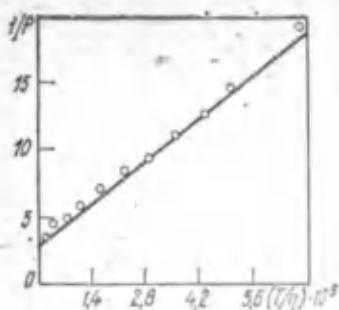


Рис. 114. График зависимости $1/P$ от T/η для раствора флуоресцеина в глицерине.

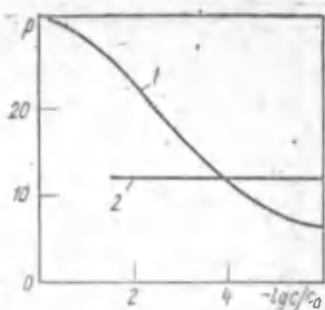


Рис. 115. Изменение степени поляризации флуоресценции изоцианата флуоресцеина, связанного с глутамат-спартаттрансминазой (1) и РНКазой (2) (по Л. А. Турмерману, 1967).

ная степень поляризации; τ — длительность возбужденного состояния; Θ — время релаксации.

Для сферических частиц

$$\Theta = \frac{3\eta V}{RT},$$

где V — объем частицы (с сольватной оболочкой); η — вязкость раствора; T — абсолютная температура; R — газовая постоянная.

Уравнение (25) можно представить в виде:

$$1/P - 1/3 = (1/P - 1/3) \left(1 + \tau \frac{RT}{\eta V} \right). \quad (26)$$

Как видим из уравнения (26), $1/P$ и T/η связаны линейной зависимостью, что подтверждается экспериментальными данными (рис. 114).

Таким образом, зная τ и построив график $1/P = f(T/\eta)$, можно определить объем флуоресцирующей молекулы. Подобные измерения дают хорошие результаты для небольших органических молекул. Однако для больших молекул, форма которых отличается от сферической, уравнение (25) сохраняет свою силу, но время релаксации будет связано с физическими характеристиками флуоресцирующей молекулы более сложно. Аппроксимируя асимметричные частицы в виде эллипсоидов, можно построить теоретическую зависимость

$$\Theta_{\text{эл}}/\Theta_0 = f(a/b),$$

где $\Theta_{эл}$ — время релаксации эллипсоида; Θ_0 — время релаксации сферической частицы, имеющей тот же объем, что и эллипсоид; a/b — отношение осей эллипсоида.

Сопоставляя экспериментальные результаты измерения времени релаксации с теоретическими, можно оценить асимметрию частицы.

Анализируя уравнение (26), можно заключить, что изменение степени поляризации следует ожидать либо при изменении τ либо при изменении Θ . В свою очередь Θ может измениться либо за счет изменения объема молекулы либо за счет изменения ее асимметрии.

На рис. 115 представлены данные об изменении степени поляризации флуоресценции флуоресцентной метки — изоцианата флуоресцеина, связанного с глутаматаспартаттрансаминазой и РНКазой при изменении концентрации этих белков. Эти результаты можно истолковать как распад глутаматаспартаттрансаминазы на две субъединицы. Так как РНКаза состоит из одной полипептидной цепи, то для нее степень поляризации не изменяется при изменении концентрации белка.

Чувствительность различных параметров люминесценции к пространственной организации молекул белков. Такие параметры флуоресценции, как положение спектра λ_{max} , квантовый выход ϕ , длительность флуоресценции τ и степень поляризации P связаны со структурными перестройками белковой молекулы. Дать однозначную физическую интерпретацию изменению того или иного параметра флуоресценции невозможно. Полярность, жесткость среды, а также специфические взаимодействия хромофоров с молекулами растворителя или близлежащими боковыми радикалами приводят к изменению всех перечисленных параметров, причем эти изменения часто не коррелируют друг с другом. Например, увеличение квантового выхода флуоресценции для одних белков может сопровождаться коротковолновым, а для других — длинноволновым сдвигом спектра. Однако неоднозначность физической интерпретации изменений параметров люминесценции компенсируется высокой чувствительностью метода для исследования структурных перестроек молекул белка. В подобных исследованиях можно измерять любой из флуоресцентных параметров (λ , ϕ , τ , P), но чувствительность этих параметров к структурным перестройкам исследуемой молекулы неодинакова. Наибольшей чувствительностью обладает положение спектра (Е. А. Черницкий, 1972). Это связано с тем, что чувствительность метода связана с отношением точности измерения к абсолютной величине изменения

измеряемого параметра. Относительная чувствительность различных параметров флуоресценции к структурным изменениям белков при денатурации 8 М раствором мочевины следующая (по Е. А. Черницкому):

Параметры флуоресценции	λ_{max}	φ	τ	R
Погрешность измерения	0,1—0,2 нм	1%	5%	1—3%
Величина максимального изменения параметра	20 нм	50—100%	50—100%	50%
Чувствительность параметра	0,005—0,01	0,01—0,02	0,05—0,1	0,02—0,06

Как видим, наибольшей чувствительностью к структурным изменениям обладает положение спектра. Кроме того, измерение спектров легче осуществить экспериментально по сравнению с измерением других флуоресцентных параметров. Аппаратура для измерения квантового выхода и спектров флуоресценции более проста по сравнению с аппаратурой для измерения поляризации и длительности флуоресценции. Измерение положения спектров не требует постоянного контроля за изменением чувствительности установки, что необходимо при измерении квантового выхода. Положение спектра является более стабильной характеристикой молекулы, чем квантовый выход, так как на него не влияет изменение концентрации, температуры, светорассеяния образца. Таким образом, измерение положения спектра флуоресценции можно использовать в качестве теста, наиболее чувствительного к изменению конформации белковой молекулы. Для белков класса А положение спектра определяется флуоресценцией тирозина и не изменяется при конформационных изменениях молекул этих белков.

Изучение структуры белков методом флуоресцентных зондов. Напомним, что флуоресцентные зонды — это малые флуоресцирующие молекулы, связанные нековалентно с исследуемой молекулой. В зависимости от физико-химической природы (анионная, катионная или нейтральная молекула) зонд связывается с определенными участками молекулы

белка и изменяет параметры своей флуоресценции. По изменению этих параметров можно судить о структуре того участка белка, с которым связывается молекула зонда. Можно использовать в качестве зонда флуоресцирующую модификацию субстрата при исследовании ферментативных реакций и по флуоресцентным изменениям изучать механизмы образования фермент-субстратных комплексов. Но чаще всего в качестве зондов используются синтетические красители.

На с. 247 приведены структурные формулы некоторых из применяемых флуоресцентных зондов, а в табл. 14 и 15 — их спектральные параметры.

На практике наиболее часто используются зонды 1,8-АНС и 2,6-ТНС.

Таблица 14. Оптические характеристики флуоресцентных зондов, используемых для исследования белков (по Г. Е. Добрецову)

Сокращение и полное название флуоресцентного зонда	Максимум поглощения, нм	Максимум излучения, нм
1,8-АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат)	360	470
2,6-ТНС (2-толуидинонафталин-6-сульфонат)	350	430
ФНА (N-фенил-1-нафтиламин)	340	410
ДАНС (1-диметиламинонафталин-5-сульфонат)	340	470
ДАНС-холин (1-(5-диметиламинонафталин-1-сульфонатоамидо)-пропан-3-триметиламмоний)	340	470
ДДП (1-(5-диметиламинонафталин-1-сульфонатоамидо)-3-N, N-диметиламинопропан)	328	550
— (N-Метилакридин)	358	490
Маретин (N-оксионафталимиддиэтилфосфат)	342	400
БФС (бромфеноловый синий)	590	605
— (Бенгальский розовый (тетраподтетрахлор-флуоресцен)	550	570
НАД·Н ₂ (никотин-амид-аденин-динуклеотид восстановленный)	340	420
ε-АМФ (этенаденозинмонофосфат)	275	410
ε-АДФ (этенаденозиндифосфат)	275	410
ε-АТФ (этенаденозинтрифосфат)	275	410
— (Пиренбутират)	340	376
— (Ретинол)	330	480
ДМХ (4-диметиламинохалкон)	410	520

При связывании с белковой молекулой изменяются все флуоресцентные параметры зонда (λ_{\max} , ϕ , τ , P). Однако обычно измеряют сдвиг λ_{\max} и изменение квантового выхода флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции многих зондов изменяется на несколько порядков при изменении микроокружения (табл. 15). Изменение положения λ_{\max} и

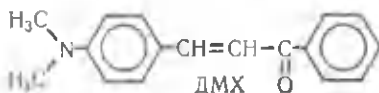
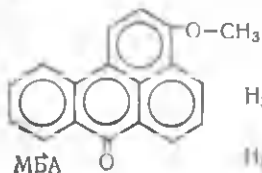
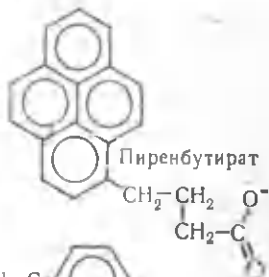
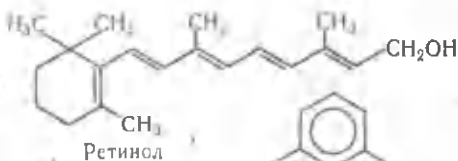
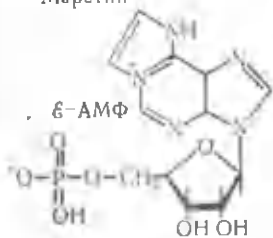
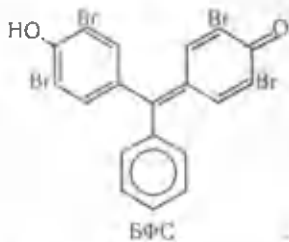
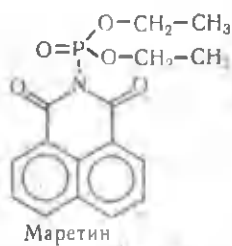
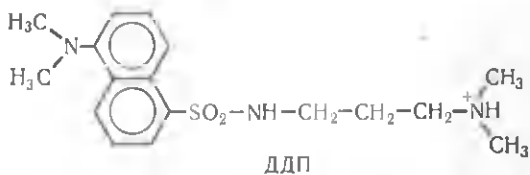
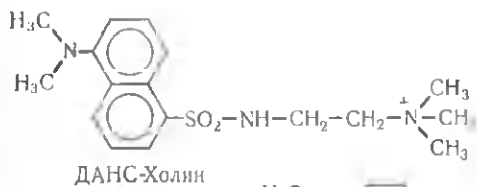
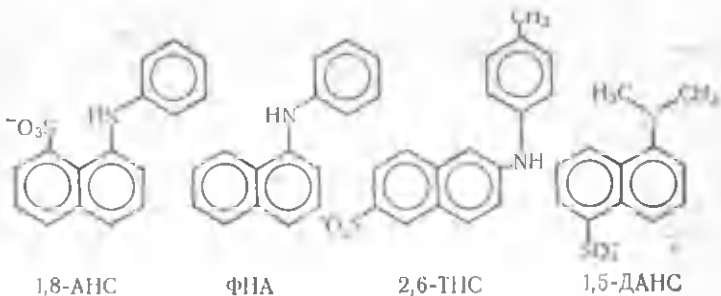


Таблица 15. Квантовые выходы и времена жизни флуоресцентных зондов (по Г. Е. Добрецову)

Зонд	Среда	Квантовый выход	Время жизни, нс
1,8-АНС	Вода	0,0032	—
	Ацетон	0,39	—
	n-Бутанол	0,56	—
	Сывороточный альбумин	0,75	16
2,6-ТНС	Вода	0,0008	—
	Этанол	0,52	—
	Лецитин	—	11—12
1,5-ДАНС	Вода	0,53	—
1,5-ДАНС	Вода	0,05	4
	Сывороточный альбумин	0,84	22
ФНА	Сывороточный альбумин	0,4	9,6
МБА	Диметилформамид	0,67	13
Перилен	Лецитин	—	5,3

квантового выхода АНС изучено во многих модельных экспериментах, которые показывают, что при уменьшении полярности квантовый выход флуоресценции АНС увеличивается, а λ_{\max} смещается в коротковолновую область (рис. 116). Квантовый выход флуоресценции более чувствителен к изменению полярности окружения, чем λ_{\max} .

Однако физическая природа изменения квантового выхода флуоресценции менее ясна, чем физическая природа сдвига λ_{\max} . Видимо в возбужденном состоянии молекула АНС имеет больший дипольный момент и, естественно, затрачивает значительную часть энергии на переориентацию молекул полярного растворителя. В то же время неполярный растворитель оказывает меньшее возмущающее действие на возбужденную молекулу АНС. В результате этого в полярном растворителе меньшая часть энергии возбуждения расходуется на излучение, и спектр излучения АНС в полярном растворителе смещен в длинноволновую область спектра.

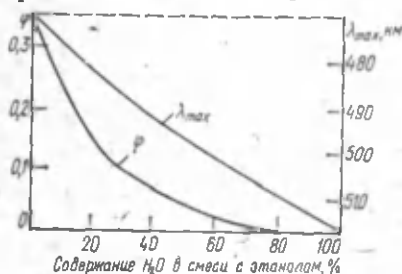


Рис. 116. Изменения положения максимума спектра излучения λ_{\max} и квантового выхода ϕ 1,8-АНС при изменении полярности окружения в смеси H_2O —этанол (по Л. Стриер, 1968).

Определение параметров связывания зондов с белками. Реакцию связывания зонда [A] с белком [B] с образованием комплекса [AB] можно записать в виде уравнения:



При этом константа связывания k равна:

$$k = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{r}{c(N-r)}, \quad (27)$$

где c и r — концентрации свободного и связанного зонда соответственно; N — концентрация связывающих центров.

Обычно известны лишь исходные концентрации реагирующих веществ; все остальные параметры определяются экспериментально. Для этого строят график в координатах $r = f(r/c)$ (график Скэтчарда).

Для построения графика запишем уравнение (27) в виде:

$$kN - kr = r/c. \quad (28)$$

Проанализируем уравнение (28). При $c \gg r$ отношение $r/c \rightarrow 0$, значит $k(N-r) = 0$. Так как $k \neq 0$, то $(N-r) = 0$ и, следовательно, $N = r$.

Следовательно, график Скэтчарда отсекает на оси ординат отрезок, равный числу связывающих центров N .

При больших разбавлениях, когда $r \rightarrow 0$, $r/c = kN$, т. е. график Скэтчарда отсекает на оси абсцисс отрезок, равный kN . Отсюда, зная N , можно определить константу связывания k .

Для определения параметров связывания необходимо знать величины r и c , что легко сделать, если какой-либо из параметров флуоресценции сильно изменяется при связывании. Такими параметрами являются квантовый выход и интенсивность флуоресценции. Предположим, что несвязанная молекула не флуоресцирует, а связанная молекула флуоресцирует с интенсивностью I . В этом случае, построив график $1/I = f\left(\frac{1}{r+c}\right)$, можно получить величину k , равную отрезку, отсекаемому на оси абсцисс.

Этот метод определения параметров связывания зонда с белками применяется довольно часто. Однако он основан на исходном предположении о некооперативности процесса связывания и на том, что несвязанные молекулы не флуоресцируют. На практике же встречаются все типы взаимодействий, т. е. кооперативные и некооперативные. Возможно также наличие в составе одной белковой молекулы нескольких центров связывания. Однако обычно количество центров связывания бывает не больше двух.

Исследование топографии белковой молекулы с помощью зондов. С помощью флуоресцентного зонда, имеющего положительный или отрицательный заряд, можно исследовать заряд центра связывания. Так, изучение связывания АНС с сывороточным альбумином быка показало, что модификация аргининовых радикалов, входящих в состав белковой молекулы, приводит к значительному ослаблению флуоресценции зонда. В исследованиях взаимодействия АНС с продуктами химотрипсинового гидролиза сывороточного альбумина АНС связывался только с пептидами, обогащенными аргининовыми остатками. На основании экспериментов можно сделать вывод о том, что центр сорбции красителя в составе сывороточного альбумина обогащен аргининовыми радикалами. Таким образом, применяя набор зондов, имеющих различную физико-химическую природу, можно изучать особенности структуры связывающих центров белковой молекулы.

Информация о структуре белковой молекулы, получаемая с помощью метода флуоресцентных зондов носит, как видно из приведенных примеров, косвенный характер. Имеются попытки ввести абсолютную шкалу, характеризующую физические свойства микроокружения зонда. Проще всего было бы связать положение зонда с каким-либо параметром, характеризующим полярность окружения зонда. Однако ни один из флуоресцентных параметров зондов не связан прямой зависимостью с параметрами, характеризующими «полярность» среды (диэлектрической проницаемостью, коэффициентом преломления или дипольным моментом молекул растворителя). Предложен эмпирический параметр Z , отражающий «полярность» окружения. Параметр Z численно равен энергии электронного перехода, происходящего при поглощении кванта света молекулой 1-этил-4-карбометокси-пиридина иодида в данной среде.

Использование флуоресцентных зондов для изучения структурных перестроек в белках. Особенно хорошо изучены с помощью флуоресцентных зондов структурные переходы молекулы сывороточного альбумина. Известно, что при $pH=3,6$ в сывороточном альбумине происходит структурный переход ($N \rightarrow F$ -переход). Однако используемые методы (дисперсии оптической активности, кругового дихроизма, собственной флуоресценции) при $pH=5-9$ каких-либо существенных структурных изменений не регистрировали. Применение флуоресцентных зондов дало возможность выявить структурные изменения в молекуле сывороточного альбумина при $pH=8-9$. По результатам этих экспериментов построен график (рис. 117).

Как видим, наибольшее изменение флуоресценции у нейтральных зондов ДМХ и МБА; у АНС изменяется флуоресценция незначительно. В то же время у дансильной метки, ковалентно связанной с молекулой белка, флуоресценция не изменяется.

Измерение миграции энергии между хромофорами в составе белковой молекулы. При определенной комбинации двух типов хромофоров возможна миграция поглощения энергии с одного из них (донора) на другой (акцептор). Эффективность миграции энергии характеризуется радиусом Ферстера — R_0 .

R_0 — расстояние, на котором вероятность миграции энергии равна 1/2.

Радиусы Ферстера для некоторых донор-акцепторных пар хромофоров равны:

Донор	Акцептор	R_0 , нм
Триптофан	1,8-АНС	2,0—3,3
Тирозин	1,5-ДАНС	2,0
Триптофан	1,5-ДАНС	2,1
1,8-АНС	1,8-АНС	2,7
Антрацен	Перилен	3,1
Флуоресцеин	Цитохром С	5,1
Родамин В	Гемоглобин	5,5
1,5-ДАНС	Миоглобин	6,3

При наличии миграции энергии в системе изменяются следующие параметры флуоресценции донор-акцепторной пары:

- 1) уменьшаются интенсивность и время жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора;
- 2) усиливается флуоресценция акцептора параллельно с ослаблением флуоресценции донора;
- 3) спектр возбуждения акцептора частично совпадает со спектром поглощения донора.

Измеряя миграцию энергии, можно определить расстояние между хромофорами в составе биополимера.

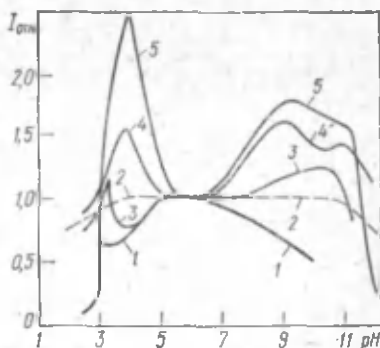


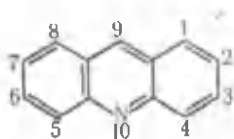
Рис. 117. Структурные изменения в сывороточном альбумине при изменении pH (по Г. Е. Добрецову, 1975).

1 — собственная флуоресценция белка; 2 — поляризация флуоресценции дансильной метки; 3 — флуоресценция 1,8-АНС; 4 — флуоресценция ДМХ; 5 — флуоресценция МБА.

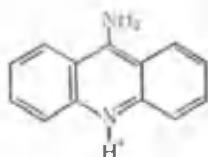
Таблица 16. Оптические характеристики флуоресцентных зондов, используемых для исследования нуклеиновых кислот (по О. Ф. Борисовой и А. Н. Суровой, 1973).

Оптические и флуоресцентные характеристики	Акридин оранжевый (АО)		Бромистый этидий (ЭБ)		Профлавиин (ПФ)		Акрифлавиин (АФ)	
	в воде	на ДНК	в воде	на ДНК	в воде	на ДНК	в воде	на ДНК
Максимум поглощения, нм	494	503	480	520	443	460	452	465
Коэффициент молярной экстинкции в максимуме поглощения ϵ	56000	55000	5600	4700	41000	37000	46800	45000
Максимум флуоресценции, нм	530	530	590	590	520	510	505	500
Полуширина полосы флуоресценции, нм	71	50			73	60	73	45
Абсолютный квантовый выход флуоресценции ρ	0,35	0,90	0,007	0,14	0,7	$0,23 \pm 0,02$	0,7	0,29
Длительность флуоресценции τ , нс	2	5	1	23	4,3	$4,5 \pm 0,05$	4,5	4,5
Радиус миграции R_0 , нм		5,0		1,6				3,3
Поляризация флуоресценции P , %	2—3	36—38	2—3	30	2—3	36 ± 3	2—3	36

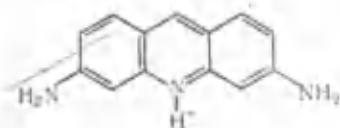
Исследование структуры нуклеиновых кислот с помощью флуоресцентных зондов. Флуоресцентные зонды (красители) широко применяются при исследовании нуклеиновых кислот. Ниже приведены структурные формулы, а в табл. 16 — оптические характеристики некоторых из красителей, используемых в эксперименте:



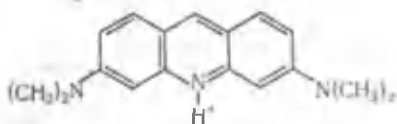
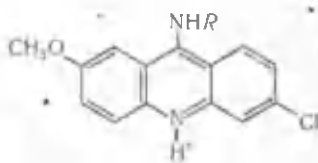
Акридин



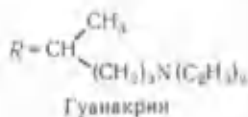
9-Аминоакридин



Профлавин



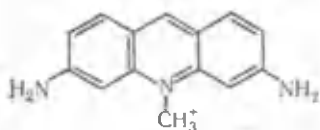
Акридин оранжевый



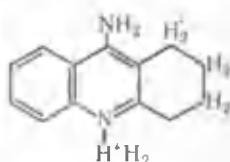
Гуанакридин



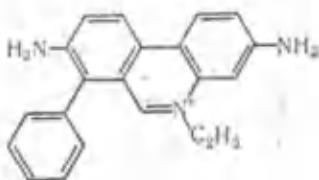
Акририл



Акрифлавин



9-Амино-1,2,3,4-тетрагидроакридин (ТНА)



Этидий бромистый

Особенно хорошо изучены красители акридинового ряда, что обусловлено рядом причин:

1. Аминоакридины являются сильнодействующими противобактериальными и мутагенными агентами.

2. Аминоакридины, обладая положительным зарядом и тремя плоскими ароматическими кольцами, структурно подобны некоторым соединениям, взаимодействие которых с ДНК представляет особый интерес, так как в их число входят канцерогены, некоторые антибиотики, производные нуклеиновых кислот (пурины, нуклеозиды), некоторые цитологические красители.

3. Некоторые красители способны изменять третичную структуру ДНК (суперспирализацию), — имеется много данных о нарушении суперспирализации ДНК при связывании с бромистым этидием.

4. Взаимодействие молекул красителей с ДНК является частным случаем более широкого взаимодействия малых молекул с биологическими макромолекулами.

При исследованиях взаимодействий малых молекул с биополимерами применяют метод равновесного диализа, анализ распределения молекул красителей между двумя несмешивающимися растворителями, спектрофотометрический и спектрофлуориметрический методы и многие другие.

Задача исследователя при применении этих методов состоит в том, чтобы из экспериментальных данных получить параметры, достаточные для построения графика Скэтчарда. Построение этих графиков и их анализ полностью подобен описанным выше экспериментам по связыванию флуоресцентных зондов с белками.

Спектрофотометрический метод. Многие красители, связываясь с макромолекулами, изменяют свои электронные спектры поглощения. Спектр поглощения акридиновых красителей, например, смещается в длинноволновую область, когда они связываются с нуклеиновыми кислотами в мономерной форме. Однако, в связи с тенденцией к агрегации аминоакридинов, такие «мономерные» спектры возможны лишь в очень разбавленных растворах. Например, спектр поглощения АО в мономерной форме (разбавленные растворы) имеет максимум при 492 нм, в то время, как его димерная форма (концентрированные растворы) имеет максимум при 464 нм. При взаимодействии АО с нуклеиновыми кислотами поглощение «мономерной» полосы смещается к 505 нм. При дальнейшем увеличении концентрации АО связывается с нуклеиновыми кислотами в димерной форме ($\lambda_{\max} = 465$ нм) и при очень высоких concentra-

циях проявляется полоса поглощения агрегатов АО ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ нм}$).

Соответственно выделяют спектры поглощения АО, связанного с нуклеиновыми кислотами α - ($\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ нм}$), β - ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ нм}$) и γ ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ нм}$)-типов.

Часто спектр моно- и диамноакридинов при связывании с нуклеиновыми кислотами смещается исключительно к α -типу. Это свойство может быть использовано для определения концентрации связанных молекул аминакридинов. Правильное применение спектрофотометрического метода требует выполнения следующих условий:

1. Нуклеиновые кислоты не должны поглощать при всех длинах волн, при которых проводятся измерения. Это условие выполняется для видимой области спектра.

2. Свободные и связанные лиганды подчиняются закону Бугера — Ламберта — Бера во всей области исследуемых концентраций. Для выполнения этого условия необходимо работать с разбавленными растворами.

3. Коэффициент экстинкции связанного красителя не изменяется при изменении концентрации.

4. Имеется только один вид связанных лигандов совместно со свободным лигандом. Если же их более чем один вид, то относительное количество связанных лигандов не зависит от концентрации связанного красителя.

5. Спектры всех смесей должны иметь изобестическую точку, в которой экстинкции связанных и свободных молекул красителя равны.

6. Значение рассчитанной концентрации связанного красителя должно быть одно и то же при всех длинах волн.

Расчет концентрации связанного красителя проиллюстрируем следующей схемой (рис. 118).

Оптическая плотность при длине волны λ равна:

$$D = c\varepsilon + c_{\text{св}}\varepsilon_{\text{св}}$$

где c и $c_{\text{св}}$ — концентрация свободного и связанного красителей; ε и $\varepsilon_{\text{св}}$ — коэффициенты молярной экстинкции свободного и связанного красителей.

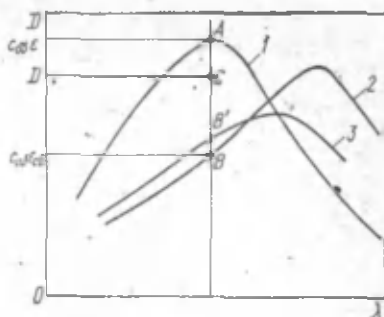


Рис. 118. Спектр поглощения свободного и связанного мономера профлавина:

1 — свободный мономер; 2 — связанный мономер; 3 — суммарный спектр связанных мономера и агрегата профлавина.

Обозначим $a_{св}$ — долю общей концентрации красителя $c_{об}$, которая приходится на связанные молекулы. Тогда

$$D = (1 - a_{св})c_{об}e + a_{св}c_{об}e_{св} = (1 - a_{св})D_{н} + a_{св}D_{св},$$

где $D_{н} = c_{об}e$ и $D_{св} = c_{об}e_{св}$ — оптические плотности раствора в случае, если все молекулы лиганда связаны ($D_{св}$) или не связаны ($D_{н}$) с нуклеиновыми кислотами. Следовательно,

$$a_{св} = \frac{D - D_{н}}{D_{св} - D_{н}} = \frac{AC}{AB} \quad \text{и} \quad c = (1 - a_{св})c_{об}.$$

Обозначим r — количество молекул лиганда, приходящееся на один фосфорный остаток в составе нуклеиновой кислоты. Тогда

$$r = \frac{a_{св}c_{об}}{P},$$

где P — концентрация фосфора, моль/л.

Если с нуклеиновой кислотой лиганд связывается не только в мономерной форме, но и в форме агрегата, то по рис. 118 можно найти:

$$a_{св} = \frac{AC}{AB'} > \frac{AC}{AB}$$

Спектрофлуориметрический метод. Связывание флуоресцентных зондов с нуклеиновыми кислотами можно изучать, исследуя спектры флуоресценции образующихся комплексов. Рассмотрим применение спектрофлуориметрического метода относительно акридина оранжевого (АО).

Молекулы АО связываются с двунитчатыми участками нуклеиновых кислот в мономерной форме, а с однонитчатыми участками — в форме димеров. Спектр флуоресценции мономера АО имеет максимум при 530 нм, а димера АО — при 640 нм. Этот факт уже давно известен цитологам, так как при окраске клеток АО наблюдается интенсивная красная флуоресценция цитоплазмы (место скопления РНК) и зеленая флуоресценция ядра (место скопления ДНК).

Спектры флуоресценции комплексов АО с нативной и денатурированной ДНК отличаются друг от друга (рис. 119). Эти спектральные отличия являются основой метода регистрации количества денатурированной ДНК в смеси с нативной (рис. 120), так как квантовые выходы и длительность флуоресценции мономеров и димеров АО отличаются.

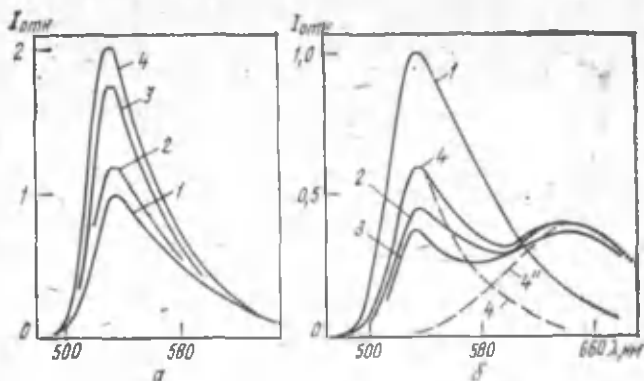


Рис. 119. Спектры флуоресценции комплексов АО с нативной (а) и денатурированной (б) ДНК (по Л. А. Тумерману, 1967):

$c_{\text{АО}} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $c_{\text{ДНК}} = 0,5, 10 \text{ и } 20 \text{ мкг/мл}$ для кривых 1, 2, 3, 4 соответственно; 4' и 4'' — кривые разложения спектров комплексов с денатурированной ДНК на мономерную и димерную составляющие.

Два типа комплексов, образуемых при взаимодействии молекул красителей с нуклеиновыми кислотами. Кривые связывания молекул лигандов с нуклеиновыми кислотами можно интерпретировать, исходя из предложения о наличии двух типов процессов связывания:

Комплекс I типа — «сильный» комплекс. В этом случае связывается 0,1—0,2 молекулы красителя на нуклеотид.

Комплекс II типа — «слабый» комплекс. При образовании комплекса II типа на один нуклеотид может приходиться до одной молекулы лиганда.

Обычно при изучении структуры нуклеиновых кислот и белковонуклеиновых комплексов используют малые концентрации лиганда, т. е. изучают, в основном, комплекс I типа. Это связано с тем, что при больших концентрациях молекулы красителя могут изменять структуру нуклеиновых кислот.

Различные физические воздействия по-разному сказываются на образовании комплексов I и II типов. Увеличение ионной силы сильнее сказывается на комплек-

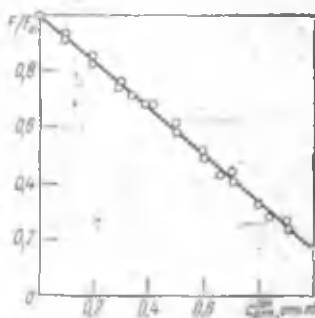


Рис. 120. Изменение интенсивности флуоресценции АО ($\lambda = 520 \text{ нм}$) в зависимости от содержания денатурированной ДНК в смеси с нативной (по О. Ф. Борисовой и А. Н. Суровой, 1973).

се II типа. Установлено, что для образования комплекса I типа необходима двунитчатая ДНК. Это доказывается экспериментами, из которых видно, что АО и бромистый этидий стабилизируют двойную спираль и увеличивают температуру плавления комплекса.

Комплекс II типа вероятно является результатом связывания агрегатов молекул красителя с нуклеиновой кислотой. Образование «слабого» комплекса II типа увеличивается при низкой ионной силе и при денатурации ДНК. Изучение агрегации молекул красителя показало, что это процесс кооперативный, т. е. наблюдается повышенная тенденция лиганда связываться с соседним, уже связанным, лигандом. Основные силы, приводящие к образованию комплекса II типа, — это электростатические взаимодействия. Комплекс I типа образуется вероятно за счет интеркаляции (вклинивания) молекул лиганда между плоскостями пар оснований таким образом, что плоскости молекул лиганда и азотистых оснований перекрываются.

Определение концентрации нуклеиновых кислот в клетке. Ранее было сказано, что при связывании с нуклеиновыми кислотами АО люминесцирует с $\lambda_{\max} = 530$ нм (мономерная форма) при связывании с двухспиральными нуклеиновыми кислотами и с $\lambda_{\max} = 640$ нм (димерная форма) при связывании с односпиральными нуклеиновыми кислотами. Поэтому, регистрируя соотношения интенсивностей люминесценции при двух длинах волн (I_{530} и I_{640}), можно измерять относительные количества различных нуклеиновых кислот в клетке или в различных участках одной и той же клетки. При этом следует иметь в виду, что малая часть I_{530} (2% при pH=4,1) обусловлена АО, связанным с белками, а часть I_{640} обусловлена АО, связанным с мукополисахаридами. Для определения доли I_{640} , обусловленной АО, связанным с мукополисахаридами, рекомендуется провести вначале контрольный опыт при pH=2,0, так как при pH=2,0 вся люминесценция при 640 нм будет обусловлена только димерами АО, связанными с мукополисахаридами. В общем случае вклад в I_{530} дадут двуспиральные РНК, а вклад в I_{640} — денатурированные участки ДНК. Однако есть большая группа клеток, в которых однонитчатые нуклеиновые кислоты представлены в основном РНК, а двунитчатые — ДНК. Для этих клеток (например, нервных клеток или лейкоцитов) можно использовать параметр

$$\alpha = I_{640}/I_{530} = A \frac{[\text{РНК}]}{[\text{ДНК}]},$$

где A — коэффициент пропорциональности.

Обычно измеряют не абсолютные, а относительные значения параметра α , например его изменения при различных функциональных состояниях. В этом случае можно зарегистрировать динамику накопления различных структурных форм нуклеиновых кислот в клетке. Так как количество ДНК в интерфазной клетке чаще всего остается постоянным, то изменение параметра α отражает изменение синтеза РНК в клетке.

Определение относительного содержания белков и нуклеиновых кислот в клетке. Для определения следует выбрать два красителя, один из которых связывается избирательно с нуклеиновыми кислотами, а другой — с белками. В качестве высокоспецифического реагента на нуклеиновые кислоты часто используется этидий бромистый (ЭБ). Квантовый выход флуоресценции ЭБ зависит от типа субстрата, с которым он связывается. Для одного и того же вещества квантовый выход ЭБ является постоянным. При связывании с нативной ДНК интенсивность флуоресценции ЭБ возрастает примерно в 100 раз, а при связывании с РНК — в 46 раз. При связывании с другими соединениями не нуклеиновой природы флуоресценция ЭБ регистрируется на уровне фона. В качестве метки на белок обычно используют некоторые производные флуоресцеина, например дихлор-симм-триазиниламинофлуоресцеин-1 (ДХТАФ) или флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ).

Регистрируя спектр излучения цитологических препаратов, можно зарегистрировать компоненту, принадлежащую ЭБ ($\lambda_{\max} = 590$ нм), ДХТАФ (527 нм) или ФИТЦ (530 нм) и тем самым измерить соотношение содержания нуклеиновых кислот и белков в изучаемой ткани. В последнее время широко применяется метод иммунофлуоресценции, когда молекулу антитела ковалентно связывают с флуоресцирующей меткой. Обработывая затем цитологический препарат раствором с мечеными белками, можно по локализации флуоресцентной метки определить расположение в клетке антигена. В качестве флуоресцентной метки при изучении иммунофлуоресценции часто используют ФИТЦ.

Таким образом, с помощью красителей можно изучать относительное содержание в препаратах белков, нуклеиновых кислот, углеводов и липидов. При подборе красителей необходимо соблюдать следующие условия:

1. Максимумы спектров люминесценции красителей должны быть максимально сдвинуты друг относительно друга.
2. Интенсивности люминесценции красителей в клетке должны быть одного порядка.
3. Спектры поглощения их должны быть близкими.

4. Красители должны избирательно и количественно связываться с изучаемыми макромолекулами.

Изучение структуры дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП) с помощью флуоресцентных зондов. Генетический материал эукариотов находится в клетке в виде хроматина: комплекса ДНК с другими макромолекулами, важнейшими из которых являются белки. В таком комплексе характер взаимодействия молекул красителей с ДНК будет изменен. Поэтому, изучая спектральные параметры флуоресцентных зондов, связанных со свободной ДНК и с ДНП, можно получить важные данные о структуре ДНК и белков в составе ДНП.

Известно, что при увеличении ионной силы раствора ДНК и белки диссоциируют поэтому, изучая изменение интенсивности флуоресценции красителя при ступенчатой диссоциации белка от ДНП, можно оценить количество занятых белком мест на ДНП. Ниже приведены результаты эксперимента по изучению связывания АО с ДНП при увеличении концентрации NaCl в среде. Количество связывающих АО мест в свободной ДНК принято за 100%.

<i>Молярность растворов NaCl</i>	<i>Количество связанных с белком мест, определенное по связыванию АО, %</i>	<i>Количество оставшегося после диссоциации белка, %</i>
0,0015	68	100
0,6	54	75
0,8	3	57
1,0	17	25

Как видим, фракция гистонов, диссоциировавшая до 0,6 М раствора NaCl, освобождает минимальное число связывающих мест. В то же время даже в 1,0 М растворе NaCl не все связывающие места на ДНК в составе ДНП доступны для взаимодействия с АО.

Изучение связывания ЭБ с ДНП эритроцитов кур показало, что связывание увеличивается примерно в 5 раз при искусственной реактивации эритроцитов (в норме ДНП эритроцитов птицы плотно упакован и матричный синтез на них подавлен). Параллельно увеличивалась дисперсность ДНП. Поэтому полученный результат свидетельствует о том, что при активации ДНП происходит его дисперсия и увеличивается доступность ДНК для взаимодействия с ЭБ. В подобных экспериментах была изучена блокировка связывающих ЭБ мест на ДНК при взаимодействии ДНК с различными хромосомальными белками. Наиболее эффективно блокирует связывание ЭБ с ДНК гистон H1 и гистон H5 из эритроцитов птиц.

При изучении матричного синтеза РНК в бесклеточной системе установлено, что его усиление идет параллельно с увеличением количества связывающих ЭБ мест на ДНК в составе ДНП.

Из антибиотиков подавляет процесс транскрипции актиномицин Д (АМД). В то же время АМД имеет в своем составе хромофорную группу, интеркалирующую между основаниями ДНК. Поэтому изучение связывания АМД с ДНК и ДНП представляет особый биологический интерес. Генетически активный эухроматин связывает АМД в 4 раза больше, чем генетически неактивный гетерохроматин. Экстракция гистонов из хроматина приводит к выравниванию этого отношения. Интактные клетки связывают значительно меньше АМД, чем изолированный ДНП. Связывание АМД с реконструированным ДНП (т. е. ДНП, «собранным» из взятых отдельно ДНК и белков) показало, что гистон H1 не мешает связыванию АМД с ДНК, но мешает связыванию ЭБ с ДНК. Следовательно, гистон H1 не связывается с малой бороздкой ДНК. Это подтверждается экспериментами последних лет, в которых изучалась защита гистонами различных химических групп в составе ДНК от модифицирующих агентов.

В последние годы для исследования структуры ДНК хроматина и хромосом широко применяется флуоресцентный краситель гуанакрин, особенно после работ Касперсона, доказавшего наличие дифференциальной окраски метафазных хромосом при взаимодействии с гуанакрином. Особенности флуоресценции разных участков хромосом при связывании с гуанакрином ясно указывает на их различную структурную организацию.

Флуоресценция гуанакрин усиливается при взаимодействии с А—Т-парами, ослабляется при взаимодействии с Г—Ц-парами ДНК и зависит от последовательности оснований в составе ДНК. Есть также данные о том, что спектральные свойства гуанакрин изменяются дифференцированно при связывании этого красителя с различными фракциями гистонов. Таким образом, физические закономерности связывания гуанакрин с ДНП изучены еще недостаточно, но их изучение чрезвычайно перспективно, так как оно позволит связать функциональные и структурные особенности хромосом.

Интересным и перспективным методом изучения структуры ДНП является метод изучения резонансной миграции энергии между различными флуоресцентными зондами, связанными с ДНП. Подробно о принципах изучения миграции энергии будет рассказано ниже.

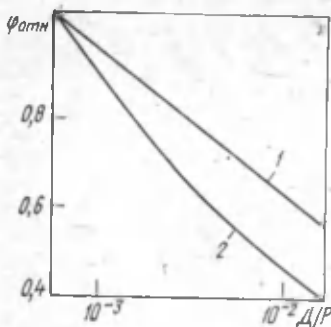


Рис. 121. Квантовый выход флуоресценции комплексов АО—ДНК (1) и АО—ДНП (2) в зависимости от концентрации метиленовой сини (по О. Ф. Борисовой и А. Н. Суrowой, 1973):

D/P — количество связанного красителя, рассчитанное на 1 нуклеотид ДНК.

Здесь же заметим, что при определенных условиях часть энергии, поглощенной одной молекулой (донором), может не излучаться в виде люминесценции, а мигрирует на другую молекулу (акцептор). В частности, при изучении структуры ДНП нашла применение пара АО (донор) — метиленовая синь (акцептор). Зависимость относительного квантового выхода флуоресценции АО в комплексе с ДНК и ДНП ϕ от концентрации метиленовой сини D/P (рис. 121) показывает, что квантовый выход флуоресценции АО значительно выше при связывании с ДНК, чем при связывании с ДНП. Следовательно, в ДНП расстояние между донором и акцептором меньше, чем в ДНК.

Таким образом, за счет наличия гистонов увеличивается концентрация молекул красителя на отдельных участках ДНП. Теоретические расчеты показали, что длина занятого белком участка в ДНП должна быть не менее 100 пар оснований. Эти результаты хорошо согласуются с данными последних лет, согласно которым комплекс ДНК и гистонов в составе хроматина состоит из повторяющихся блоков (нуклеосом). В составе нуклеосомы с гистонами связан участок ДНК длиной 146 пар оснований.

Изучение структуры биополимеров методом флуоресцентных меток. Изучение спектральных параметров флуоресцентных меток (хромофоров, ковалентно связанных с исследуемой молекулой) является эффективным методом исследования пространственной организации биополимеров (главным образом, белков):

Основной методический прием, используемый при этом, — это изучение миграции энергии между различными хромофорными группами, входящими в состав молекулы белка. Выделяют следующие механизмы передачи энергии от одного хромофора (донора) к другому (акцептору).

1. Радиационный перенос энергии. В этом случае спектр излучения донора перекрывается со спектром поглощения акцептора и фотон, излученный донором, поглощается акцептором.

2. Обменно-резонансный перенос энергии. Миграция

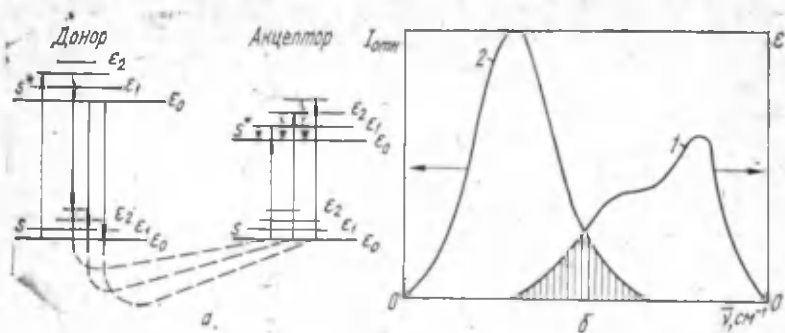


Рис. 122. Схема процесса индуктивно-резонансного переноса энергии (по Е. Я. Алфимовой, 1976):

а — система энергетических уровней донора и акцептора; *б* — спектры флуоресценции донора (1) и поглощения акцептора (2).

энергии между донором и акцептором может происходить безизлучательно, для чего требуется перекрывание электронных облаков донора и акцептора.

3. Индуктивно-резонансный перенос энергии. Миграция энергии осуществляется безизлучательно и для ее осуществления не требуется перекрывания электронных облаков донора и акцептора.

Обычно в эксперименте изучается индуктивно-резонансный перенос энергии (рис. 122). Причиной миграции энергии в этом случае является электростатическое взаимодействие электрических зарядов донора и акцептора.

В том случае, если молекула акцептора имеет синглетные уровни, совпадающие с синглетными уровнями донора, может иметь место переход безизлучательным-путем возбужденного донора в основное, а акцептора — в возбужденное состояние.

Процесс переноса энергии условно можно разделить на следующие этапы:

1. Поглощение молекулой донора энергии с переходом в возбужденное состояние.

2. Колебательная релаксация в возбужденном состоянии до установления теплового равновесия со средой или внутренняя конверсия в устойчивое возбужденное электронное состояние; скорость этих процессов равна 10^{11} — 10^{12} с⁻¹.

3. Передача возбуждения от донора к акцептору.

4. Колебательная релаксация в доноре до установления теплового равновесия с окружением.

5. Релаксация или внутренняя конверсия в молекуле акцептора.

6. Излучение или диссипация энергии акцептором.

В результате процессов (4) и (5) система выходит из резонанса, поэтому обратный перенос энергии невозможен. Согласно классификации энергетических уровней молекулы можно выделить три типа миграции энергии: синглет-синглетный ($S \rightarrow S$); триплет-синглетный ($T \rightarrow S$) и триплет-триплетный ($T \rightarrow T$). Механизм $S \rightarrow S$ - и $T \rightarrow S$ -переносов определяется диполь-дипольными взаимодействиями, которые могут осуществляться на довольно больших расстояниях (до 6,5 нм). $T \rightarrow T$ -перенос энергии осуществляется путем электронного обмена и эффективен на расстояниях меньше 1,5 нм. Количественную теорию эффективности миграции энергии развили Т. Фёрстер, М. Д. Галанин и И. М. Франк. Согласно Фёрстеру, $S \rightarrow S$ -перенос осуществляется за счет резонансного взаимодействия пары диполей: донора и акцептора. При этом эффективное расстояние R_0 , на котором вероятность $S \rightarrow S$ -переноса энергии равна 50%, определяется уравнением:

$$R_0 = 9,79 \cdot 10^3 \cdot (In^{-4} K^2 \varphi_0)^{1/6}, \quad (29)$$

где I — интеграл перекрытия спектра люминесценции донора и спектра поглощения акцептора; n — показатель преломления среды; K — фактор ориентации дипольной пары; φ_0 — квантовый выход флуоресценции донора.

Таким образом, зная спектры поглощения акцептора и излучения донора, можно рассчитать R_0 . Вычисление фактора K^2 требует точного знания геометрических параметров, однако часто при расчетах, если время реориентации меньше времени жизни возбужденного состояния донора, используют значение $K^2 = 2/3$.

При случайной, но фиксированной ориентации $K^2 = 0,476$. Эффективность переноса энергии E равна:

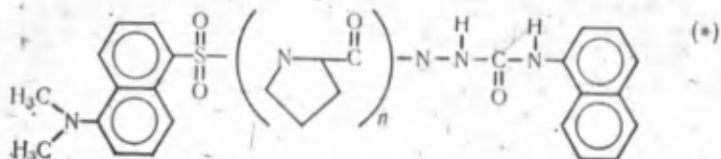
$$E = \frac{\varphi_0 - \varphi}{\varphi_0}, \quad (30)$$

где φ_0 и φ — квантовые выходы флуоресценции донора без акцептора и в его присутствии.

Теория Фёрстера связывает величину E с расстоянием R между донором и акцептором:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6} \quad \text{или} \quad R = \frac{R_0}{(\varphi_0/\varphi - 1)^{1/6}}.$$

Как видим, на основании эффективности передачи энергии можно вычислить расстояние между донором и акцептором. Правильность формулы была проверена на соединении:



В этом соединении олигомеры поли-*L*-пролина используются как прокладка переменной длины для разделения донора и акцептора на расстоянии от 1,2 до 4,6 нм. α -Нафтильная группа используется в качестве донора, а дансильная группа — в качестве акцептора энергии. Выбор этой пары иллюстрирует принцип подбора донор-акцепторной пары. Спектры поглощения и излучения α -нафтильной и дансильной групп отличаются, что удобно для подсчета количества энергии, поглощенной и излученной каждой группой. Эти группы имеют большой интеграл перекрытия. α -Нафтильная группа имеет высокий квантовый выход без акцептора. Дансильная группа имеет высокий квантовый выход флуоресценции, что облегчает регистрацию флуоресценции. Эффективность миграции энергии в случае соединения (*) была зарегистрирована по спектрам возбуждения акцептора. Напомним, что спектр возбуждения — это зависимость интенсивности в максимуме спектра излучения от длины волны возбуждающего света. Спектр возбуждения изолированного хромофора совпадает с его спектром поглощения (рис. 123). При введении пары донор — акцептор в спектре возбуждения дансильной группы появляется дополнительная компонента, соответствующая спектру поглощения донора.

При определенной длине волны ордината в спектре возбуждения F связана с эффективностью передачи энергии E и коэффициентами экстинкции донора ϵ_d и акцептора ϵ_a выражением: $F = \epsilon_a + E\epsilon_d$.

Дансильная группа имеет максимум поглощения при 340 нм, а α -нафтильная группа — при 290 нм.

Как видим из рис. 123, когда донорную и акцепторную группу разделяет один пропильный остаток, спектр возбуждения равен сумме спектров поглощения донора и акцептора, что соответствует эффективности передачи энергии 1,0. С увеличением числа пропильных остатков эффективность миграции энергии уменьшается. Используя уравнение (29) и данные рис. 123, можно построить график зависимости E от R между донором и акцептором (рис. 124).

Как следует из рис. 124, экспериментальные результаты хорошо согласуются с теоретической кривой, построенной в соответствии с уравнением (29).

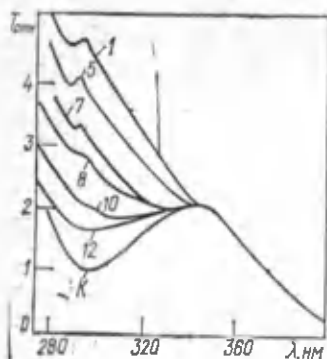


Рис. 123. Спектр возбуждения пары донор—акцептор (по Л. Стриер, 1968):

K — дансил-*L*-пролил-гидразид;
 1 — дансил-*L*-пролил- α -нафтил;
 5, 7, 8, 10, 12 — дансил-(*L*-пролил) $_n$ - α -нафтил, где $n=5, 7, 8, 10, 12$ соответственно.

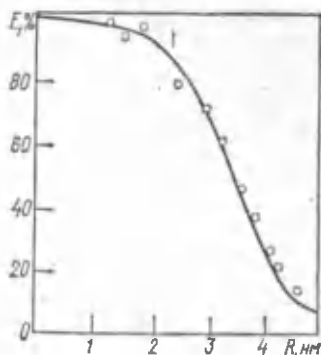


Рис. 124. График зависимости эффективности передачи энергии от расстояния между донором и акцептором.

На практике возможны случаи, когда изучаемая система содержит различное соотношение донорных и акцепторных групп. Теория дает для этих случаев следующие выражения:

1. Один донор — n акцепторов

$$\varphi/\varphi_0 = 1 + \sum_{i=1}^n (R_0/R_i)^6 \quad \text{при } R_i = R;$$

$$R = R_0 n^{1/6} (\varphi/\varphi_0 - 1)^{-1/6}.$$

2. m Доноров — один акцептор

$$\varphi/\varphi_0 = 1/m \sum_{j=1}^m [1 + (R_0/R_j)^6]^{-1}.$$

3. m Доноров — n акцепторов

$$\varphi/\varphi_0 = 1/m \sum_{j=1}^m [1 + \sum_{i=1}^n (R_0/R_{ij})^6]^{-1}.$$

В качестве примера использования флуоресцентных меток для исследования структуры белков рассмотрим результаты исследования структуры нитрогеназы. В состав этого белка входит железосеросодержащий центр (ЖСЦ), а также активный центр, катализирующий АТФазную реакцию. Метод флуоресцентных меток был применен для изучения

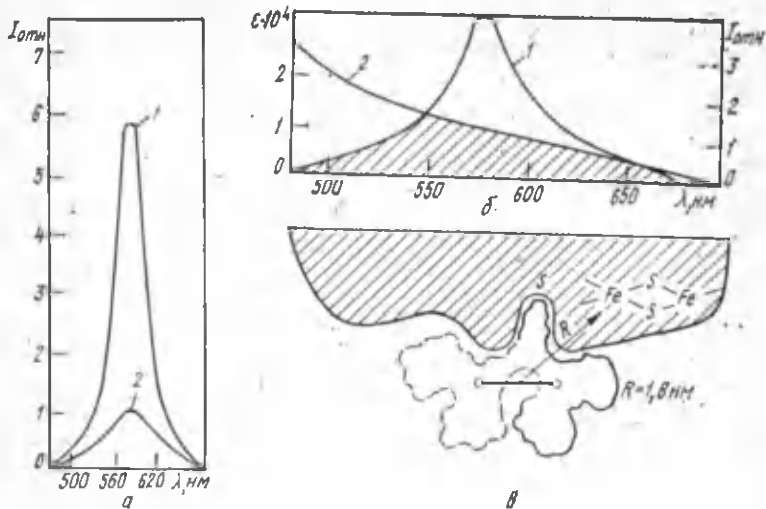


Рис. 125. Изучение строения активного центра нитрогеназы методом флуоресцентных меток (по Е. Я. Алфимовой, 1976):

а — спектры флуоресценции метки МИР в растворе (1) и нитрогеназы, модифицированной меткой МИР по сульфгидрильным группам АТФазного центра (2); б — спектры флуоресценции метки МИР (1) и поглощения нитрогеназы (2); в — фрагмент активного центра модифицированной нитрогеназы. Показаны возможные конформации метки МИР, стрелкой обозначено расстояние между усредненным центром хромофора метки МИР и ближайшим центром тушения флуоресценции.

взаимного расположения этих двух центров. В эксперименте использованы две метки: маленизоимидородоамин Б (МИР) и флуоресцин-димеркуриацетат (ФДМА). Нитрогеназу модифицировали либо МИР либо ФДМА. Обе эти метки ковалентно связываются с SH-группами, которые есть в активном центре нитрогеназы. При связывании этих меток с белком интенсивность их флуоресценции уменьшается в 6—8 раз. На основании перекрытия спектра излучения МИР и спектра поглощения ЖСЦ (рис. 125) было сделано предположение, что энергия, поглощенная МИР или ФДМА, эффективно мигрирует на ионы железа.

На рис. 125 показано также изменение спектров флуоресценции МИР при связывании с нитрогеназой. Если из состава нитрогеназы удалить ионы железа, то интенсивности флуоресценции МИР, связанной с белком и в растворе, равны. По теоретическим расчетам расстояние между центром хромофора МИР и ЖСЦ равно 1,7—1,8 нм. Используя данные о молекулярных размерах МИР, можно сделать вывод о практически полном контакте между ЖСЦ и АТФазным центром нитрогеназы.

Триплет-триплетный перенос энергии ($T \rightarrow T$). В. Л. Ермолаев и Е. Б. Свешников в 1952 году показали, что фосфоресценцию нафталина можно вызвать с помощью излучения с длиной волны, лежащей вне спектра поглощения нафталина, если в раствор добавить бензальдегид или бензофенон. Это явление называется сенсibilизированной фосфоресценцией. Объяснить это явление можно, если сделать предположение о переносе энергии. При этом энергия электронного возбуждения от триплетных молекул бензальдегида или бензофенона передается к невозбужденным молекулам нафталина и переводит их прямо в триплетное состояние. Точная зависимость эффективности $T \rightarrow T$ -переноса от расстояния не совсем ясна, однако явление сенсibilизированной фосфоресценции было использовано для изучения структуры некоторых белков.

Например, при исследовании карбоангидразы изучалось расположение триптофанилов относительно активного центра. В качестве донора использована метка *m*-ацетилбензолсульфонатамид (МАБС), которую связывали с атомом цинка в активном центре. Возбужденный синглетный уровень МАБС ниже, чем у триптофана, а триплетный — выше. Это создает возможность для возбуждения триптофана пользоваться излучением с длиной волны 330 нм, т. е. в области, где триптофан не поглощает. Действительно, если возбуждать МАБС излучением с длиной волны 330 нм, наблюдается фосфоресценция триптофана. Поскольку $T \rightarrow T$ -перенос энергии эффективен только на малых расстояниях (менее 1,5 нм), то полученный результат доказывает наличие триптофана в непосредственной близости от активного центра карбоангидразы. МАБС был также присоединен к серину, который находится в активном центре химотрипсина. Отсутствие $T \rightarrow T$ -переноса, как в случае с карбоангидразой, показало, что ни один из восьми триптофанилов химотрипсина не находится вблизи активного центра этого фермента.

Триплет-синглетный перенос энергии ($T \rightarrow S$). Этот интеркомбинационный перенос запрещен спиновыми правилами отбора и может эффективно происходить только в том случае, если параллельно с ним развиваются только запрещенные процессы дезактивации молекул. Такая ситуация наблюдается при триплет-синглетном переносе энергии в замороженных твердых растворах. Механизм $T \rightarrow S$ -переноса — индуктивно-резонансный; $T \rightarrow S$ -перенос эффективен, как и $S \rightarrow S$ -перенос, на расстояниях до 6,5 нм и поэтому используется для исследования расстоя-

ний между донорными и акцепторными хромофорными группами.

Как следует из изложенного выше, резкая зависимость эффективности миграции энергии от расстояния делает измерение этой эффективности перспективным методом для изучения топографии белковой молекулы. При этом возможны различные комбинации пары донор — акцептор, например когда в качестве донора или акцептора выступает собственный хромофор белка (простетическая группа или ароматическая аминокислота) или когда оба члена пары донор — акцептор являются флуоресцентными метками.

Особенно эффективен метод флуоресцентных меток в том случае, если точно локализовано место в составе полипептидной цепи, с которым связана метка.

§ 23. РАССЕЯНИЕ СВЕТА РАСТВОРАМИ БИОПОЛИМЕРОВ (РЭЛЕЕВСКОЕ РАССЕЯНИЕ)

Изучение закономерностей рассеяния света молекулами биополимеров является эффективным методом исследования размеров и формы этих молекул. Следует различать два методических подхода при измерении светорассеяния растворов. Один из них описывает закономерности рассеяния света частичками, размер которых значительно (\sim в 10—20 раз) меньше длины волны падающего излучения. В этом случае молекула выступает как один рассеивающий центр, и связь между параметрами рассеянного света и размерами рассеивающей частички описывается уравнением Рэлея. Другой методический подход используется при описании рассеяния света частичками, размер которых сравним с длиной волны падающего излучения. В этом случае в составе одной молекулы может существовать несколько независимых осцилляторов, испускающих вторичное излучение, и придется учитывать интерференцию света, рассеянного различными частями одной и той же молекулы.

Рассмотрим рассеяние света малыми частичками.

При облучении светом частички, находящейся в растворе, в ней наводится электрический диполь, который является источником вторичного излучения. Р. Рэлей показал, что интенсивность J_{θ} неполяризованного света, рассеянного отдельной молекулой под углом θ , выражается уравнением:

$$\frac{J_{\theta}}{J_0} = \frac{8\pi^4 n^2 (1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2}, \quad (31)$$

где J_0 — интенсивность рассеянного света; J_{θ} — интенсив-

ность падающего света; r — расстояние от рассеивающей частички до измерителя; λ — длина волны ($\lambda = \lambda_0/n_0$, где λ_0 — длина волны в вакууме, а n_0 — показатель преломления среды); α — поляризуемость молекулы (индуцированный момент частички в расчете на единицу напряженности электрического поля).

Введем в уравнение (31) следующие обозначения: $R_\theta = J_\theta^2/J_0$ — приведенная интенсивность, или число Рэлея; N — число рассеивающих молекул в единице объема; $N = \rho N_A/M$, где ρ — плотность вещества; N_A — число Авогадро; M — молекулярная масса.

Тогда уравнение (31) примет вид:

$$R_\theta = \frac{8\pi^4 \alpha^2 \rho N_A}{\lambda^4 M} (1 + \cos^2 \theta). \quad (32)$$

За счет рассеяния ослабление интенсивности света, прошедшего через раствор, уменьшается по закону, аналогичному закону Бугера — Ламберта — Бера:

$$J_\theta/J_0 = e^{-\tau x}, \quad (33)$$

где τ — мутность среды; x — расстояние, пройденное светом.

Величина τ выражается уравнением:

$$\tau = \frac{32\pi^3}{3} \cdot \frac{n_0^2(n - n_0)^2}{\lambda_0^4} \cdot \frac{1}{a}, \quad (34)$$

где n и n_0 — показатели преломления раствора и растворителя соответственно; λ_0 — длина волны света в вакууме; a — число частичек в объеме, равном 1 см^3 .

R_θ и τ связаны зависимостью:

$$R_\theta = \frac{3}{16\pi} (1 + \cos^2 \theta) \cdot \tau. \quad (35)$$

Учитывая, что $a = cN_A/M$, уравнения (32), (34) и (35) можно записать в виде:

$$Hc/\tau = 1/M + 2A_2c, \quad (36)$$

где

$H = \frac{32\pi^3 n_0^2}{3\lambda_0^4 N_A} \cdot \nu^2$, а $\nu = \frac{n - n_0}{c}$ — инкремент показателя преломления.

Коэффициент A_2 учитывает взаимодействие частиц с растворителем.

Используя уравнение (36) и измеряя зависимость рассеянного света от концентрации, можно определить молекулярную массу растворенного вещества. Измерения в этом случае проводят под фиксированным углом (обычно 90°), учитывая светорассеяние чистого растворителя. Возможные погрешности измерений связаны с наличием крупных частиц в растворе, поэтому растворители очищают дополнительной перегонкой, ультрафильтрацией и центрифугированием.

Однако в биологических исследованиях большой интерес представляет измерение крупных частиц, размер которых сравним с длиной волны падающего излучения. В этом случае уравнение (36) имеет вид:

$$Hc/\tau = 1/M P(\theta) + A_2c, \quad (37)$$

где $P(\theta)$ — поправочный коэффициент, учитывающий интерференцию излучения, исходящего от различных рассеивающих центров одной частицы. Для частиц различной формы значения $P(\theta)$ будут отличаться. Кроме того, в связи с явлениями интерференции интенсивность света, рассеянного под различными углами, будет неодинаковой для частиц различного размера (эффект Ми). Для характеристики этого различия вводится специальный параметр $J_{45^\circ}/J_{135^\circ}$ — асимметрия светорассеяния, в котором J_{45° , J_{135° означает интенсивность светорассеяния под углами 45° и 135° к падающему излучению. Теоретические кривые зависимости асимметрии рассеяния от формы частиц (рис. 126) дают возможность проводить два типа исследований. Изменяя отношение $J_{45^\circ}/J_{135^\circ}$ при разных длинах волн, можно по

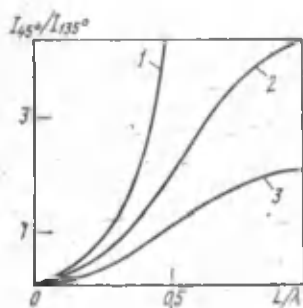


Рис. 126. Теоретические кривые зависимости асимметрии рассеяния от размера L и формы частиц:

1 — сфера; 2 — клубок; 3 — жесткая палочка.

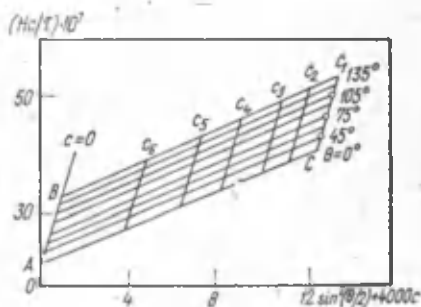


Рис. 127. Диаграмма Зимма для раствора полистирола в бензоле.

виду графика определить форму изучаемых частичек. Если же форма частичек известна, можно по соответствующему графику определить их размер.

Часто в эксперименте используется метод двойной экстраполяции, или метод Зимма. Суть этого метода заключается в следующем. Измеряют интенсивность светорассеяния под разными углами для нескольких концентраций исследуемого раствора. Результаты откладывают на графике в координатах Hc/τ и $\sin^2(\theta/2) + kc$, где k — произвольный масштабный коэффициент.

На диаграмме Зимма для раствора полистирола в бензоле (рис. 127) точка A соответствует $(Hc/\tau)_{\theta=0^\circ}$, так как

$$c=0$$

линия AB получена экстраполяцией экспериментальных данных к нулевой концентрации, а линия AC — экстраполяцией к нулевому углу рассеяния. В соответствии с уравнением (36) отрезок AO соответствует $1/M$. О размере частичек, соизмеримых с длиной волны падающего света, можно судить по спектральному изменению интенсивности проходящего света. Следует иметь в виду, что измерения светорассеяния нужно вести в спектральной области, в которой нет электронного поглощения исследуемых веществ. Например, при исследовании белков необходимо вести измерения при длине волны больше 320 нм. В этом случае зависимость оптической плотности от длины волны может быть представлена эмпирическим уравнением:

$$D = k\lambda^{-n}, \quad (38)$$

где D — оптическая плотность образца; λ — длина волны, k , n — константы, зависящие от размера частичек.

Построив график в координатах $\lg D = f(\lg \lambda)$, по его наклону определяют n . Параметр n и асимметрия рассеяния связаны с параметром Z , который в свою очередь связан с радиусом рассеивающей частички зависимостью:

$$Z = 8\pi a/\lambda, \quad (39)$$

где λ — длина волны в среде; a — радиус частички.

Значения n , $J_{45^\circ}/J_{135^\circ}$ и Z вычислены в диапазоне от 2 до 8 (данные Я. Слонима):

n	$J_{45^\circ}/J_{135^\circ}$	Z	n	$J_{45^\circ}/J_{135^\circ}$	Z
3,872	1,155	2,0	2,807	3,371	5,5
3,686	1,254	2,5	2,659	4,454	6,0
3,573	1,401	3,0	2,533	6,191	6,5
3,436	1,575	3,5	2,457	8,957	7,0
3,484	1,826	4,0	2,379	14,25	7,5
3,121	2,130	4,5	2,329	25,47	8,0
2,960	2,676	5,0			

Определив из этих данных Z , по уравнению (39) вычисляют a .

Приведенные выше значения n , $J_{45^\circ}/J_{135^\circ}$ дают возможность рассчитать a для Z в пределах от 2 до 8. Для меньших частичек можно пользоваться формулой Рэлея, причем для $Z=1,5$ относительная погрешность не превысит 2%.

Для больших частичек с $Z > 8$ применимость метода определяется из условия:

$$Z/4(m-1) < 1,$$

где m — отношение показателя преломления частички к показателю преломления среды. Это условие не выполняется при $Z > 8$ и $m = 1,5$.

Все изложенное выше применимо для шарообразных частичек. Для вытянутых или сплюснутых частичек погрешность определения размера увеличивается. Например, при соотношении осей частички больше 3 относительная погрешность определения радиуса будет больше 5%.

Светорассеяние измеряют на приборах, которые в зависимости от применяемой методики дают возможность определять интенсивность проходящего через образец света или интенсивность света, рассеянного под различными углами. В первом случае используются спектрофотометры (см. с. 179), а во втором — специальные приборы для измерения светорассеяния (рис. 128).

§ 24. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ СПЕКТРЫ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Рэлеевское рассеяние имеет частоту, равную частоте падающего излучения. Однако, если применять при регистрации чувствительные фотоприемники, то в спектре рассеянного света по обе стороны от основной (рэлеевской) линии с частотой ω_0 можно обнаружить линии низкой интенсивности с частотой $\omega_i \neq \omega_0$ (рис. 129). При этом линии с частотами $\omega_i > \omega_0$ называются стоксовскими, а линии с частотами $\omega_i < \omega_0$ называются антистоксовскими. Данное явление называется комбинационным рассеянием света, поскольку в спектрах комбинационного рассеяния (КР-спектрах) комбинируется частота излучения источника с частотой собственных колебаний молекулы. Механизм возникновения КР-спектров следующий.

В большинстве случаев при взаимодействии кванта электромагнитного излучения и молекулы исследуемого вещества в основном состоянии (с колебательной энергией E_0) происходит упругое рассеяние, при котором квант и молекула не обмениваются энергией. Поэтому частота рассеянного

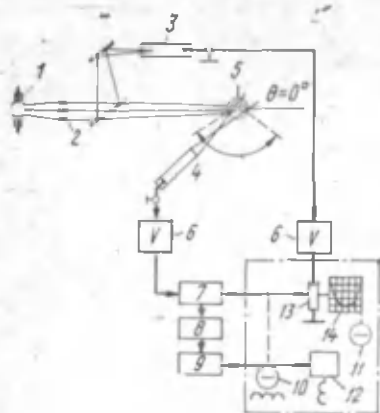


Рис. 128. Схема прибора ФПС-3 для измерения светорассеяния:

1 — ртутная лампа; 2 — коллиматор; 3, 4 — ФЭУ; 5 — кювета; 6 — предварительные усилители; 7 — схема сравнения; 8 — усилитель; 9 — фазовый детектор; 10, 11 — двигатели; 12 — сервоусилитель; 13 — реохорд; 14 — потенциометр.

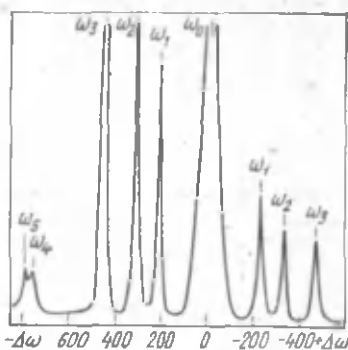


Рис. 129. Спектр комбинационного рассеяния CCl_4 .

излучения будет равна частоте падающего излучения. Однако иногда квант электромагнитного излучения взаимодействует с молекулой, которая находится на одном из возбужденных колебательных уровней с энергией E_1 . В этом случае молекула отдает избыток колебательной энергии кванту, частота которого увеличивается. В спектре рассеянного света появляется антистоксовская линия, которая смещена по отношению к рэлеевской линии в коротковолновую область.

Кроме упругого рассеяния света, происходящего без обмена энергией между молекулой и падающим излучением, возможно (с малой вероятностью) неупругое рассеяние света, в процессе которого часть энергии кванта передается молекуле. В результате такого взаимодействия молекула переходит в одно из возбужденных колебательных состояний. Энергия рассеянного излучения при этом уменьшится и в спектре появится соответствующая линия, смещенная по отношению к рэлеевской в длинноволновую область. Вероятность неупругого рассеяния очень мала, поэтому интенсивность КР-спектров значительно меньше интенсивности рэлеевского рассеяния. При этом вероятность сверхупругого рассеяния, в результате которого происходит обмен энергией кванта и возбужденной молекулы, еще меньше вероятности неупругого рассеяния. Поэтому в КР-спектрах мо-

лекулы интенсивность полос в стоксовской области значительно больше их интенсивности в антистоксовской области.

Колебательные КР-спектры широко применяют для качественного и количественного анализа органических смесей, поскольку каждому компоненту соответствуют свои стоксовские линии в спектре, а по интенсивности этих линий можно судить о количественном содержании компонента в смеси.

Так как в КР-спектрах проявляются частоты, соответствующие колебательным энергетическим уровням, то можно было бы ожидать совпадения резонансных частот в КР-спектрах и в ИК-спектрах поглощения. Однако не для всех соединений колебательные частоты КР-спектров могут наблюдаться в ИК-спектрах поглощения. Поскольку электромагнитная энергия может поглощаться только диполями, в ИК-спектре поглощения могут проявляться внутренние колебания лишь электрически заряженных составных частей молекулы. В КР-спектре проявляются все внутренние колебания молекулы, т. е. колебания ее заряженных и нейтральных частей.

Таким образом, различие между КР-спектрами и ИК-спектрами поглощения заключается в том, что в КР-спектрах регистрируются переходы, обусловленные индуцированными (мгновенными) дипольными моментами, а в ИК-спектрах — переходы, обусловленные постоянными дипольными моментами. Основное затруднение при регистрации КР-спектров заключается в низкой интенсивности рассеянного излучения. В современных КР-спектрометрах это затруднение преодолено за счет использования лазера в качестве источника излучения. Как известно, лазер дает высокоинтенсивное, монохроматическое, поляризованное излучение, что очень важно в КР-спектроскопии. Принципиальная схема КР-спектрометра содержит те же элементы, что и приборы, применяемые для измерения рэлеевского рассеяния (см. рис. 128).

Изложенные теоретические предпосылки явились основанием для применения метода комбинационного рассеяния в исследованиях структуры органических и биологических молекул.

В табл. 17 приведены характерные пики в КР-спектрах, относящиеся к конкретным атомным группировкам нуклеиновых кислот и белков. О вторичной структуре ДНК можно качественно судить по наличию пиков при 807 см^{-1} (А-форма), 836 см^{-1} (В-форма) и 870 см^{-1} (С-форма). Для всех структурных форм ДНК характерен пик при $1096\text{—}1100\text{ см}^{-1}$, который обусловлен симметричным колебанием

Таблица 17. Характерные пики в КР-спектрах нуклеиновых кислот и белков

H_2O	D_2O	Колебания, определяющие возникновение пика
807 (А-форма)	—	—
836 (В-форма)	—	—
870 (С-форма)	—	—
1015	1025	Связь С—О
1096—1100	1096—1100	Симметричная связь О—Р—О
1306	1350	Аденин
1341	1381	Аденин
1378	1429	Тимин, аденин, гуанин,
1490	1485	Гуанин, частично аденин
1514	1524	Аденин
1580	1578	Аденин, гуанин
1658—1660	—	Амид I
1270	—	Амид III
854, 828	—	Тирозин
500—550	—	Дисульфидная связь

Примечание. Цифры в таблице обозначают частоту колебаний, $см^{-1}$.

частично двойной связи О—Р—О. Характерным колебанием является также колебание в плоскости основания атома N7 гуанина вдоль связи N7—C8. Это колебание проявляется пиком при 1490 см^{-1} , небольшой вклад в который дает также аденин. Амидная группа белков проявляется в КР-спектрах полсой Амид I ($1658\text{—}1660\text{ см}^{-1}$) и Амид III (1270 см^{-1}). Ароматические боковые радикалы проявляются пиками при $1004, 854, 828\text{ см}^{-1}$. Дисульфидная связь обычно проявляет себя в области $500\text{—}550\text{ см}^{-1}$.

Детальное проявление на одних и тех же спектрах, но при разных частотах, характерных атомных группировок, принадлежащих белкам и нуклеиновым кислотам, служит предпосылкой для исследования особенностей белково-нуклеиновых взаимодействий в нативных комплексах. На рис. 130 приведен КР-спектр фрагментов хроматина из тимуса теленка, а наличие в этом спектре интенсивных пиков при 836 и 1660 см^{-1} дает возможность сделать вывод о том, что ДНК в хроматине находится в В-форме, а гистоны спирализованы примерно на 50%. Примером еще более детальной информации, получаемой с помощью КР-спектроскопии, может быть эксперимент, проведенный Д. Гудвиным и сотр. в 1978 году. Как известно, структурные особенности хроматина, а следовательно, и реализация генетической информации, определяются особенностями ДНК-белковых взаимодействий. Белки могут взаимодействовать с основаниями ДНК либо по большей либо по малой бо-

Рис. 130. Спектр комбинационного рассеяния фрагментированного хроматина тимуса телянка — препарат три- и тетрауклеосом (по Д. Гудвину и др., 1978).

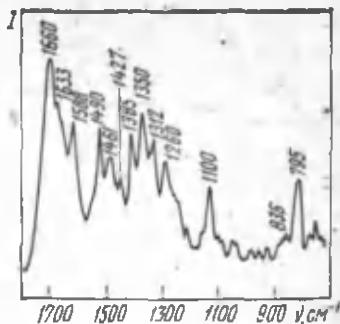
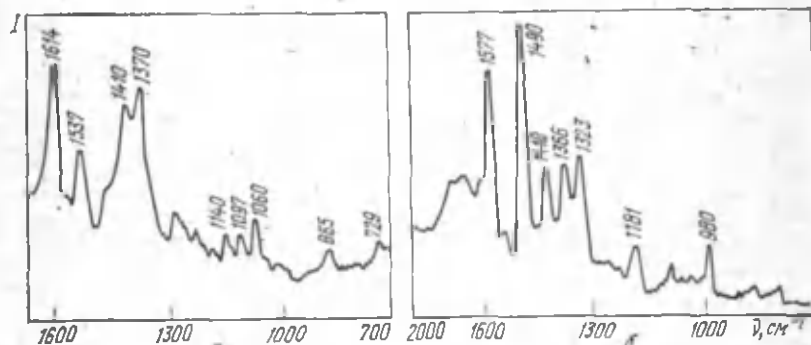


Рис. 131. Спектры комбинационного рассеяния N7-метилгуанозина (а) и гуанозина (б) (по Д. Гудвину и др., 1978).



роздке. В большую бороздку ДНК экспонирован атом N 7 гуанина, колебания которого соответствуют пику при 1490 см^{-1} . Следовательно, участие атома N 7 гуанина в межмолекулярных взаимодействиях должно привести к изменению интенсивности пика 1490 см^{-1} . Как видим из рис. 131, метилирование гуанина по атому N 7 приводит к резкому падению интенсивности пика при 1490 см^{-1} .

Ниже приведено изменение интенсивности пика при 1490 см^{-1} по отношению к инвариантному пику при 1100 см^{-1} в дезоксирибонуклеопроандах (ДНП), содержащих разное количество негистоновых белков и одинаковое количество гистонов:

ДНП	Относительная ин- тенсивность пика 1490 см^{-1}
ДНК	1,2
Моноуклеосомы тимуса телянка	1,2
Динуклеосомы тимуса телянка	1,2
Тринуклеосомы тимуса телянка	1,2
Хроматин тимуса телянка	0,6
Хроматин гепатомы Зайделя	0,2

ДНП, не содержащие негистоновые белки (моно-, ди- и тринуклеосомы), практически не изменяют интенсивность пика при 1490 см^{-1} в КР-спектрах. В то же время хроматин тимуса телят и клеток гепатомы Зайделя имеет прогрессивно уменьшающийся пик при 1490 см^{-1} в соответствии с увеличивающимся количеством негистоновых белков. Следовательно, можно сделать вывод о том, что негистоновые белки хроматина взаимодействуют с ДНК по большой бороздке, а гистоны оставляют большую бороздку ДНК свободной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Зайдель А. Н., Островская Г. В., Островский Ю. И.* Техника и практика спектроскопии. — М.: Наука, 1972.—375 с.
- Лебедева В. В.* Техника оптической спектроскопии. — М.: Изд-во МГУ, 1977.—383 с.
- Справочник конструктора оптико-механических приборов* / Под ред. В. А. Панова. — Л.: Машиностроение, 1980.—742 с.
- Фрайфелдер Д.* Физическая биохимия. — М.: Мир, 1980.—582 с.
- Методы молекулярной биологии* / Отв. ред. Г. Х. Мацука. — К.: Наукова думка, 1979.—268 с.
- Бородавкин А. В., Будовский Э. И., Морозов Ю. В., Савин Ф. А., Симукова Н. А.* Электронная структура, УФ-спектры поглощения и реакционная способность компонентов нуклеиновых кислот. — В кн.: Итоги науки и техники. Серия молекул. биол., М., 1977, т. 14, с. 1—227.
- Демченко А. П.* Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. — К.: Наукова думка, 1981.—204 с.
- Паркер С.* Фотолюминесценция растворов. — М.: Мир, 1972.—510 с.
- Черницкий Е. А.* Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. — Минск: Наука и техника, 1972. — 278 с.
- Бурштейн Э. А.* Люминесценция белковых хромофоров (модельные исследования). — В кн.: Итоги науки и техники. Серия биофиз., М., 1976, т. 6, с. 1—213.
- Бурштейн Э. А.* Собственная люминесценция белка. — В кн.: Итоги науки и техники. Серия биофиз., М., 1977, т. 7, с. 1—190.
- Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. — М.: Наука, 1980.—320 с.
- Карнаухов В. Н.* Люминесцентный спектральный анализ клетки. — М.: Наука, 1978.—278 с.
- Эскин В. Е.* Рассеяние света растворами полимеров. — М.: Наука, 1973.—321 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Пропускание стеклянных фильтров [по А. Н. Зайдель и др., 1972]

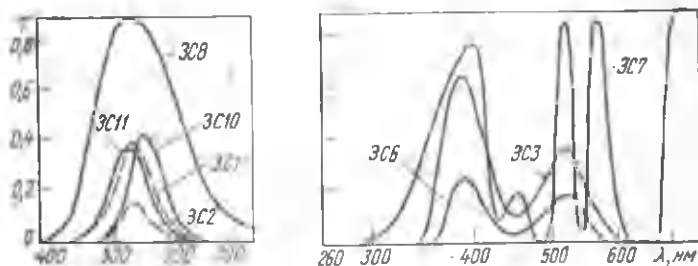


Рис. 1. Пропускание зеленых стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

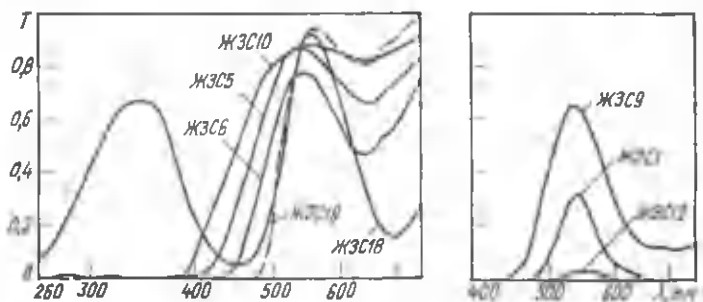


Рис. 2. Пропускание желто-зеленых стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

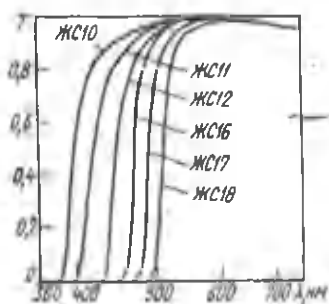


Рис. 3. Пропускание желтых стеклянных фильтров.

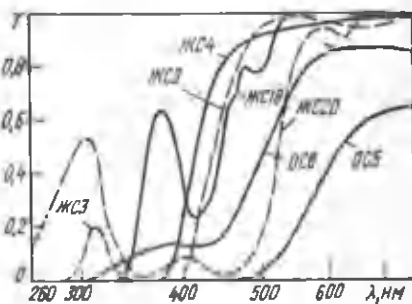


Рис. 4. Пропускание желтых и оранжевых стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

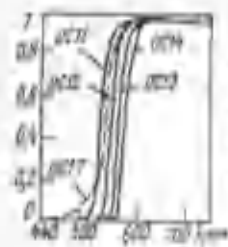


Рис. 5. Пропускание оранжевых стеклянных фильтров.

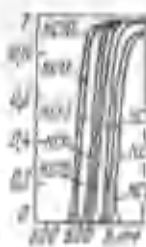


Рис. 6. Пропускание красных стеклянных фильтров.



Рис. 7. Пропускание инфракрасных стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

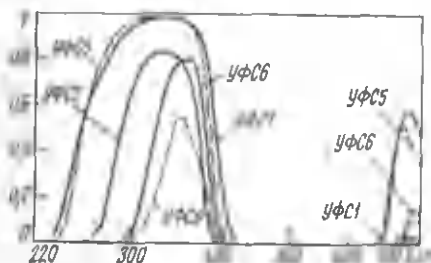


Рис. 8. Пропускание ультрафиолетовых стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

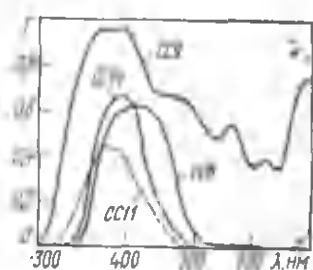


Рис. 9. Пропускание синих стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

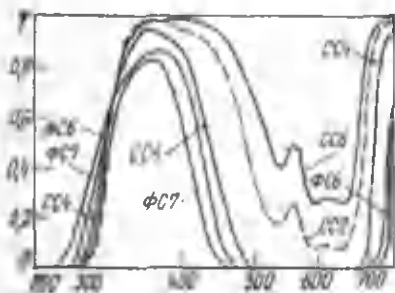
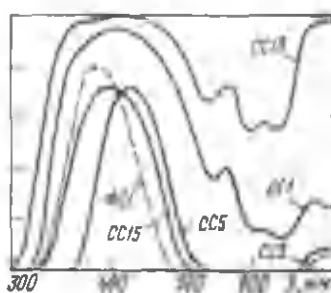


Рис. 10. Пропускание фиолетовых и синих стеклянных фильтров толщиной 3 мм.



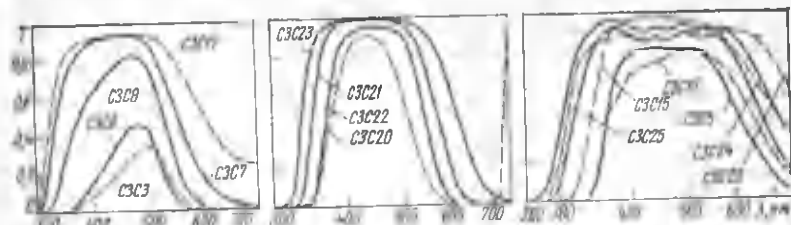


Рис. 11. Пропускание сине-зеленых стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

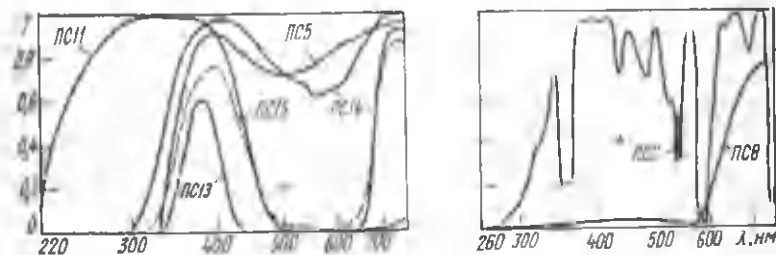


Рис. 12. Пропускание пурпурных стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

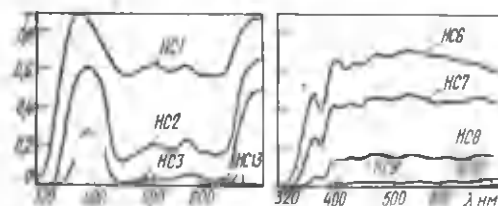


Рис. 13. Пропускание нейтральных стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

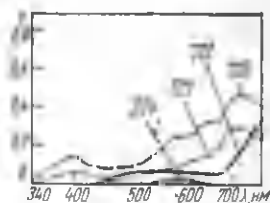


Рис. 14. Пропускание темных стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

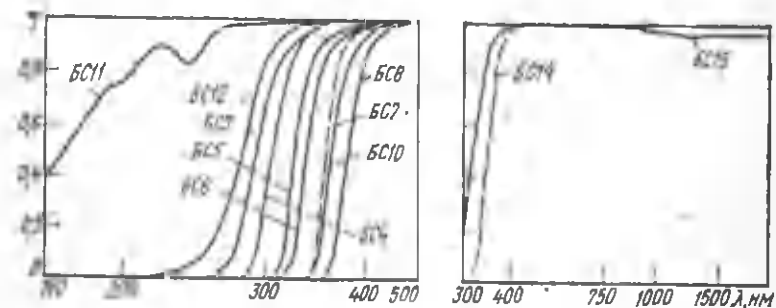


Рис. 15. Пропускание белых стеклянных фильтров толщиной 3 мм.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агароза 53, 56, 58, 62, 63, 108
Адсорбент(ы)
биоспецифический 61, 66
линейная емкость 16
неполярные 18, 19
полярные 18, 19
Адсорбция
необратимая 81, 82
обратимая 81
Акрилекс 58
Амфолины 99, 100, 101, 102, 107
Амфолиты 20, 98, 99
Анализатор аминокислотный 26
принцип работы 27—30
Аниониты 20, 21, 24, 25, 26, 31
Биобедс 58
Биогель А 58
Биогель Р 57—59
Биоглас 57
Болометр 209
Бумага
ионообменная 81
хроматографическая 40, 41
Вода набухания 55
Волна полярографическая 142,
145—147, 160, 161
высота 142, 147—149, 161
Время удерживания 11, 47
Вставка 61, 65, 66
Гелароза 58
Гель
агаровый 88, 89, 97, 108
концентрирующий 93, 112
крахмальный 89, 90
полиакриламидный 57, 88—92,
107, 108, 113
разделяющий 93, 112
Гидролиз белков
кислотный 68, 69
щелочной 68, 69
График Скэтчарда 249
Декстран 25, 53, 82
Детектор 51
пламенно-ионизационный 52
по теплопроводности 52
Диаграмма Зимма 272
Додецилсульфат натрия (ДСН)
91, 92
ДЭАЭ-сефадекс 53
ДЭАЭ-целлюлоза 25, 43, 68
Емкость буферная 32, 127
Закон
Бугера — Ламберта — Бера 178
Вавилова 232
Стокса 230
Зонды флуоресцентные 245—247
и сл.
Изотерма распределения 14
Изотахофорез 75, 93, 102
в капиллярах 106, 107
в полиакриламидном геле 107,
108
Изоэлектрофокусирование 60, 75,
84, 98
в геле 102
в градиенте плотности 101
Иммобилизация 61
Иммуноэлектрофорез 60, 75, 96—
98
Иониты
выбор 31, 32
обменная емкость 21, 22
— динамическая 21
— полная 21
— полная динамическая 22
определение 19
свойства 26
химический состав 24, 25
Ионная сила 128
Ионообменники, см. Иониты
Ионофорез 73
Ионы
биполярные, см. Цвиттер-ионы
ведущие 103—105
замыкающие 103—105, 107
спейсерные 106
трайлерные 106
Катиониты 20, 21, 24, 25, 31
КМ-сефадекс 53
КМ-целлюлоза 25

- Коионы 20
 Колебания нормальные 212
 скелетные 212
 характеристические 212
 Колонки хроматографические 7, 8, 49
 капиллярные 49, 50
 металлические 8
 набивные 49, 50
 образование каналов 7
 стеклянные 8, 9
 форма 7
 целлюлозные 84
 упаковка (набивка) 7
 Константа ионного обмена 23, 24
 Контроль дыхательный 161, 162
 Коэффициент
 Генри 45, 46
 емкости 14
 избирательности, см. Константа ионного обмена
 молярной экстинкции 178, 198
 равновесного распределения 157, 159, 162
 Кривая
 плавления 194—196
 — дифференциальная 196, 197
 титрования
 — амперометрического 164, 165
 — кондуктометрического 134—139
 хроматографическая выходная 10
 электрокапиллярная 145, 146
 Лампы
 водородные 182
 газоразрядные 182
 импульсные 182
 накаливания 179, 180
 Лиганд
 групповой 61—63, 65, 66
 необратимый 65
 Люминесценция
 белков 233—237
 длительность 221
 квантовый выход 221
 механизм возникновения 218
 энергетический выход 221
 N, N'-Метилен-бис-акриламид 90
 Метод(ы)
 амперометрического титрования 163—169
 двойной экстраполяции 272, 273
 добавок 150
 изучения пленок 211
 — растворов 211
 импульсной флуориметрии 230
 интерференционные 77
 калибровочных кривых 149
 кондуктометрический 132, 133, 141
 Михазлиса 180
 полярнографический 141—163
 потенциометрического титрования 114, 115, 118
 прессованных таблеток 210
 рефракционные 77
 свободно движущейся границы, см. Электрофорез фронтальный
 сольвентной пертурбации 202
 спектрофотометрического титрования 199, 200
 стандартных растворов 150
 стартовых условий 32
 суспензии в иммерсионной среде 209, 210
 температурной пертурбации 202
 триэтиловый 65
 Молселект 58
 Монохроматор 183
 двойной 185
 призмный 185, 209
 с дифракционной решеткой 185, 209
 Мост Кольрауша 139, 140
 Носитель 5, 35, 49, 50, 61, 80, 82, 93, 95
 Объем
 «мертвый» 6
 удерживаемый 6, 49, 51, 82
 элюирования 6, 53
 Оксидоредуктазы 129
 Ошибка
 кислая 122
 щелочная 121
 Параметр удерживания 15
 Перенос энергии
 триplet-синглетный 268
 триplet-триpletный 268
 Пик хроматографический 11, 16
 Подвижность электрофоретическая 78, 79, 83, 90, 98
 Полиакриламид 53, 63, 90
 Полиамфолиты 99, 101
 Полярограмма 141, 147
 Полярограф 141, 143; 158, 166
 Потенциал
 нормальный 114
 окислительно-восстановительный, см. Редокс-потенциал

- полувольты 151
 равновесный 114
 редокс-потенциал 129
 — стандартный (нормальный) 130, 131
 электродный 114
 электрокинетический 74, 82
 Потенциометр 118
 Правило Кундта 231
 Левшина 231
 Преципитаты 97
 Преципитации дуги 97, 98
 Прибор
 Тизелиуса 75, 76, 83
 Принцип Франка — Кондона 173, 174
 Проводимость
 электрическая удельная 133
 — молярная 134
 Противоионы 19, 21
 Равновесие ионообменное 22, 23
 Радиус Фёрстера 251
 Рассеяние света комбинационное 273
 Растворитель
 неподвижный 35
 подвижный 35
 Растворы буферные 29, 30, 55, 70, 86, 87, 93, 95, 113, 124, 126, 168
 Реактив Брэдичка 145
 Реофорез 86
 Ряд Траппа элюотропный 17, 18
 Сагавак 58
 Свет
 линейно поляризованный 222
 неполяризованный 222
 Светофильтры, см. Фильтры
 Серволиты 100
 Сефадекс 31, 53—58, 62, 63, 69, 70, 101, 108
 Сефароза 58, 67
 Сила (ы)
 Дебая 45
 Кизома 44
 Лондона 45
 осциллятора 174
 Силуфор 43, 44
 Системы буферные
 белковая 125—127
 гидрокарбонатная 125, 126
 фосфатная 125, 126
 Соотношение Степанова 231, 232
 Спектр
 излучения 220
 изоэлектрический 99
 поляризационный 223, 224
 полярографический 151
 электронный 177
 Спектрофлуориметр 224, 225
 Спектрофотометр 178, 179, 208
 Стирагель 58
 Сферон 63
 Термостатирование 77
 Титрование
 кондуктометрическое 134, 139
 хронокондуктометрическое 135
 Титрометр 118
 Ток
 диффузионный 144, 145, 148, 152, 163
 остаточный 143
 предельный 144
 ТЭАЭ-целлюлоза 25
 Умножители фотоэлектронные (ФЭУ) 187—190
 Уравнение
 Александра — Джонса 74
 Гендерсона — Хоссельбалха 120
 изотермы Денгмюра 16
 Ильковича 149
 Кольрауша 103, 105
 Нернста 114, 115
 Никольского 23
 Рэлея 269
 Штерна — Фольмера 239
 Фаза
 неподвижная 5, 6, 35, 44, 47, 49, 51, 59
 подвижная 5, 6, 35, 47, 59
 Фиксирон 43
 Фильтры
 абсорбционные 183
 дисперсионные 183
 интерференционные 185
 интерференционно-поляриза-
 ционные 185
 отражающие 185
 Флуоресценция
 замедленная 219, 220
 степень поляризации 226
 тушения 237—242
 Форма колебания 211
 Формула Перрена — Вавилова 242, 243
 Фосфоресценция 219
 сенсibilизированная 268
 Фракционирование белков 69—71
 Хроматограмма 10, 36, 38, 39, 40

Хроматограф газовый 48
Хроматография
адсорбционная (молекулярная)
9, 15—19
аффинная 9, 60—66
вытеснительная 9, 12
газовая 44—48
— газоадсорбционная 44
— газожидкостная 44, 48, 51
— преимущества 46
гель-проникающая 52 и сл.
идеальная 12, 13
ионообменная 9, 12, 19—21 и сл.
классификация методов 9
молекулярно-ситовая, см. X.
гель-проникающая
на бумаге 36
— восходящая 38
— двумерная 39
— нисходящая 38
— одномерная 39
— подвижность 37
— принцип метода 36
— радиальная (круговая) 39
определение 6
осадочная 9, 33, 34
преимущества 6
применение 5
проявительная 9—11
распределительная жидкостная
35
— колоночная 6, 15, 35—37
— плоскостная 36
тонкослойная 9, 42, 59
фронтальная 9, 11, 12

Хромосорб 51

Цвиттер-ионы 28

Цеолиты 24

Число Рэлея 270

Штифт Нернста 208

Электродиализ 73

Электрод(ы)

водородный 116, 121, 129, 131
индикаторный 115, 116, 148, 166
каломельный 116, 121, 131, 166
— приготовление 117
ртутно-капельный 143, 145
сравнения, см. Э. стандартный
стандартный 115, 116, 120, 166
стеклянный 116, 121
твердые 148, 151
хингидронный 116

хлорсеребряный 116, 118, 121,
131

стационарные 152

— движущиеся 152

— — вибрирующие 152, 153

— — вращающиеся 152, 153,
166, 167

Электролит

ведущий 103, 104

замыкающий 103, 104

Электроосмос 73, 76, 82

Электропроводность, см. Проводимость

Электрофореграмма 78, 79, 86, 87,
110, 111

Электрофорез

аналитический 73

в блоке 85

в гелях 88—92

в градиенте плотности 83, 84

в колонках 84

в поддерживающей среде, см. Э.

зональный

высоковольтный 73

двухмерный 90

диск-электрофорез 93, 94

— разделение белков 111—113

зональный 73, 80—83

макроэлектрофорез 73

микроэлектрофорез 73

на бумаге 86, 87, 108

— разделение белков 109, 110

на инертном носителе, см. Э. зо-

нальный

непрерывный 95, 96

низковольтный 73

определение 72

полумикроэлектрофорез 73

препаративный 73

проточный, см. Э. непрерывный

фронтальный 75—80

— применение 79, 80

Элюирование 6

градиентное 7

постоянное 7

ступенчатое (периодическое) 7

Эффект

гиперхромный 194

гипохромный 193—195, 197

Кольрауша 93

концентрирования, см. Э. Коль-

рауша

Ми 271

молекулярного сита 90—93, 107,
111

стеночный 8, 9

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава I. Хроматографические методы исследования	5
§ 1. Теория и классификация методов	5
§ 2. Адсорбционная (молекулярная) хроматография	15
§ 3. Ионнообменная хроматография	19
Принцип работы аминокислотного анализатора	26
Особенности работы с ионообменниками	31
§ 4. Осадочная хроматография	33
§ 5. Распределительная жидкостная хроматография	35
Хроматография на бумаге	36
Хроматография в тонком слое	42
§ 7. Газовая хроматография	44
Принцип работы газового хроматографа	48
§ 8. Гель-проникающая хроматография	52
Определение молекулярной массы	58
Тонкослойная гель-проникающая хроматография	59
§ 9. Аффинная хроматография	60
Примеры использования хроматографических методов в биохимической практике	67
<i>Список литературы</i>	71
Глава II. Методы электрофореза	72
§ 10. Теория и классификация методов	72
§ 11. Фронтальный электрофорез	75
§ 12. Зональный электрофорез	80
Электрофорез в градиенте плотности	83
Электрофорез в колонках	84
Электрофорез в блоке	85
Электрофорез в листовых материалах	86
Электрофорез в гелях	88
Диск-электрофорез	93
Непрерывный (проточный) электрофорез	95
§ 13. Иммуноэлектрофорез	96
§ 14. Изоэлектрофоретическое фокусирование (изоэлектрофокусирование) в градиенте значений рН	98
§ 15. Изоэлектрофорез	102
Примеры использования методов электрофореза в биохимической практике	108
<i>Список литературы</i>	113
Глава III. Электрохимические методы исследования	114
§ 16. Метод потенциометрического титрования	114
Определение карбоксильных и аминных групп белков	118

Потенциметрическое определение рН среды	119
Буферные растворы, буферная емкость и ее определение потенциметрическим методом	125
Определение окислительно-восстановительных потенциалов и расчет стандартных свободных энергий	129
§ 17. Кондуктометрический метод	132
Определение хлоридов плазмы крови	140
Определение янтарной или глутаровой кислот	140
§ 18. Полярографический метод	141
Индиферентный электролит (фон)	144
Максимумы на полярографических волнах	145
Количественный полярографический анализ	148
Потенциал полуволны	151
Твердые электроды	151
Определение окислительного фосфорилирования	157
Определение активности амлазы	159
Определение степени сопряженности препаратов митохондрий	161
§ 19. Метод амперометрического титрования	163
Схемы установок и электроды для амперометрического титрования	166
Определение SH-групп белков	168
<i>Список литературы</i>	170
<i>Глава IV. Оптические методы исследования</i>	170
§ 20. Физические основы оптических методов исследования	170
§ 21. Спектрофотометрия	175
Спектрофотометрия в области электронных переходов	175
Инфракрасная спектроскопия	208
§ 22. Люминесценция	217
Основные характеристики люминесценции	220
Техника эксперимента	224
Основные законы люминесценции	230
Люминесцентный анализ в биологических исследованиях	232
§ 23. Рассеяние света растворами биополимеров (рэлеевское рассеяние)	269
§ 24. Колебательные спектры комбинационного рассеяния	273
<i>Список литературы</i>	278
Приложение	279
<i>Предметный указатель</i>	282

Руфина Петровна Виноградова,
Болеслав Александрович Цудзевич,
Сергей Николаевич Храпунов

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
В БИОХИМИИ**

Редактор *Н. Д. Рогоза*
Переплет художника *В. В. Котова*
Художественный редактор *Н. А. Стась*
Технический редактор *А. И. Омоховская*
Корректор *Р. П. Киевская*

Информ. бланк № 6262.

Сдано в набор 29.06.82. Подп. в печать 13.12.82.
БФ 02757. Формат 84×108^{1/32}. Бумага типогр. № 3.
Лит. гарн. Выс. печать. 15,12 усл. печ. л. 15,33 усл.
кр. отт. 16,83 уч.-изд. л. Тираж 2000 экз. Изд.
№ 5017. Зак. № 341. Цена 70 к.

Головное издательство издательского объедине-
ния «Вища школа», 252054, Киев-54, Гоголев-
ская, 7.

Белоцерковская книжная фабрика, 256400,
г. Белая Церковь, ул. Карла Маркса, 4.