

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Саратовский государственный аграрный университет  
имени Н.И. Вавилова»

# **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

**краткий курс лекций**

**для аспирантов**

Направление подготовки  
**06.06.01 Биологические науки**

Профиль подготовки  
**Биохимия**

**Саратов 2014**

УДК 575  
ББК 30  
Д 73

Рецензенты:

Доктор химических наук, профессор кафедры «Органическая и биоорганическая химия» ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского»

*А.Ю. Егорова*

Доктор химических наук, профессор кафедры «Химия, агрохимия и почвоведение» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»

*Н.Н. Гусакова*

**Методы исследований в биотехнологии:** краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) / Сост.: Б.И. Древко // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 67 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Методы исследований в биотехнологии» составлен в соответствии с программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)). Краткий курс лекций содержит теоретический материал по методам исследования в биотехнологии. Направлен на формирование у аспирантов знаний об основных физико-химических методах, которые используются в биотехнологии. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих специалистов-биотехнологов.

УДК 575  
ББК 30

© Древко Б.И., 2014  
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

## Лекция 1

### ВВОДНАЯ ЛЕКЦИЯ

#### Классические методы исследования биологических объектов

Методы, используемые в биохимии: химические; физические; ферментативные методы – есть только в биохимии; молекулярно-генетические и другие. Материал для биохимических исследований - кровь, моча, желудочный сок, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, слюна, биоптаты органов и любые другие биологические объекты.

Среди химических методов преобладает определение кислотности среды и качественный и количественный анализ на те или иные функциональные группы или элементы.

Для использования в биохимии наиболее часто применяют количественный анализ.

Под количественным анализом понимают совокупность методов и приемов, позволяющих с требуемой точностью определять количественное содержание компонентов в анализируемом образце, а также микропримесей в нем.

При проведении анализа используются следующие приемы:

Пробоотбор → пробоподготовка → получение аналитического сигнала → обработка аналитического сигнала → социально-экономическое использование результата анализа.

Основными характеристиками любого метода анализа являются его чувствительность, селективность, точность и экспрессность. Часто эти характеристики взаимосвязаны, и приходится выбирать метод из имеющихся в распоряжении на основании требований, предъявленных к результатам анализа конкретного объекта.

Различные толкования даются термину “чувствительность”, хотя в принципе смысл этого понятия довольно ясен. Так, чувствительность метода может быть выражена, как в качественном анализе, величиной предела обнаружения. Кроме того, используют понятия минимальной определяемой концентрации, диапазона определяемых содержаний и др.

Часто определяющей характеристикой метода анализа является его точность. Так, для анализа вновь полученного вещества, для определения примесей при анализе лекарственных веществ выбирают наиболее точный метод, не считаясь с длительностью проведения анализа. Но, поскольку достоверность аналитических измерений прямо зависит от времени и усилий, затраченных на их осуществление, не следует тратить много времени в погоне за высокой точностью там, где она не нужна. Тем не менее, всегда необходима количественная оценка точности метода и, если она не соответствует предъявленным требованиям, такой метод применять нельзя.

Для оценки точности метода анализа следует различать две стороны понятия: правильность и воспроизводимость.

Под правильностью понимают близость полученных результатов к истинному значению, под воспроизводимостью - близость результатов параллельных определений между собой.

По источникам происхождения погрешности подразделяют на инструментальные, реактивные, методические, погрешности пробоотбора и т.п.

Методы, использующие различные приборы, часто объединяют понятием "инструментальные". Условно их можно разделить на физические и физико-химические. При этом полагают, что физические методы основаны на переходах

внутренних электронов или ядер, а физико-химические – на переходах валентных электронов. Однако часто наблюдается смешанная картина, и метод трудно точно классифицировать. Размытые границы еще раз свидетельствуют о переплетении различных наук и об общем единстве всех подходов к поставленной цели – определению состава вещества. Биологические и биохимические методы анализа основаны на изучении поведения более или менее организованных живых организмов.

Использование биохимических методов исследования требует выбора единых аналитических процедур.

Кроме того, при выборе метода исследования следует учитывать трудоемкость и стоимость таких операций как «проботбор» и «пробоподготовка».

При пробоотборе обязательно соблюдение условия: проба должна быть представительной.

Под представительностью пробы понимают ее соответствие поставленной задаче по объему, времени, месту отбора, а также технике отбора и условиям хранения и транспортировки. Ее состав и состав партии анализируемого объекта должны быть идентичны.

Поскольку погрешность пробоотбора не может быть исправлена никакими методами, отбор пробы должен производить квалифицированный работник, желательно тот, кто отвечает за результат анализа. При арбитражном анализе в отборе проб должны участвовать все заинтересованные стороны. На ряд случаев, например, для анализа питьевых вод, даже существуют ГОСТы для пробоотбора.

Для получения достоверных результатов используют различные приемы, например:

Анализ независимыми методами. При этом в основу второго метода должны быть получены принципиально другие физические законы. В случае совпадения результатов можно считать использование данного метода оправданным. Иногда повторяют анализ в другой лаборатории или поручают его другому аналитику, но это малонадежный прием.

Выполнение холостого (контрольного) опыта. Повторяют все операции анализа в отсутствие анализируемого объекта (т.е. вместо анализируемого раствора берут только растворитель и делают с ним все то же самое). Если есть, например, реактивная погрешность, связанная с недостаточной чистотой реактивов, она проявится. В таком случае результат контрольного опыта служит поправкой к основному измерению.

Важными условиями в выборе метода являются:

1. Стоимость расходных материалов;
2. Вредность используемых реактивов для персонала;
3. Наличие и стоимость приборов.

Причем, под стоимостью расходных материалов понимают не только стоимость реактивов, но и стоимость хроматографических колонок, фильтров и других компонентов, которые рассчитаны на определенное количество анализов.

В настоящее время часто используется комбинаторика нескольких методов, которые могут относиться к различным видам анализа.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Обоснование выбора метода исследований.
2. Погрешности при использовании классических методов исследования.
3. Этапы проведения анализа.
4. Чувствительность различных методов исследования.

5. Наиболее распространенные классические методы исследования биологических объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М.: Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3

2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.

4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 2

### Пробоотбор и пробоподготовка

Очевидно, результаты любого количественного анализа должны верно отражать истинное содержание определяемых компонентов в образце. Следовательно, пробоотбор - самая ответственная стадия анализа: ведь неправильный отбор пробы может свести на “нет” всю последующую работу, как бы кропотливо она ни выполнялась.

При пробоотборе обязательно соблюдение условия: проба должна быть представительной.

Под представительностью пробы понимают ее соответствие поставленной задаче по объему, времени, месту отбора, а также технике отбора и условиям хранения и транспортировки. Ее состав и состав партии анализируемого объекта должны быть идентичны.

Чем больше проба, тем она представительнее. Но со слишком большой пробой трудно работать, поэтому в этом вопросе нужен разумный компромисс.

Различают *генеральную, лабораторную и анализируемую* пробы. Генеральная (первичная или большая) проба отбирается непосредственно из анализируемого объекта. Из генеральной пробы путем ее сокращения (предварительно измельчив и усреднив) отбирают *лабораторную* пробу. Часть ее оставляют для проверочных испытаний, другую подвергают анализу, а третью хранят на случай спорных ситуаций. *Анализируемую* пробу также делят на несколько частей, поскольку определения повторяют, как правило, несколько раз.

В случае скоропортящихся проб (продукты питания, природные воды, биологический материал) следует предпринять меры к консервированию пробы на время доставки к месту выполнения анализа. Так, природная вода почти не изменяет своего состава в течение времени до 1-2 часов. Это время можно увеличить, охладив ее до температуры ниже 0°C. Но обычно приходится добавлять различные консерванты. Естественно, консервант не должен изменять содержание определяемых компонентов.

Часто встречаются ситуации, когда анализируемый материал обязательно изменяется во времени. В таких случаях различают простую и смешанную пробы. Простая - однократно, в одном месте, отбирают все требуемое количество. Смешанная - смесь простых проб, полученных либо в одном месте, но в разное время, либо в разных местах, но одновременно.

На месте отбора пробы необходимы записи в журнале о происхождении пробы, месте отбора, особенностях условия содержания, точной дате отбора. Аналогичные записи выполняются на этикетке, помещаемой на упаковке (посуде) с пробой.

Способы отбора пробы и ее величина определяются в первую очередь свойствами анализируемого объекта. Имеется в виду его агрегатное состояние, неоднородность, размер частиц, а также требуемая точность анализа. В случае каждого конкретного материала существуют свои особенности.

Несложен отбор проб гомогенных жидкостей. Однако надо быть уверенным в ее гомогенности.

Для отбора проб истинно гетерогенных жидкостей можно поступить по-разному. Если есть возможность полной гомогенизации объекта, делают это и отбирают

необходимую пробу. Если гомогенизация невозможна, наоборот, добиваются полного расслоения жидкой смеси и анализируют отдельно каждую фазу.

Пробоподготовка может включать в себя:

- а) высушивание;
- б) разложение и растворение;
- в) концентрирование (для повышения чувствительности определения);
- г) разделение или маскировку (для повышения селективности).

Важно знать, что для проведения анализа обычно берут высушенную или воздушно-сухую пробу. Следовательно, часто необходимо определить содержание воды в пробе. Причин ее наличия множество, и для удаления нестехиометрической воды обычно высушивают образец 1-2 часа при 105-120°C. Методов ее определения существует много, сегодня мы их не рассматриваем.

Способы переведения пробы в раствор зависят от состава анализируемого образца, цели анализа и выбранного метода определения. Они описаны в соответствующей литературе и условно делятся на сухие и мокрые. Не может быть предложено единого растворителя или единой методики, но при их выборе всегда нужно помнить, что чем меньше вводится посторонних веществ при растворении пробы, тем лучше.

Разложение и растворение пробы производится наиболее мягко работающими реагентами. Так, если проба нерастворима в воде, ее стараются перевести в раствор с помощью уксусной или другой слабой кислоты, затем - сильной (обычно HCl) - разбавленной и концентрированной. При неудаче прибегают к растворению в кислото-окислителе (обычно - HNO<sub>3</sub>, холодной или горячей) или в царской водке. Иногда к кислотам добавляют пероксид водорода, органические оксикислоты и др. Для растворения органических соединений применяют органические растворители: спирты, хлорированные углеводороды, кетоны.

Источниками загрязнений при растворении могут быть примеси в используемых реагентах или частичное растворение материала посуды. Поэтому применяют кислоты высокой степени очистки и подбирают соответствующие сосуды из нерастворимых в данной среде материалов.

Естественно, с реагентами нельзя вносить те компоненты, определение которых должно быть выполнено.

Часто чувствительности имеющегося метода анализа недостаточно для проведения непосредственного определения. В таком случае пробу приходится концентрировать, т.е. повышать концентрацию определяемых компонентов в образце. Концентрирование микрокомпонентов может быть осуществлено следующими способами:

- а) выпаривание;
- б) отгонка;
- в) соосаждение с коллектором;
- г) экстракция - перевод в органический растворитель;
- д) сорбция;
- е) флотация.

Так же, как и при растворении, важно в процессе концентрирования пробы не внести вещества, которые впоследствии исказят результат химического анализа или затруднят его выполнение. Процессы пробоподготовки должны быть направлены исключительно на улучшение метрологических характеристик анализа, и, в первую очередь, его чувствительности и селективности.

## Вопросы для самоконтроля

1. Выбор метода пробоотбора.
2. Погрешности при пробоотборе.
3. Варианты пробоподготовки.
4. Выбор метода пробоподготовки.
5. Повышение чувствительности метода при пробоподготовке.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 3

### Молекулярно-генетические методы исследования в биохимии Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

#### Основные направления использования ПЦР:

С момента своего открытия, ПЦР уверенно завоевывает все новые области биологии и медицины, в том числе и ветеринарной. В настоящее время быстро развиваются различные направления ПЦР-диагностики:

- диагностика инфекционных заболеваний;
- диагностика онкологических заболеваний;
- диагностика генетических заболеваний;
- идентификация личности;
- диагностика патогенов в пище и кормах;
- обнаружение ГМИ в сырье, пищевых продуктах и кормах;
- изучение свойств микроорганизмов;
- ПЦР в направленном мутагенезе;
- клонирование генов.

#### Преимущества полимеразной цепной реакции:

1. Позволяет выявлять микроорганизмы независимо от фенотипической изменчивости (измененные культурально – морфологические, биохимические и антигенные признаки, сферопласты, протопласты, L – формы микроорганизмов).
2. Позволяет обнаруживать некультивируемые формы микроорганизмов.
3. Высокая чувствительность:  $10^3 - 10^4$  КОЕ /мл.
4. Высокая специфичность: до 100 %.
5. Быстрота проведения анализа: 4 – 6 часов.
6. Возможность полной автоматизации.
7. Высокая информативность: позволяет выявлять одновременно нескольких возбудителей и разносторонне изучить микроорганизм (индикация с одновременной идентификацией и определением чувствительности к химиопрепаратам).
8. Полифункциональность: используется не только для выявления микроорганизмов, но и для обнаружения генетически модифицированного сырья и продуктов, изучения генетического профиля любых объектов и т.д.

К недостаткам полимеразной цепной реакции относят необходимость наличия специальных навыков и дорогостоящего оборудования.

Для ПЦР используют **клинический материал** (кровь, моча, испражнения, рвотные массы, ликвор, мокрота, гной, пунктаты), объекты внешней среды (вода, почва, пищевые продукты), формализированные органы, кости.

#### Условия хранения материала.

*Образцы цельной крови:*

- при температуре 2-25°C - в течение 6 часов с момента взятия материала для количественного определения нуклеиновых кислот; в течение 12 часов - для качественного определения нуклеиновых кислот;

- при температуре 2-8°C - в течение 1 суток для качественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов.

Недопустимо замораживание образцов цельной крови!

*Образцы плазмы и сыворотки:*

- при температуре 2-8°C - в течение 5 суток;

- при температуре минус 70°C - длительно.

*Образцы нативных фекалий и мочи:*

- при температуре 2-8°C - в течение 1 суток.

- в замороженном виде - в течение 1 суток.

Образцы биопсийного и аутопсийного материала, выделения, истечения:

- при комнатной температуре - в течение 6 часов;

- при температуре 2-8°C - в течение 1 недели;

- при температуре минус 20°C - в течение 1 месяца;

- при температуре минус 70°C - длительно.

Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

### **Принцип ПЦР**

ДНК – одна из самых длинных молекул, состоящая из двух цепей азотистых оснований, соединенных водородными связями по принципу комплементарности: А – Т, Г – Ц. Двухцепочечная ДНК при нагревании до 92 - 100°C подвергается денатурации с образованием двух отдельных цепей. При снижении температуры до комнатной происходит ренатурация – восстановление первичной структуры по принципу комплементарности.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований.

### **Компоненты реакционной смеси**

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов:

Праймеры - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером (отжигом), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

Тақ-полимераза - термостабильный фермент [выделенный из термофилов — *Thermus aquaticus* (Тақ-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.], обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. ДНК-полимеразы - группа ферментов, которые синтезируют цепи полинуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) - "строительный материал", используемый Тақ-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Концентрация дНТФ в реакционной смеси – 0,2 мМ.

Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфические продукты амплификации (ампликоны) не образуются.

Буфер - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение рН. Ионы  $Mg^{2+}$ , необходимые для работы полимеразы. Концентрация  $MgCl_2$  в буфере должна быть 1,5 – 2 мМ. Увеличение концентрации приводит к снижению специфичности реакции, но к повышению чувствительности. Буфер содержит соли, бычий сывороточный альбумин, ПЭГ, глицерин.

Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее вазелиновое масло. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

### **Циклический температурный режим**

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °С. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», Touchdown ПЦР (см. ниже) и последующего хранения амплифицированных молекул при 4 °С. Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация. На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95° С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

2. Отжиг. На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название "отжиг".

Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится

тимин, а напротив гуанина - цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

3. *Элонгация (синтез)*. На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью.

Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \times (2^n - 2n), \text{ где}$$

A - количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

M - начальное количество ДНК-мишеней;

n - число циклов амплификации.

Данная формула справедлива для  $25 \leq n < 40$ , далее (после 40 – 45 цикла) наступает эффект «плато».

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78-97%. В случае присутствия в пробе ингибиторов реакции это значение может быть намного меньше.

### **Устройство ПЦР-лаборатории**

Рабочая зона ПЦР - лаборатории в соответствии с этапами ПЦР -анализа должна включать следующий минимальный набор последовательно расположенных самостоятельных помещений или отдельно выделенных рабочих зон (в составе других функциональных помещений):

- приема, разборки, первичной обработки материала;
- подготовки проб, выделения нуклеиновых кислот (НК);
- приготовления реакционных смесей, проведения ПЦР и обратной транскрипции (ОТ);
- учета результатов методом электрофореза или ГИФА.

*Комнату выделения НК* располагают вблизи от комнаты приема материала, а помещение для учета результатов - по возможности в отдалении от других перечисленных помещений для обеспечения условий, исключающих занос в них продуктов ампликации (ампликонов) с воздушным потоком.

Не допускается выполнение ПЦР - исследований в помещениях для проведения работ с использованием культуральных (накопление патогенных биологических агентов) и генно-инженерных методов, в том числе связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид.

*Зону приёма, регистрации, сортировки, первичной обработки материала* (объединение или разделение проб, центрифугирование, инаktivация и т.д.) располагают в комнате приема материала блока для работы с инфицированными животными или в отдельной боксированной комнате. В этих же помещениях может проводиться обработка проб к другим видам исследований (бактериологическое, вирусологическое, серологическое и т.д.). При наличии возможности в помещении

устанавливают бокс биологической безопасности III класса защиты (допускается также использование бокса 2ШНЖ, например, фирмы «Изотоп» и др.) или бокс безопасности II класса защиты.

*Зону по подготовке проб и выделению нуклеиновых кислот* размещают в боксированном помещении (микробиологический бокс с предбоксом) или в комнате заражения и вскрытия животных. Работу проводят в боксе биологической безопасности II или III класса. В рабочей зоне располагают оборудование и предметы, необходимые только для предварительной обработки, выделения НК.

*Зону приготовления реакционных смесей и проведения ОТ и ПЦР-амплификации* располагают в боксированном помещении или боксе биологической безопасности II класса (или ПЦР - бокса) - для подготовки реакционных смесей для ОТ и ПЦР.

Работу по подготовке реакционных смесей для ПЦР и ОТ - ПЦР проводят до ДОС-авки в бокс проб, поступающих из зоны выделения НК. Смесь может быть пригоовлена также за пределами помещений лаборатории, предназначенных для работы с заразным материалом, например, в комнате (боксе) для розлива питательных сред.

При необходимости этап подготовки проб и выделения нуклеиновых кислот может выполняться в одной комнате с этапом ПЦР при наличии в ней бокса биологической безопасности II или III класса защиты для выделения НК и бокса биологической безопасности II класса (или ПЦР - бокса) - для подготовки реакционных смесей для ОТ и ПЦР. Каждый бокс рассматривается как соответствующая рабочая зона.

Зону детекции результатов располагают в боксированном помещении. При отсутствии боксированного помещения работу проводят в отдельной комнате, при возможности в ПЦР-боксе.

При одновременном использовании двух методов детекции продуктов амплификации - электрофоретического и ГиФА - следует выделить отдельные помещения или две рабочие зоны. Оборудование и принадлежности для каждого вида анализа маркируют применительно к каждой зоне. Обмен посудой и пипетками между зонами не допускается.

### **Разновидности ПЦР**

#### ПЦР с использованием "горячего старта".

Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов реакции амплификации, используют подход, получивший название "горячий старт" (от англ. "hot-start"). Суть его состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

#### Мультипраймерная ПЦР.

В некоторых случаях, чтобы выявить несколько вставок применяют мультипраймерную или множественную ПЦР, заключающуюся в одновременном применении нескольких праймеров, гомологичных разным участкам генома тестируемого микроорганизма. Праймеры подбираются таким образом, чтобы условия их амплификации были одинаковыми.

#### ПЦР с использованием метода "FLASH".

Метод с анализом ПЦР – продуктов по конечной точке отличается от традиционной ПЦР тем, что при амплификации используют праймеры - зонды, меченные флуорохромом. А после завершения амплификации пробирки переносят в специальный прибор для учета результатов (джин). Метод отличается быстротой постановки, экономичностью и сведением к минимуму субъективности оценки результатов.

### In Situ ПЦР.

Чтобы уменьшить риск контаминации в настоящее время все чаще применяют праймеры, иммобилизованные на полимерную основу. В таком варианте амплификация ДНК проходит в твердой фазе.

Для исследования тканевых слоев и срезов ПЦР проводят на срезе.

### NASBA.

В настоящее время реакция транскрипционной амплификации РНК –NASBA (Nucleic Acids Sequence Amplification) является наиболее чувствительным тестом, применяем для диагностики различных инфекций. NASBA тест - это метод детекции РНК вирусов и рибосомальной РНК, основанный на одновременном действии трех ферментов: обратной транскриптазы, РНК-азы и РНК-полимеразы.

### «Вложенная» или «гнездная» ПЦР (Nested PCR).

Одним из способов повысить чувствительность реакции является применение метода "nested" (гнездной) амплификации. Суть его заключается в последовательном использовании двух пар праймеров - внешней и внутренней. Преимуществами гнездной ПЦР являются повышение как чувствительности, так и специфичности реакции.

### Ассиметричная ПЦР (Asymmetric PCR).

Проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров, без метки, берется в большом избытке, его количество в 10 раз превышает количество меченого праймера. Все праймеры с меткой включаются в ДНК – мишень. При детекции лазерным лучом, по изменению окраски смеси, выявляется двухцепочечная ДНК, так как ДНК не денатурируют.

### Real-Time PCR.

Позволяет получать количественные результаты ПЦР анализа и позволяют следить за кинетикой накопления продуктов амплификации. Достигается это использованием флуоресцентных меток.

### Touchdown (Stepdown) ПЦР.

С помощью этого метода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров на образование продукта. Температура отжига праймера в первом цикле ПЦР задается на 10-15С выше рассчитанной. И затем, постепенно, в течении последующих циклов снижается на 1-2 градуса, пока не достигнет уровня на 5°С ниже расчетного. Таким образом удастся избавиться от несоответствия между рассчитанной Tm и реальной оптимальной (для данных конкретных условий) температурой отжига.

## **Вопросы для контроля**

1. Как устроена ПЦР-лаборатория?
2. Что такое ПЦР?
3. Каковы преимущества ПЦР?
4. В чем заключается суть ПЦР?
5. Каковы компоненты ПЦР?
6. Охарактеризуйте этапы ПЦР.
7. Какие разновидности ПЦР вы знаете?
8. Как сохранить материал для исследования методом ПЦР?

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 4

### Хроматографические методы анализа

Хроматография - это физико-химический метод разделения, обнаружения и определения смесей веществ, основанный на распределении компонентов между двумя несмешивающимися фазами - *неподвижной* и *подвижной*. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое вещество (его часто называют *сорбентом*) или пленка жидкости, нанесенная на инертное твердое вещество. Подвижная фаза (ПФ) представляет собой жидкость или газ, протекающие через неподвижную фазу (НФ).

В хроматографии компоненты анализируемой смеси вместе с ПФ передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно (но не всегда) помещают в стеклянную (или металлическую) трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо еще механизму) компоненты перемещаются вдоль колонки с разной скоростью. Компоненты, сильнее взаимодействующие с сорбентом, остаются в его верхнем слое, другие, с меньшей степенью взаимодействия, оказываются в нижней части колонки, а некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Таким образом, компоненты смеси разделяются.

В отличие от других методов, основанных на распределении компонентов между фазами, хроматография - это *динамический* метод, обеспечивающий многократность актов сорбции-десорбции компонентов, разделяемых в потоке подвижной фазы. Этой многократностью обусловлена большая эффективность этого метода по сравнению с методами сорбции и экстракции в статических условиях, именно поэтому хроматография позволяет быстро разделять даже сложные смеси химически схожих компонентов. Хроматографии присущи такие достоинства как универсальность, экспрессность и высокая чувствительность.

В основу общепринятых классификаций многочисленных хроматографических методов положены различные признаки.

1. По цели хроматографирования выделяют *аналитическую* хроматографию - для разделения смеси веществ, их качественного и количественного анализа; *препаративную* хроматографию - для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей; *промышленную* (производственную) - для автоматического управления процессом.

2. По технике выполнения выделяют *колоночную* хроматографию, когда разделение производят в специальных трубках (колонках), и *плоскостную* хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (*бумажная* хроматография (БХ)) или в тонком слое сорбента (*тонкослойная* хроматография (ТСХ)). В колоночной хроматографии используют набивные (насадочные) и капиллярные колонки. В насадочных колонках неподвижной фазой заполняется весь объем трубок, в капиллярных она наносится (в виде тонкого слоя) только на внутреннюю поверхность.

3. По механизму взаимодействия разделяемых веществ с неподвижной фазой выделяют несколько видов хроматографии: *распределительная* - основана на различии в растворимости разделяемых веществ в пленке неподвижной жидкой фазы; *адсорбционная* - основана на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом; *ионообменная* - основана на разной способности разделяемых веществ к ионному обмену между подвижной фазой и твердым ионообменником; *эксклюзионная (молекулярно-ситовая)* - основана на различии в размерах и формах молекул

разделяемых веществ (сорбент представляет собой пористое твердое тело, и в зависимости от размера частиц они проникают в эти поры или проходят далее).

4. По агрегатному состоянию ПФ хроматографию разделяют на *газовую* и *жидкостную*. При желании конкретизировать и агрегатное состояние неподвижной фазы, хроматографические методы называют: газо-жидкостная (ГЖХ), газотвердофазная (или газо-адсорбционная, ГАХ), жидкостно-жидкостная (ЖЖХ), жидкостно-твердофазная (или жидкостно-адсорбционная, ЖАХ).

5. По способу перемещения подвижной фазы различают *фронтальный*, *элюентный* (проявительный), и *вытеснительный* методы анализа.

При хроматографировании одновременно происходит разделение веществ и размывание (уширение) зон разделяемых компонентов. Теория хроматографии позволяет выявить причины размывания пиков и прогнозировать степень эффективности разделения смеси веществ.

Теория теоретических тарелок. Эта теория позволяет описать движение зоны компонента, экспериментально оценить ширину полосы и эффективность колонки. Эффективность показывает способность к полному разделению и отражает степень размывания хроматографической полосы.

Теория основана на допущениях:

1) хроматографическая колонка состоит из определенного числа узких слоев сорбента (“теоретических тарелок”);

2) равновесие на каждой тарелке между НФ и ПФ считается достигнутым до того, как подвижная фаза переместится на следующую тарелку, т.е. равновесие устанавливается мгновенно.

Чем больше теоретических тарелок, т.е. чем больше число равновесий, тем эффективнее разделение. Однако эта теория по существу формальна, т.к. реальный процесс непрерывен и неравновесен, а представление о теоретической тарелке в хроматографии имеет умозрительный характер. Тем не менее, число теоретических тарелок (N) может служить количественной мерой эффективности колонки. Для оценки эффективности используют также высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ, H). Эта величина связана с длиной колонки (L) и числом теоретических тарелок (N):

$$H = \text{ВЭТТ} = L/N,$$

т.е. чем меньше H и больше N, тем выше эффективность колонки.

Теория теоретических тарелок дает возможность сравнить эффективность различных колонок, оценить качество сорбента и заполнения колонки. Однако эта теория не позволяет выявить зависимость N и H от условий хроматографирования, не может дать практических рекомендаций, позволяющих избежать размывания хроматографических пиков.

Кинетическая теория хроматографии. Согласно кинетической теории, размывание хроматографических пиков обусловлено, главным образом, тремя независимыми процессами: *вихревой диффузией*, *молекулярной диффузией* и *сопротивлением массопереносу*. К счастью, степень влияния этих процессов определяется в основном такими контролируруемыми переменными, как скорость потока, размер частиц наполнителя колонки и толщина пленки неподвижной жидкой фазы.

Из положений теории, которые мы здесь не рассматриваем, следует, что эффективность хроматографической колонки имеет сложную зависимость от скорости ПФ и выражается кривой, минимум которой соответствует оптимальному значению H. Задача экспериментатора - найти оптимальную скорость потока.

В целом, для повышения эффективности колонки необходимо уменьшать размер частиц, улучшать упаковку, подбирать оптимальную линейную скорость потока и маловязкие подвижные фазы (их толщина должна быть небольшой).

### Вопросы для самоконтроля

1. Виды хроматографического анализа.
2. Теоретические основы хроматографии.
3. Возможности метода хроматографического анализа.
4. Чувствительность различных методов хроматографического анализа.
5. Теория теоретических тарелок.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Дмитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Дмитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3

2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 5

### Тонкослойная и колоночная хроматографии

К плоскостным видам хроматографии относятся бумажная (БХ) и тонкослойная (ТСХ). Хроматографическое разделение в них, как и в колонке, основано на переносе разделяемых компонентов подвижной фазой вдоль слоя неподвижной фазы (НФ). В БХ носителем неподвижной фазы является хроматографическая или очищенная от примесей фильтровальная бумага, а в ТСХ - различные сорбенты (оксид алюминия, силикагель и др.), нанесенные на стеклянную или металлизированную подложку. Размер частиц адсорбента очень мал, обычно менее 15 мкм.

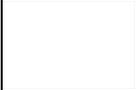
Оба вида просты по технике выполнения эксперимента и экспрессны, но ТСХ используется чаще, т.к. в этом случае разделение происходит быстрее, получаемые зоны компактнее, чувствительность и воспроизводимость определений выше, слой сорбента устойчивее к агрессивным средам, причем существует возможность его выбора.

Элюент в жидкостной хроматографии - это не просто растворитель, который переносит растворенное вещество через слой НФ. Он играет активную роль в процессе сорбции, конкурируя с компонентами пробы за место в слое сорбента. Следовательно, природа элюента в очень большой мере определяет успех разделения. Это тем более относится к бумажной хроматографии, которая, в отличие от тонкослойной, в основном "работает" не по адсорбционному механизму, а по распределительному.

Проводить хроматографирование можно восходящим, нисходящим или круговым способами. Эти различия не принципиальны: разница в том, что ПФ продвигается по НФ снизу вверх, сверху вниз или из центра круга к его периферии.

В ТСХ чаще всего используют восходящий способ. При этом один конец пластинки погружают в кювету с подвижной фазой на глубину в несколько миллиметров, жидкость медленно поднимается по пластинке под действием капиллярных сил. Пробу в виде небольшого пятна предварительно наносят на пластинку так, чтобы она находилась около края, погруженного в жидкость. При элюировании пробы потоком жидкой фазы ее компоненты переносятся вверх по слою адсорбента. Хроматографирование заканчивают, когда передний край ПФ ("фронт растворителя") почти достигнет верхнего края пластинки.

Компоненты смеси при разделении образуют на НФ отдельные зоны, положение которых характеризуется величиной  $R_f$  (относительная скорость перемещения).

Величину  $R_f$  определяют экспериментально как: , где  $X$  - расстояние, пройденное веществом;  $L$  - расстояние, пройденное растворителем до линии фронта (рис. 3). Величина  $R_f$  зависит от природы НФ, ПФ, техники эксперимента (способ нанесения веществ, детектирования), температуры и других факторов.

В некоторых случаях значительные преимущества имеет двумерное хроматографирование. Если при первом разделении некоторых компонентов происходит не полностью, пластинку, вынутую из камеры и подсушенную, поворачивают на  $90^0$  и опускают в другой растворитель.

Многие соединения либо окрашены и непосредственно обнаруживаются на хроматографической пластине (или бумаге), либо флуоресцируют при освещении ультрафиолетовой лампой. Однако большинство соединений бесцветны, поэтому для их обнаружения требуются специальные приемы. Обычно опрыскивают пластинку растворами специфических реагентов, которые дают с обнаруживаемыми веществами цветные пятна. Для работы с органическими веществами подходит "универсальный" реагент – концентрированная серная кислота; после нагревания до 100<sup>0</sup>С любое органическое соединение проявится в виде черной обуглившейся зоны.

Качественный анализ проводят путем сопоставления  $R_f$  для стандартов и компонентов анализируемой смеси.

Количественный анализ осуществляется двумя способами:

- 1) непосредственно на хроматограмме по размеру пятна (полуколичественный анализ);
- 2) анализируемое вещество после вырезания зоны вымывается из слоя сорбента и анализируется при помощи какого-либо другого метода.

Таким образом, БХ и ТСХ пригодны для анализа несложных смесей и широко применяются там, где обычные аналитические методы малоприспособны, например, для разделения близких по свойствам соединений.

В "классическом" варианте ЖХ в колонку, заполненную сорбентом, вводят анализируемую смесь и пропускают элюент. Несмотря на то, что продолжительность анализа велика, этот вариант до сих пор используют в лабораторной практике, поскольку он не требует дорогостоящего оборудования.

Хроматографическую колонку непрерывно промывают элюентом (растворителем в жидкостной хроматографии), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку быстро вводят порцию разделяемой смеси и продолжают непрерывно пропускать элюент (процесс элюирования). При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями (в соответствии с их сорбируемостью). Если скорости перемещения компонентов различаются достаточно, то на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбируемый компонент (в смеси с элюентом), затем чистый элюент, следующий компонент и т. д. Смесь, выходящую из колонки, часто называют элюатом.

Недостатком элюентного метода является некоторое уменьшение концентрации выходящих компонентов за счет разбавления их элюентом.

В некоторых случаях трудно разделяемых смесей используют *ступенчатое* или *градиентное элюирование*, при котором состав элюента во время хроматографирования изменяется ступенчато (дискретно) или непрерывно. В этом случае можно добиться сокращения времени удерживания сильно сорбируемых веществ и улучшить разделение смеси.

При использовании для разделения смеси веществ колоночной хроматографии, часто (для контроля) применяют тонкослойную хроматографию.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Особенности ТСХ.

2. Способы применения колоночной хроматографии.
3. Этапы проведения анализа.
4. Как используется параметр  $R_f$  - относительная скорость перемещения.
5. Способы использования элюэтов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-Х.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 6

### Газовая хроматография

Газовая хроматография может быть применена для разделения и определения смесей веществ, которые могут быть легко переведены в газообразное состояние при сравнительно невысоких температурах (обычно – не выше 250<sup>0</sup>С). Среди вариантов ГХ газо-жидкостный распространен несколько больше, чем газо-твердофазный.

Разделение компонентов смеси в газожидкостной хроматографии основано на различной растворимости (абсорбируемости) разделяемых компонентов в пленке неподвижной жидкой фазы. Растворимость газа в жидкости определяется законом Генри:

$$C_{\text{ж}} = K \cdot C_{\text{г}},$$

где  $C_{\text{ж}}$  и  $C_{\text{г}}$  - равновесные концентрации компонента в жидкости и в газовой фазе соответственно;

$K$  - константа Генри.

Чем больше величина  $K$ , тем лучше растворим данный компонент. Выбор неподвижной жидкой фазы определяется природой разделяемых веществ. Так, при анализе углеводов в качестве НФ обычно используют сквалан, при анализе ароматических и галогенированных соединений - бензилдифенил, при анализе многих полярных веществ - полиэтиленгликоль, при анализе ФОС - силиконовые масла и т.д. Через колонку непрерывно пропускают поток инертного газа-носителя (элюента). Выбор этого газа, в отличие от элюента в ЖХ, почти произволен.

В фиксированный момент времени в газ-носитель перед входом в колонку вводится небольшое количество анализируемой пробы. Газ-носитель увлекает ее и несет через колонку. Соприкасаясь с жидкостью, находящейся в колонке, компоненты пробы частично растворяются в ней. Поскольку через колонку непрерывно проходит газ-носитель, зона компонента движется по колонке. При этом в передней части зоны (фронт зоны) происходит абсорбция компонента, а в тыловой части зоны - десорбция.

Чем лучше данный компонент растворим в неподвижной жидкости, тем меньше скорость его движения по колонке. Иными словами, чем больше растворимость компонента, тем дольше он будет задерживаться жидкостью колонки. Поэтому зоны малорастворимых компонентов уйдут вперед, а зоны хорошо растворимых - отстанут. Таким образом, в колонке происходит разделение отдельных компонентов.

В настоящее время выпускается большое количество хроматографов, которые применяются в различных видах хроматографии.

Основной узел хроматографа – колонка: именно в ней происходит процесс разделения. Количество вещества, выходящего из колонки, регистрируют с помощью детектора, а самописец (или дисплей) записывает на ленте (или экране) сигнал детектора - хроматограмму.

Самые современные хроматографы включают в себя несколько колонок, набор различных детекторов, автоматическое устройство для подготовки и ввода пробы, а также компьютер. Он имеет банк данных, обеспечивающий обширной информацией.

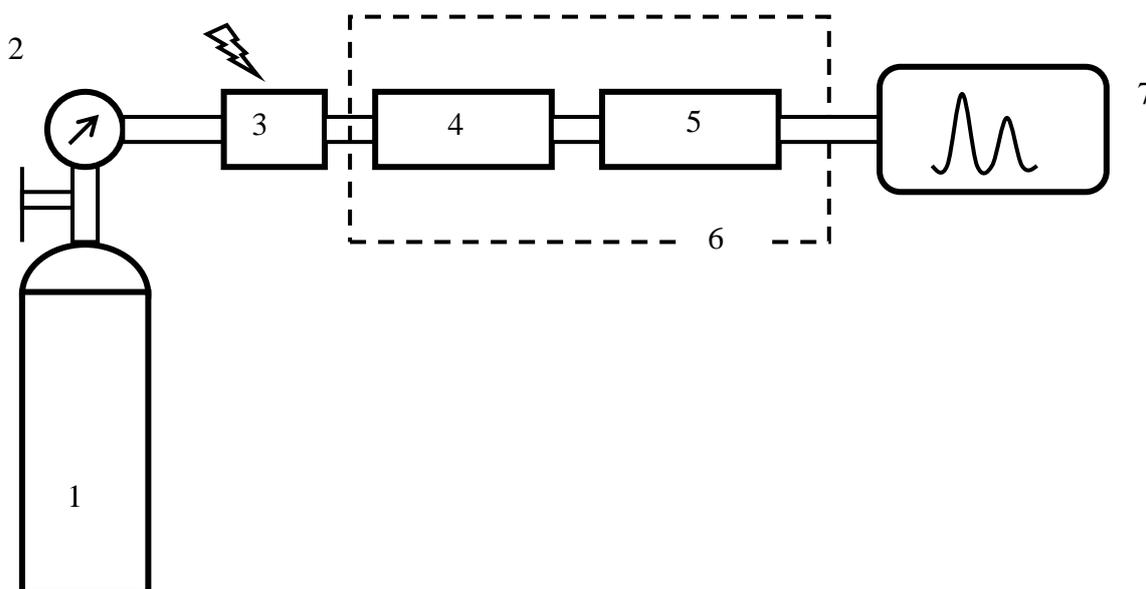
Внедрение запоминающих устройств и мощных процессоров в настоящее время позволяет улучшить идентификацию и количественную обработку хроматографических пиков, а также дает возможность дальнейшего усовершенствования приборов. Для этого необходима строгая слаженность работы всей хроматографической системы: от ввода пробы до разумного выбора ПФ и детектора, а также полная автоматизация процесса, устраняющая субъективные ошибки и увеличивающая скорость обработки результатов.

Сердце хроматографа - хроматографическая колонка. Существуют два основных типа колонок: *насадочные* и *капиллярные*.

Насадочные (набивные) колонки для ГХ представляют собой стеклянные, пластмассовые или металлические трубки длиной от 1 до 50 м с внутренним диаметром от 1,5 до 6 мм. Более длинные колонки обеспечивают лучшее разделение, но приводят к некоторым осложнениям в работе, в частности, из-за возникающих перепадов давления. Колонки заполнены "насадкой" - твердым сорбентом или твердой основой с нанесенной на неё неподвижной жидкой фазой. Инертный твердый носитель имеет средний диаметр зерен около 160 мкм. Поскольку жидкая пленка неравномерно распределена на носителе, не имеет смысла говорить о ее толщине. В аналитических колонках на 100 г твердого носителя приходится от 0,5 до 5 г жидкой неподвижной фазы.

Можно использовать саму стенку колонки как твердую основу. Тогда речь идет о **капиллярной** колонке. В них используется нанесение на стенку длинного капилляра из металла, нейлона или кварцевого стекла (как правило, длиной 10 - 100 м) тончайшего слоя неподвижной фазы. Эта технология позволила существенно улучшить параметры разделения смесей. Диаметр капиллярных колонок мал (до 0,25 мм). Существует несколько способов нанесения внутреннего покрытия колонок. Например, около 1 % длины колонки заполняют 10 %-ным раствором НФ в летучем растворителе, продувают эту жидкость через капилляр (при этом тонкий слой остается на стенках) и удаляют избыток растворителя струей газа.

*Рис. 1. Блок-схема газового хроматографа:*



1 – баллон с газом-носителем (элюентом); 2 – манометр; 3 – дозатор-испаритель; 4 – колонка; 5 – детектор; 6 – термостат; 7 – регистратор (самописец, компьютер)

Рассмотрим вначале некоторые узлы приборов для **газовой** хроматографии.

### Вопросы для самоконтроля

1. Блок-схема газового хроматографа.
2. Виды хроматографических колонок.
3. Закон Генри.

4. Ограничения газовой хроматографии.
5. Основные термины, используемые в газовой хроматографии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М.: Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3

2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: Мир, 2002.

4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 7

### Подбор условий хроматографии

В аналитических целях используется в основном проявительный (элюентный) вариант хроматографии, поэтому подвижная фаза в газовой хроматографии представляет собой не просто газообразную пробу анализируемой смеси, а пробу, вводимую в непрерывный поток инертного газа (“носителя”). Аналогично - в жидкостной хроматографии.

В качестве газа-носителя обычно используются очищенный азот или гелий, реже - водород или аргон, другие газы используются в единичных случаях. Эти газы не должны удерживаться на колонке и давать сигнал детектора.

Требования к неподвижной фазе различаются в зависимости от метода хроматографии. Так, в адсорбционной хроматографии твердая фаза представляет собой сорбент, на котором, собственно, и происходит процесс разделения. В распределительной же хроматографии твердый носитель используют для того, чтобы нанести на него тонкую пленку жидкости, вследствие различной растворимости компонентов в которой происходит процесс их разделения при передвижении по колонке.

Сорбенты, применяемые в адсорбционной хроматографии, должны удовлетворять следующим требованиям: обладать максимально возможной поглотительной способностью, различающейся для разных компонентов смеси; быть устойчивыми в среде, в которой используются; быть дешевыми и доступными.

Этим требованиям удовлетворяет довольно большое количество материалов, но на практике используются чаще всего активированный уголь, силикагель, алюмогель, цеолиты и синтетические материалы на их основе.

Все названные материалы для улучшения адсорбционных свойств нередко подвергают специальной химической обработке - модифицированию. При этом в структуру сорбента вводятся различные функциональные группы.

В распределительной хроматографии в качестве носителя неподвижной жидкой фазы чаще других используются кизельгур (диатомит), стеклянные или тефлоновые микрошарики и некоторые другие твердые инертные материалы.

Нанесение пленки жидкости на инертный твердый носитель на практике весьма трудоемко. Жидкую фазу растворяют в подходящем растворителе, добавляют твердый носитель, а растворитель испаряют. При этом необходимо избежать неравномерности распределения жидкости по носителю, что и является самым трудным.

Среди многих апробированных жидких фаз на практике используют несколько десятков. Правильный выбор неподвижной жидкой фазы представляет собой достаточную сложность, поскольку эмпиричен и основывается на определенном опыте и известном правиле: “подобное растворяется в подобном”.

Требования к неподвижной жидкой фазе очевидны: она должна обладать селективностью к разделяемым компонентам, химической инертностью, термической устойчивостью, практически не удерживать элюент и быть в условиях проведения эксперимента нелетучей.

В капиллярной хроматографии используют колонки очень малого внутреннего диаметра, и стационарная жидкая фаза наносится на поверхность колонки без дополнительного внесения твердого носителя.

Температура инжектора и колонок подбирается экспериментально изависит от возможности испарения анализируемого образца и сопутствующих ему примесей.

Скорость газа-носителя должна быть такой, чтобы сигналы на хроматограмме хорошо разделялись и им не мешал сигнал растворителя.

### Вопросы для самоконтроля

1. Обоснование выбора неподвижной фазы.
2. Особенности капиллярной хроматографии.
3. Методы повышения чувствительности в газовой хроматографии.
4. Подбор скорости газа-носителя.
5. Подбор температуры термостата.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 8

### Детекторы

Хроматография - гибридный аналитический метод, в котором сочетаются разделение и измерение. Метод позволяет *разделить* многокомпонентную смесь, *идентифицировать* компоненты и *определять* ее количественный состав. Поэтому детектирование сигнала (а также запись и обработка его) играет важную роль.

Детектор - прибор, как правило, непрерывного действия, дающий аналитический сигнал на определяемые вещества. Аналитический сигнал возникает за счет фиксирования детектором изменения какого-либо свойства ПФ при попадании в нее исследуемого вещества. Детекторы классифицируют по различным признакам.

1) Они могут быть: *универсальными* - регистрирующими многие вещества; *селективными* - чувствительными к химическим соединениям определенных классов; *специфическими* - обладающими очень высокой селективностью.

2) по способу записи хроматограмм детекторы делятся на:

*интегральные* (такие детекторы регистрируют суммарное количество компонента, вышедшего из колонки за определенный промежуток времени);

*дифференциальные* (мгновенно регистрирует изменение какого-либо свойства, связанного с появлением вещества в ПФ).

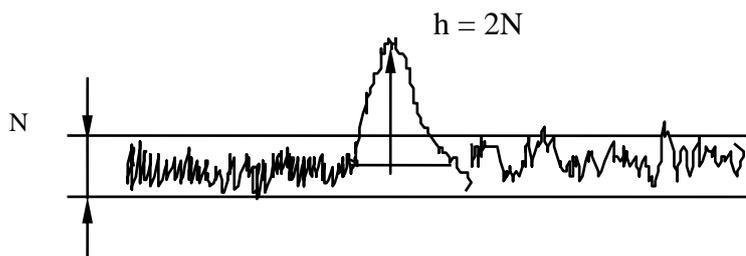
Любой детектор характеризуется следующими параметрами:

1) *чувствительность* - отношение сигнала детектора к количеству обнаруженного им вещества: чем больше это отношение, тем выше чувствительность детектора;

2) *воспроизводимость результатов* - количественной мерой служит стандартное отклонение серии сигналов при вводе в хроматограф одних и тех же проб;

3) *стабильность работы* - высокая чувствительность к колебаниям температуры и скорости потока ПФ;

4) *предел обнаружения* (детектирования) - минимальное определяемое количество вещества, которое вызывает сигнал ( $h$ ), равный удвоенному (иногда утроенному) сигналу шума ( $N$ ):



5) *диапазон линейности* сигнала - интервал линейной зависимости величины аналитического сигнала от концентрации вещества в пробе. Каждый детектор имеет линейный сигнал лишь в определенном диапазоне концентраций.

Кроме того, к детекторам предъявляются вторичные требования: они должны быть простыми по устройству, удобными в использовании, безопасными в работе, надежными и доступными.

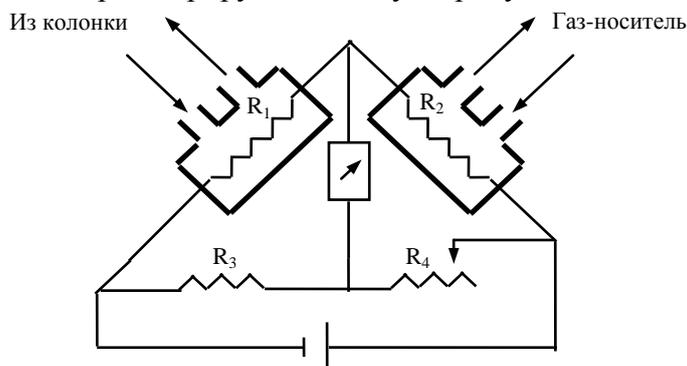
В различных видах хроматографии применяют разные типы детекторов. Так, например, для газовой хроматографии описано несколько десятков детекторов, но в комплектацию прибора входят обычно 4-6. Наиболее широко используются универсальные детекторы - катарометр и пламенно-ионизационный детектор (ПИД), а также селективные - электронного захвата и пламенно-фотометрический. В жидкостной

хроматографии чаще всего используются спектрофотометрические, люминесцентные и электрохимические (кондуктометрический, полярографический) детекторы.

**Детектор по теплопроводности (катарометр).** Этот универсальный детектор ранее наиболее широко применялся в газовой хроматографии. Он устроен следующим образом: в полость металлического блока помещается спираль из металла, обладающего высоким термическим сопротивлением (это могут быть Pt, W, их сплавы, Ni).

Через спираль проходит постоянный ток, и она нагревается. Если в катарометр поступает только газ-носитель, происходит теплообмен между ним и спиралью и, следовательно, её температура остается постоянной. При изменении состава газа меняется теплопроводность газа и соответственно температура спирали. Все это приводит к изменению сопротивления нити, которое измеряют с помощью моста Уитстона (рис. 6).

В этой схеме – две идентичные камеры, в одну из которых поступает газовая смесь из колонки, а в другую (счётную) – чистый газ-носитель из баллона. Когда через обе камеры проходит газ-носитель, детектор настраивают на нуль. При появлении в рабочей камере компонентов смеси наступает разбалансировка моста, и фиксирующее устройство регистрирует выходную кривую.



Понятно, что чувствительность катарометра зависит от того, насколько теплопроводность веществ отличается от таковой для газа-носителя. Следовательно, наиболее выгодно использовать этот детектор с газом-носителем, теплопроводность которого сильно отличается от теплопроводности большинства других газов. Этим газом является гелий (диапазон линейности катарометра в таком случае – до 5 порядков концентрации). Поскольку гелий не так дешев, как, например, часто применяемый азот, чувствительность не относится к числу преимуществ катарометра. Его главное достоинство – в универсальности.

**Пламенно-ионизационный детектор (ПИД).** В этом детекторе выходящий из колонки газ смешивается с водородом и поступает в форсунку горелки, где образуются ионизированные частицы. Последние заполняют межэлектродное пространство детектора, вследствие чего электросопротивление пламени уменьшается, а ток резко усиливается. С помощью ПИД можно определять только соединения, которые ионизируются в пламени, т.е. углеродсодержащие соединения с С – С и С – Н – связями. Стабильность и чувствительность ПИД зависит от подходящего выбора скорости потока всех используемых газов, а поскольку он имеет широкую область линейного отклика, то пригоден для определения следовых количеств веществ.

**Детектор электронного захвата (ЭЗ).** Принцип действия этого детектора основан на том, что многие молекулы могут реагировать с электронами с образованием

стабильных анионов. Этот детектор может быть использован для обнаружения соединений, содержащих галогены, фосфор, серу, нитраты, свинец, кислород, но на большинство углеводородов он не реагирует.

Он представляет собой ионизационную камеру (рис.7), куда из хроматографической колонки поступает газ-носитель ( $N_2$ , He). В камере находятся два электрода и источник  $\beta$ -излучения ( $^{63}Ni$ ,  $^3H$ ,  $^{226}Ra$ , чаще - титановая фольга с адсорбированным тритием). Под действием радиоактивного излучения в камере происходит ионизация молекул газа-носителя, например  $N_2 + \beta = N_2^+ + e^-$ , и образуются медленные электроны. Эти электроны перемещаются к аноду, вследствие чего возникает ток. При попадании в детектор молекул анализируемых веществ медленные электроны захватываются ими, при этом ток детектора уменьшается.

**Атомно-эмиссионный детектор.** Этот детектор пока еще встречается довольно редко: попытки подключения атомно-эмиссионного спектрометра к газовому хроматографу долгое время не давали результатов. Принцип работы детектора состоит в том, что после распыления образца атомы в нем возбуждаются до более высокого энергетического уровня, а затем, возвращаясь в исходное состояние, излучают свет с характеристичными длинами волн.

Для возбуждения атомов используется плазма, индуцированная микроволновым излучением. В состав спектральной схемы детектора входит дифракционная решетка. Регистрация аналитического сигнала происходит на компьютере.

Атомно-эмиссионным детектором HP5921A может быть обнаружено более 40 элементов, в том числе различные изотопы углерода, водорода, кислорода и азота. Пределы обнаружения большинства элементов находятся на уровне 0,1 – 20 пкг/с, диапазон линейности 3 – 4 порядка концентрации. Детектор селективен: при настройке его на определенную длину волны определению не мешают 1000 – 10000-кратные избытки других элементов.

Практические трудности состоят в том, что для создания плазмы должен использоваться очень чистый гелий (он же – и газ-носитель): степень его чистоты не ниже 99,9999 %.

**Пламенно-фотометрический детектор** измеряет интенсивность излучения веществ в водородном пламени (т.е. работает по принципу пламенно-эмиссионного фотометра). При сгорании веществ образующиеся атомы возбуждаются, а при возвращении в исходное состояние испускают характеристичное излучение. Оптические фильтры, используемые в детекторе (обычно – интерференционные), выделяют спектральные линии, характерные для определенных соединений. Детектор наиболее чувствителен к фосфорсодержащим и серосодержащим веществам (длины волн соответственно 526 и 394 нм). Излучение принимается и усиливается фотоумножителем.

Использование такого селективного детектора часто снижает необходимость в трудоемких операциях по подготовке образцов к измерениям. Однако характер химических реакций, происходящих в пламени, находится в сложной зависимости от скорости потока газов и температуры. Вследствие этого интенсивность излучения связана с концентрацией не линейно, а приблизительно пропорциональна квадрату ее. Тем не менее, измерительная схема детектора позволяет поддерживать линейность отклика в диапазоне  $10^3$  для соединений серы и  $10^4$  – для фосфора при пределах обнаружения 20 и 0,9 пкг соответственно. Не мешают 10000-кратные избытки других соединений.

Наиболее важными параметрами, влияющими на стабильность работы детектора и его чувствительность, являются соотношение водорода с воздухом (или кислородом) и температура головки детектора.

*Масс-селективный детектор.* Масс-селективный детектор для ГЖХ имеет ряд преимуществ по сравнению с другими видами детекторов. Он позволяет не только идентифицировать исследуемое соединение по времени удерживания на хроматографической колонке, но и сравнивать его масс-спектр с масс-спектром эталонного образца. Кроме того, при отсутствии стандарта данный метод позволяет идентифицировать соединение путем сравнения спектров исследуемого соединения со спектрами, имеющимися в библиотеке данных, так как параметры масс-спектра в меньшей степени зависят от вторичных факторов, чем время удерживания (последний параметр может зависеть даже от времени эксплуатации колонки, поэтому стандарт в данном случае необходим).

Следует отметить, что при помощи ГЖХ с масс-селективным детектором можно работать и с ранее неизвестными соединениями. В этом случае по данным хромато-масс-спектрометрии можно анализировать сложные реакционные смеси, где находятся продукты неизвестной этиологии, что создает перспективу при проведении научно-исследовательских работ.

Кроме того, при исследовании образцов, где трудно представить примерный состав анализируемой пробы, данный метод будет незаменимым.

Если сравнивать хромато-масс-спектрометрию и масс-спектрометрию, то можно выделить следующие основные отличия методов:

- в хромато-масс-спектрометрии более часто проявляется молекулярный ион, чем в масс-спектрометрии, так как хроматографическому анализу обычно подвергаются соединения, которые способны переводиться в газообразную фазу и являются относительно стабильными;

- при помощи масс-спектрометрии можно анализировать соединения с гораздо большей молекулярной массой, чем при помощи хромато-масс-спектрометрии;

- при помощи масс-спектрометрии можно анализировать только индивидуальные соединения, а не сложные смеси, как в хромато-масс-спектрометрии;

- масс-селективный детектор является (как правило) более примитивным прибором, чем специализированные масс-спектрометры, и в нем ионизация образца происходит под действием электронного удара;

- к недостаткам ГЖХ с масс-селективным детектором можно отнести все недостатки хроматографического метода анализа, так как анализируемый образец попадает в масс-спектрометр только после прохождения через хроматографическую колонку;

- при помощи масс-селективного детектора (как правило) нельзя получать масс-спектры высокого разрешения;

- при помощи масс-селективного детектора (как правило) нельзя проводить элементный анализ образца.

Таким образом, использование ГЖХ с масс-селективным детектором наиболее целесообразно для исследования образцов, в которых могут содержаться неизвестные или труднодоступные соединения, то есть где возникают трудности с получением стандартных образцов.

## Вопросы для самоконтроля

1. Основные виды детекторов в хроматографии.
2. Особенности и преимущества масс-селективного детектора.
3. Детектор ионизации в пламени.
4. Катарометр.
5. Пламенно-фотометрический детектор.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3

2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 9

### Метод ВЭЖХ

В последние десятилетия (начиная с 1968 г.) происходит переход от классической колоночной к высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). **ВЭЖХ** представляет собой хроматографирование на колонке под высоким давлением. Интерес к этому методу обусловлен следующими достоинствами: универсальность, возможность автоматизации разделения и анализа сложных смесей, экспрессность, высокие эффективность и чувствительность.

Коэффициенты диффузии в жидкостях на несколько порядков ниже, чем в газах, поэтому вклад величины продольной диффузии в выражение для ВЭТТ ничтожен. Следовательно, исходя из кинетической теории, не должно существовать оптимальной скорости потока, при которой ВЭТТ была бы минимальной, и эффективность работы колонки с возрастанием скорости потока элюента должна резко ухудшаться.

Действительно, при работе с обычными сорбентами так оно и есть. Большая глубина пор сорбентов в классической ЖХ является основной причиной ее низкой эффективности. В ВЭЖХ широко применяются *поверхностно-пористые сорбенты*. Это твердые непористые сферические зерна, на поверхность которых нанесен тонкий (около 1 мкм) слой адсорбента с высокой пористостью. Реально это силикагель, оксид алюминия или некоторые полимеры, нанесенные на поверхность стеклянных микрошариков. Отсутствие глубоких пор приводит к уменьшению ВЭТТ и значительному увеличению эффективности колонки. Существуют и *объемно-пористые сорбенты*, размер их частиц (5-10 мкм) также намного меньше, чем размер частиц обычных сорбентов.

В настоящее время интенсивно развиваются различные варианты ВЭЖХ.

*Адсорбционная хроматография.* В адсорбционном варианте жидкостной хроматографии в зависимости от полярности ПФ и НФ различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию. В НФХ используют полярные НФ и неполярные ПФ, а в ОФХ - наоборот. В обоих случаях выбор подвижной фазы часто важнее, чем выбор вещества неподвижной фазы. Обычно разделения достигают, меняя элюирующую силу ПФ. **Элюирующая сила** показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции элюента, принятого за стандарт. Различают слабые и сильные элюенты. Элюент тем сильнее, чем выше растворимость в нем анализируемой пробы. В НФХ элюирующая сила растет с увеличением полярности растворителя, в ОФХ – наоборот.

*Распределительная хроматография.* В этом варианте происходит распределение вещества между двумя несмешивающимися жидкостями в соответствии с растворимостями в них. В настоящее время используют, как правило, неподвижные фазы, химически привитые к поверхности неподвижного носителя.

*Ионообменная, ионная, ион - парная хроматография.* В основе этих методов лежит динамический процесс замещения ионов, связанных с НФ, ионами элюента, поступающими в колонку. Преследуемая цель - разделение органических и неорганических ионов с зарядом одного знака на ионообменниках.

*Эксклюзионная хроматография* - разделение компонентов основано на распределении молекул между растворителем, находящимся в порах сорбента и растворителем, протекающим через колонку, в соответствии с их размером. В процессе разделения небольшие молекулы удерживаются сеткой полимера, а большие

вымываются из колонки подвижной фазой. Вначале элюируются самые большие молекулы, затем средние, а потом - маленькие.

### Вопросы для самоконтроля

1. Виды жидкостной хроматографии.
2. Виды детекторов в ВЭЖХ.
3. Этапы проведения анализа.
4. Элюирующая сила растворителей.
5. Ограничения метода ВЭЖХ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 10

### Спектральные методы исследования в биохимии

Метод инфракрасной спектроскопии является одним из важнейших современных методов исследования органических веществ. ИК-спектры большинства органических соединений, в отличие от УФ-спектров, дают богатый набор полос поглощения, который отвечает колебаниям почти всех функциональных групп.

Обычно для изображения ИК-спектров по оси абсцисс откладывают **частоту**, **волновое число**, реже - **длину волны**.

Длина волны ( $\lambda$ ) и частота ( $\nu$ ) связаны между собой соотношением:

$$\nu = \frac{c}{\lambda},$$

где  $c$  – скорость распространения излучения в определенной среде.

Для характеристики электромагнитного излучения применяется также волновое число ( $\bar{\nu}$ ,  $\nu'$ ) – величина, обратная длине волны:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

Оно показывает, сколько волн уместится в единице длины, чаще всего в 1 см; в этом случае размерность волнового числа [ $\text{см}^{-1}$ ]. Часто волновое число называют частотой, хотя следует признать, что это не вполне корректно. Они пропорциональны друг другу. ИК-область в общем электромагнитном спектре занимает диапазон длин волн от 2 до 50 мкм (волновое число 5000 - 200  $\text{см}^{-1}$ ).

Интенсивность поглощения ИК-излучения, как правило, выражают величиной пропускания ( $T$ ), обычно выражаемой в %:

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%,$$

где  $I$  – интенсивность излучения, прошедшего через образец;

$I_0$  – интенсивность падающего излучения.

Инфракрасная спектроскопия является универсальным методом определения важных функциональных групп, а также структурных фрагментов в небольших количествах вещества при любом его агрегатном состоянии.

Круг вопросов, так или иначе связанных с использованием ИК-спектроскопии, чрезвычайно широк. С помощью ИК-спектроскопии можно проводить идентификацию веществ, структурно-групповой анализ, количественный анализ, изучение внутри- и межмолекулярных взаимодействий, установление конфигурации, изучение кинетики реакций и т.д. Современные автоматические ИК-спектрофотометры позволяют очень быстро получить спектр поглощения, причем от оператора требуется минимум специальных знаний и навыков. Рассмотрим причины поглощения ИК-излучения молекулами.

Поглощение инфракрасного излучения веществом вызывает переходы между колебательными уровнями основного электронного состояния. При этом изменяются также и вращательные уровни. Поэтому ИК-спектры являются колебательно-вращательными.

Химическую связь в двухатомной молекуле можно упрощенно представить в виде упругой пружины. Тогда ее растяжение и сжатие будет моделировать колебание атомов в молекуле. Для гармонического осциллятора возвращающая сила пропорциональна

величине смещения ядер из положения равновесия и направлена в сторону, противоположную смещению:

$$F = -K \cdot \Delta r,$$

где  $K$  – коэффициент пропорциональности, который называется силовой постоянной и характеризует жесткость связи (упругость связи).

Из законов классической механики известно, что частота колебаний такой системы связана с силовой постоянной  $K$  и с массами атомов ( $m_1$  и  $m_2$ ) следующим соотношением:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}},$$

где  $\mu$  – приведенная масса, равная  $\frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$ .

Силовые постоянные одинарных, двойных и тройных связей соотносятся приблизительно как 1: 2: 3. Из соотношения (1.1) следует, что частота колебаний возрастает с увеличением прочности связи (кратности связи) и с уменьшением масс атомов.

**Спектрофотометрия** (электронная абсорбционная спектроскопия) основана на поглощении видимого и ультрафиолетового электромагнитного излучения (света) молекулами веществ.

В процессе поглощения света электроны в молекуле переходят с одних энергетических уровней на другие, а молекула – из своего основного состояния в возбужденное. Поскольку поглощение квантов света молекулами избирательно и зависит от строения молекул, а количество поглощаемых квантов пропорционально числу молекул, то, измерив поглощаемое излучение с помощью приборов, можно сделать выводы как о строении изучаемых молекул, так и об их концентрации. Поэтому метод электронной спектроскопии широко применяется для исследования строения и реакционной способности молекул (в основном, органических), а также для определения концентрации самых разнообразных веществ (как органических, так и неорганических) в растворах.

Метод электронной абсорбционной спектроскопии называют также **молекулярной абсорбционной спектроскопией** в УФ (ультрафиолетовой) и видимой областях спектра, подчеркивая тем самым, что поглощающими свет частицами являются молекулы.

Электромагнитное излучение представляет собой поток **фотонов** – отдельных порций (квантов) электромагнитной энергии. Энергия фотона (кДж) вычисляется по формуле Планка:

$$E = h\nu$$

где  $\nu$  – частота электромагнитных колебаний,  $\text{с}^{-1}$ ;  $h$  – постоянная Планка  $6,62 \cdot 10^{-37}$  кДж·с.

Каждому фотону соответствует определенная длина волны ( $\lambda$ ) и частота колебаний ( $\nu$ ) электромагнитной волны, которые связаны между собой соотношением

$$\nu\lambda = c, \text{ где } \lambda \text{ – длина волны, выражаемая в метрах (м) или нанометрах (нм);}$$
$$c \text{ – скорость света, равная в вакууме, } 3 \cdot 10^8 \text{ м/с (} 3 \cdot 10^{17} \text{ нм/с).}$$

Для характеристики электромагнитного излучения применяется также волновое число ( $\bar{\nu}$ ) – величина, обратная длине волны

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

Оно показывает, сколько волн уместится в единице длины, чаще всего в 1 см; в этом случае размерность волнового числа [ $\text{см}^{-1}$ ].

Например, электромагнитное излучение, характеризующееся **длиной волны**  $\lambda = 200$  нм ( $200 \cdot 10^{-7}$  см), имеет

частоту  $\nu = \frac{c}{\lambda} = \frac{3 \cdot 10^{17} \text{ нм/с}}{200 \text{ нм}} = 1,5 \cdot 10^{15} \text{ с}^{-1}$   
 и волновое число  $\bar{\nu} = \frac{1}{200 \cdot 10^{-7} \text{ см}} = 5 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$ .

**Энергия фотонов** такого излучения

$$E = h\nu = 6,62 \cdot 10^{-37} \text{ кДж} \cdot \text{с} \cdot 1,5 \cdot 10^{15} \text{ с}^{-1} = 10 \cdot 10^{-28} \text{ кДж}.$$

Электромагнитные волны могут иметь длину волны от  $10^{-13}$  м (у гамма-лучей) до  $10^4$  м (у радиоволн). Весь диапазон длин волн электромагнитного излучения называется **электромагнитным спектром**.

Характеристика электромагнитного спектра

Виды волн	Длина волны, м (нм)
Гамма-лучи ( $\gamma$ -лучи)	$< 10^{-10}$
Рентгеновское излучение	$10^{-10} - 5 \cdot 10^{-9}$
Ультрафиолетовые лучи (УФ-область)	от $5 \cdot 10^{-9} - 4 \cdot 10^{-7}$ (5 – 400 нм)
Видимая область спектра	$4 \cdot 10^{-7} - 7,6 \cdot 10^{-7}$ (400 – 760 нм)
Инфракрасные лучи (ИК-область)	$7,6 \cdot 10^{-7} - 10^{-4}$
Микроволны (СВЧ-излучение)	$10^{-4} - 10^{-1}$
Радиоволны	$> 10^{-1}$

Излучение, характеризующееся одной длиной волны, называется **монохроматичным**. Излучение, в котором имеются фотоны с разной длиной волны, называется **полихроматичным**. С увеличением длины волны энергия фотонов понижается.

Для осуществления электронных переходов в молекуле необходимо воздействовать на вещество фотонами с энергией от  $20 \cdot 10^{-22}$  до  $1,8 \cdot 10^{-22}$  кДж (1200 - 120 кДж/моль).

Такой энергией обладает электромагнитное излучение УФ (ультрафиолетовой), видимой и ближней ИК (инфракрасной) областей.

Охарактеризуем эти области спектра.

**Видимая часть спектра** включает волны с длиной от 400 до 760 нм. Именно воздействие этих волн вызывает в зрительном аппарате человека ощущение света. При совместном воздействии всех фотонов этого диапазона возникает ощущение белого цвета.

**Ультрафиолетовая часть спектра (УФ)** представлена более короткими волнами. Она подразделяется на **ближнюю** УФ область (от 200 до 400 нм) и **дальнюю** УФ область (от 5 до 200 нм). УФ-лучи не воспринимаются человеческим глазом.

**Ближняя инфракрасная часть спектра (ИК)** примыкает к видимой области спектра и включает в себя волны с длиной от 760 до 1100 нм. ИК-лучи воспринимаются человеком как невидимое тепловое излучение.

Поглощение фотонов указанного выше диапазона молекулами органических и неорганических соединений приводит к электронным переходам в молекулах и часто сопровождается возникновением окраски.

Электронные уровни энергии в молекулах органических соединений лучше всего интерпретировать на основе теории молекулярных орбиталей.

1. Электроны, образующие ординарную связь, называются  $\sigma$ -электронами. Они находятся на связывающей  $\sigma$ -орбитали. Эта орбиталь обладает наименьшей энергией, поэтому  $\sigma$ -связь - самая прочная. При поглощении кванта света один электрон может перейти на  $\sigma^*$ -разрыхляющую орбиталь. Такой переход называется  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ .

2. Электроны, образующие двойную (тройную) связь, называются  $\pi$ -электронами. Они находятся на связывающей  $\pi$ -орбитали. Энергия этой орбитали выше, чем  $\sigma$ -орбитали. Поэтому  $\pi$ -связь менее прочная, чем  $\sigma$ -связь. При поглощении кванта света электрон переходит на  $\pi^*$ -разрыхляющую орбиталь. Такой переход называется  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

3. Электроны неподеленных пар гетероатомов кислорода, азота, входящих в состав молекул, называются  $n$ -электронами, они находятся на несвязывающих  $n$ -орбиталях. Энергия  $n$ -орбитали выше, чем  $\pi$ -орбитали. При поглощении кванта света  $n$ -электрон может переходить на  $\pi^*$  и  $\sigma^*$ -разрыхляющие орбитали. Такие переходы называются  $n \rightarrow \pi^*$  и  $n \rightarrow \sigma^*$ .

4. Особую группу переходов составляют переходы с внутримолекулярным переносом заряда (ВПЗ). Такие переходы сопровождаются смещением электронов от электронодонорных к электроноакцепторным группам внутри молекулы, происходящим при поглощении кванта света.

**$\sigma \rightarrow \sigma^*$ -переходы** возможны только при действии фотонов с высокой энергией ( $\Delta E_{\sigma \rightarrow \sigma^*}$  – большая величина, от 800 до 1100 кДж/моль). Такой энергией обладает излучение с длиной волны менее 150 нм (дальний ультрафиолет). Эти переходы характерны для предельных углеводов.

**$\pi \rightarrow \pi^*$ -переходы.** Для осуществления этих переходов требуется значительно меньшая энергия ( $\Delta E_{\pi \rightarrow \pi^*} < \Delta E_{\sigma \rightarrow \sigma^*}$ ). Эти переходы характерны для непредельных соединений и, в зависимости от строения молекул, могут находиться в видимой и ближней УФ-области. Чем длиннее цепочка сопряженных двойных связей, тем больше длина волны поглощаемого света.

**$n \rightarrow \sigma^*$ -переходы.** По энергии близки к  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходам. Характерны для предельных соединений, содержащих гетероатомы.

**$n \rightarrow \pi^*$ -переходы** – являются самыми длинноволновыми, т.к.  $\Delta E_{n \rightarrow \pi^*} < \Delta E_{\pi \rightarrow \pi^*}$ . Проявляются в соединениях, у которых гетеро-атом связан с атомом углерода двойной связью (например, в карбонильных соединениях).

В соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера интенсивности падающего и прошедшего света связаны между собой соотношением:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c \ell,$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивности падающего и прошедшего света соответственно (интенсивность определяется числом квантов, проходящих за единицу времени через единицу площади);

$c$  – концентрация светопоглощающего вещества в растворе, моль/л;

$\ell$  – длина светопоглощающего слоя (длина кюветы), см;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения, л · моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

Этот закон является основным законом светопоглощения.

Величина  $A = \lg \frac{I_0}{I}$

называется **оптической плотностью раствора**. Она характеризует интенсивность окраски раствора (поглощения света раствором) и может принимать значение от 0 до +

$\infty$ . Чем интенсивнее окраска раствора, тем выше величина его оптической плотности. Закон Бугера – Ламберта – Бера (1.3) приобретает следующий вид:  $A = \epsilon c l$

**Молярный коэффициент поглощения  $\epsilon$**  численно равен оптической плотности раствора с концентрацией 1 моль/л в кювете с длиной светового пути 1 см. Его размерность обычно опускают. В спектроскопии этот коэффициент принят в качестве меры интенсивности поглощения данным веществом монохроматического света. Это индивидуальная характеристика вещества, которая зависит от его природы и длины волны поглощаемого света. Измерив оптическую плотность раствора с известной концентрацией, можно вычислить величину  $\epsilon$ , которая на практике может принимать значения от единиц до сотен тысяч.

Наряду с оптической плотностью, для характеристики поглощения света применяется показатель *пропускания* (коэфф. пропускания, прозрачности, T), который показывает, какая часть падающего светового потока прошла через раствор (обычно – в %):

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

Величина T может изменяться в интервале  $0 \leq T \leq 1$  (или от 0 до 100 %). Между T (в долях) и A существует соотношение

$$A = -\lg T$$

Оптическую плотность и пропускание растворов можно измерить с помощью оптических приборов (спектрофотометров).

В том случае, когда в растворе находится несколько веществ, поглощающих излучение при выбранной длине волны, справедлив закон **аддитивности** оптических плотностей: оптическая плотность раствора равна сумме оптических плотностей всех компонентов, входящих в его состав:

$$A = \sum A_i$$

Следовательно, в таком случае проведение количественного анализа затруднено, но в принципе возможно. Так, если в растворе находятся два поглощающих свет компонента, то для двух разных длин волн

$$A^{\lambda_1} = l (\epsilon_1^{\lambda_1} C_1 + \epsilon_2^{\lambda_1} C_2)$$

$$A^{\lambda_2} = l (\epsilon_1^{\lambda_2} C_1 + \epsilon_2^{\lambda_2} C_2)$$

Здесь  $C_1$  и  $C_2$  – концентрации компонентов в растворе, а  $\epsilon_1^{\lambda_1}$ ,  $\epsilon_1^{\lambda_2}$ ,  $\epsilon_2^{\lambda_1}$  и  $\epsilon_2^{\lambda_2}$  – их молярные коэффициенты поглощения при разных длинах волн. Следовательно, зная эти коэффициенты и измерив оптические плотности анализируемого раствора при двух длинах волн, можно провести двухкомпонентный анализ путем решения системы двух уравнений.

Фотометрические измерения заключаются в сравнении падающего на исследуемый объект излучения с интенсивностью  $I_0$  и прошедшего через него светового потока с интенсивностью I.

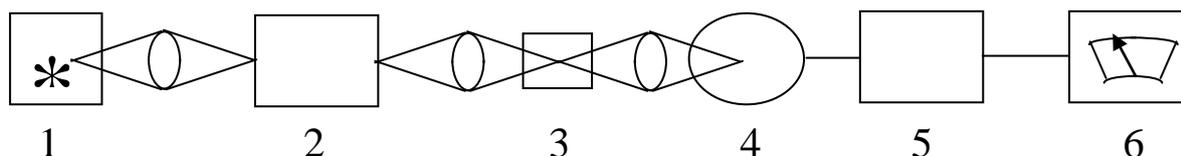


Схема однолучевого абсорбционного спектрофотометра.

1 – источник света; 2 – устройство выделения спектрального интервала (монокроматор, светофильтр); 3 – кюветное отделение; 4 – детектор; 5 – усилитель; 6 – индикатор выходного сигнала.

Существуют одно- и двулучевые приборы, схемы которых различаются только способом оценки отношения  $I_0/I$ .

При измерениях на **однолучевых** приборах на пути светового потока устанавливают сначала *образец сравнения* (нулевой образец), затем - исследуемый.

Детектор последовательно фиксирует значения интенсивности прошедшего света для образца сравнения и исследуемого образца.

При измерениях на **двулучевых** приборах два одинаковых по интенсивности потока одновременно проходят через образец сравнения и исследуемый, а на детектор попадает уже суммированный при помощи интегрирующего устройства поток излучения.

Спектральные приборы классифицируют по следующим характеристикам.

1. По спектральным областям. Это определяется главным образом прозрачностью оптических материалов и их диспергирующими свойствами.

2. По способу монохроматизации потока излучения. Для получения монохроматического излучения используют светофильтры, призмы, дифракционные решетки.

3. По типу регистрации интенсивности излучения (характеру детектора), применяемого в данном приборе. Детектором может служить глаз (визуальные фотометры или спектроскопы) с фотографической пластинкой (спектрограф). Наиболее удобны в фотометрическом анализе приборы с фотоэлектрической регистрацией – фотоэлектроколориметры (ФЭК) и спектрофотометры.

Жидкие образцы перед измерением должны быть помещены в соответствующие кюветы.

**Выбор кювет.** Объем кюветы выбирают в зависимости от количества раствора. При незначительном количестве слабо поглощающего раствора следует использовать узкие кюветы, но с достаточной толщиной поглощающего слоя. Основным критерием выбора кювет является необходимость выдержать оптимальный интервал измеряемых оптических плотностей ( $A = 0,1 - 1,0$ ).

**Типы кювет.** Наиболее распространены прямоугольные кюветы различной толщины. Парные кюветы должны иметь одинаковое пропускание при заполнении их одинаковыми растворами. Наиболее удобны кварцевые кюветы, которые пропускают излучение в УФ-, видимой и ближней ИК-областях, в то время как кюветы из силикатного стекла пригодны для работы только в видимой и ближней ИК-областях.

Фотометрический анализ обычно проводят при комнатной температуре. В тех случаях, когда небольшое изменение температуры (2-3 градуса) приводит к значительному изменению оптической плотности фотометрируемого раствора, измерения проводят после предварительного термостатирования. В некоторых случаях для увеличения скорости реакции проводят нагревание растворов.

Взаимодействия различных веществ в растворах, приводящие к образованию молекулярных комплексов различного типа, как правило, сопровождаются изменениями в электронных спектрах поглощения.

Существуют комплексы, образование которых сопровождается появлением в спектре новых полос, отсутствующих у неассоциированных молекул. К таким комплексам относятся донорно-акцепторные, характеризующиеся переносом заряда от одной молекулы к другой, координационные комплексы переходных металлов с лигандами и некоторые др. Наличие новой полосы в спектре поглощения является

надежным доказательством существования комплекса, и именно эта полоса используется при изучении состава и устойчивости образующихся соединений.

### Вопросы для самоконтроля

1. Характеристики электромагнитного спектра излучения.
2. Фотометрия.
3. Молекулярный коэффициент поглощения.
4. Закон Бугера-Ламберта-Бера.
5. Метод инфракрасной спектроскопии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
  2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
  3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
  4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
  5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
  6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
  7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
  8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)
- Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 11

### Капиллярный электрофорез

С методами жидкостной хроматографии тесно связан открытый сравнительно недавно метод капиллярного электрофореза. Их принципы настолько близки, что последний часто рассматривают как разновидность жидкостной хроматографии.

Метод капиллярного электрофореза возник благодаря объединению возможностей обычного электрофореза в разделении частиц (обычно – заряженных) и хорошо разработанной аппаратуры хроматографического анализа.

Обычное *электрофоретическое разделение* происходит за счет различия в способностях частиц к *миграции* в электрическом поле. В методе капиллярного электрофореза разделение проводят в капиллярах (с диаметром 25 – 75 мкм), заполненных буферными растворами. Высокое электрическое сопротивление капилляра позволяет работать с сильными электрическими полями (до 500 В/см), что способствует сокращению продолжительности анализа и достижению высокой эффективности разделения. Возникновение электроосмотического потока в капилляре позволяет разделять любые частицы, независимо от их заряда.

Устройство прибора выглядит сравнительно несложным. Концы кварцевого капилляра помещают в резервуары с буферными растворами, в которые помещены электроды. С их помощью подключают капилляр к высоковольтному напряжению. Анализируемый образец вводят в капилляр, заменяя один из резервуаров с буфером (обычно у анода) резервуаром с образцом и кратковременно прикладывая электрическое поле. После этого конец капилляра снова переносят в резервуар с буферным раствором и накладывают поле, производящее разделение компонентов смеси при ее движении вдоль капилляра. Обнаружение веществ и измерение аналитического сигнала (обычно – оптической плотности) чаще проводят спектрофотометрическими детекторами непосредственно через прозрачную стенку капилляра у его противоположного конца.

Одно из преимуществ метода – широкий диапазон возможностей относительно природы разделяемых веществ. С его помощью анализируют сложные смеси аминокислот, витаминов, пестицидов, оптических изомеров различных веществ, неорганических и органических ионов, красителей, поверхностно-активных веществ, белков и др. При этом требуются очень малые количества образца, невелик и расход органических растворителей.

Важнейшим фактором, влияющим на проведение высокоэффективного капиллярного электрофореза, является т.н. **электроосмотический поток**. Это объемный поток жидкости в капилляре, вызванный наличием поверхностного заряда на его внутренней стенке. От величины этого потока зависит время пребывания частиц смеси в капилляре.

Известно, что в практике аналитической химии стараются, если возможно, работать с водными средами. К счастью, в методе капиллярного электрофореза дело обстоит именно таким образом. При работе с водными растворами большинство твердых поверхностей (в том числе и кварцевая трубка) несут избыток *отрицательных* зарядов. В этом "повинны" и ионизация поверхности (силанольные группы у кварца), и адсорбция ионов на стенке. Очевидно, заряд поверхности вызывает формирование в растворе слоя *противоионов* (катионов). При наложении внешнего напряжения они притягиваются к катоду, но, поскольку они сольватированы (в случае воды –

гидратированы), они "тащат" за собой весь раствор, что и приводит к возникновению электроосмотического потока.

Поскольку заряд поверхности сильно зависит от кислотности раствора, величина потока меняется с изменением pH. Кроме этого, существенное влияние на его величину оказывает и ионная сила раствора.

Очевидно, важность наличия электроосмотического потока состоит в том, что (в отличие от обычного электрофореза) он заставляет двигаться в том же направлении почти все частицы (т.е. и катионы, и незаряженные молекулы, и даже анионы). Даже анионы движутся к катоду, поскольку их собственное притяжение к аноду примерно на порядок слабее силы электроосмотического потока. Следовательно, в процессе одного анализа возможно разделение частиц по их заряду: катионы мигрируют наиболее быстро (совместное действие электроосмотического потока и электрофоретического притяжения к катоду), молекулы – медленнее (только поток), анионы – наиболее медленно. Лишь в случае разделения небольших ионов возможно движение катионов и анионов в противоположных направлениях.

Поскольку электроосмотический поток играет такую большую роль, им необходимо уметь управлять. Способов для этого много: изменение напряженности электрического поля, pH, ионной силы и концентрации буферных растворов, температуры, введение поверхностно-активных и некоторых других веществ.

Что же является "выходной кривой" в рассматриваемом методе? Это **электрофореграмма** – кривая, аналогичная хроматограмме, а следовательно, и параметры разделения удобно использовать аналогичные.

Время, затрачиваемое на миграцию растворенного вещества до точки обнаружения, называют **временем миграции**. Это время можно использовать для расчета подвижности растворенного вещества, а следовательно, для установления его *природы*, т.е. для целей качественного анализа.

К сожалению, как и в жидкостной хроматографии, в методе капиллярного электрофореза много причин для размывания зон, поэтому разделяемые компоненты должны иметь существенно различающиеся времена миграции. Степень размывания необходимо по возможности контролировать. При идеальных условиях основным фактором, приводящим к размыванию зон, является продольная диффузия ("вперед – назад" по капилляру). Следовательно, надо дать возможность веществам как можно меньше находиться в капилляре, что может быть достигнуто применением высоких напряженностей электрического поля. Кроме того, необходимо использовать среды, в которых коэффициенты диффузии веществ минимальны.

Другими факторами, влияющими на размывание зон, являются перепады температуры (из-за джоулевого разогрева), конечная длина зоны образца при его введении, взаимодействие компонентов раствора с материалом капилляра (в том числе их адсорбция на поверхности).

Буферные растворы, используемые в капиллярном электрофорезе, должны иметь высокую буферную емкость в выбранном диапазоне кислотности и малую подвижность собственных ионов. Кроме того, если предполагается спектрофотометрическое окончание аналитической процедуры (что чаще всего и бывает), они должны иметь малое собственное светопоглощение на выбранной длине волны. Концентрация буферов обычно невелика – 10 - 50 ммоль/л и редко достигает 0,5 моль/л. Возможность образования компонентами буферных растворов комплексных соединений с разделяемыми ионами следует всегда учитывать: в ряде случаев она может быть весьма

полезна, поскольку влияет на подвижность и может привести к улучшению селективности разделения.

С кварцевыми капиллярами работают в области рН от 2 до 12. Но значение рН играет громадную роль в разделении, и поиск его оптимального значения – один из первых этапов разработки методики анализа.

Добавки, вводимые в состав буферного раствора, могут быть весьма разнообразными, на чаще всего это – *поверхностно-активные вещества*. Они и взаимодействуют с анализируемыми веществами, и адсорбируются внутренней стенкой капилляра, и изменяют электроосмотический поток. Высокие же концентрации ПАВ и вовсе меняют механизм электрофоретического разделения.

Как и в хроматографии, зона смеси при ее введении в капилляр должна быть возможно меньшей. Длина капилляра обычно составляет 50 – 75 см, а длина вводимой зоны должна быть около 2 % от этой величины. Таким образом, объем вводимой пробы составляет от 1 до 50 нанолитров, что, конечно, представляет немалые экспериментальные трудности (здесь – один из ответов на вопрос: почему метод столь хорош, а приборы встречаются редко?). Введение образца может осуществляться путем приложения давления к входной части капилляра, создания разрежения у выходной части или создания электрического поля (в несколько раз более сильного, чем используемого при последующем разделении). Точность введения заданного объема поддерживается современными приборами (в основном – фирмы "Хьюлетт – Паккард") на уровне 2 – 3 %, для чего необходимо хорошее термостатирование капилляров (с точностью до  $0,1^0$ ).

Рабочий капилляр – тоже отнюдь не дешевая часть прибора. Материал капилляра должен быть химически и электрически инертным, прозрачным в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, гибким и прочным. Этим требованиям лучше всего отвечает кварц. Конечно, снаружи капилляр покрывают для прочности защитным слоем пластмассы, и лишь на небольшом расстоянии (несколько миллиметров), там, где будет проводиться спектрофотометрическое измерение, пластмассу удаляют. Другим материалом, используемым для этой цели, является тефлон.

Для воспроизводимой работы капилляр необходимо периодически очищать. Поскольку для этого используют не только буферные растворы, но и более агрессивные вещества, в том числе щелочи, состояние внутренней поверхности воспроизводится неидеально, в чем состоит еще одна практическая проблема.

В капиллярном электрофорезе используются источники постоянного тока, дающие токи от 0,2 до 0,3 мА при напряжении до 30 кВ. Напряжение поддерживают с высокой точностью (до 0,1 %). Источники должны давать возможность программируемого изменения напряжения в процессе анализа.

Из-за малого диаметра капилляра обнаружение веществ и измерение величины сигнала в капиллярном электрофорезе затруднены. Из-за этого, несмотря на малые объемы вводимых проб, метод нельзя считать высокочувствительным. Наиболее часто пользуются спектрофотометрическим обнаружением в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. При этом предел обнаружения может находиться на уровне  $10^{-5}$  моль/л и лишь при самых благоприятных условиях может быть снижен на 2 – 3 порядка. Детекторы по электропроводности или масс-спектрометрический почти не дают преимуществ в чувствительности. Более чувствительны амперометрический детектор и детектор, основанный на лазерной флуоресценции. Однако первый из них пригоден только для анализа электроактивных веществ, а второй очень дорого стоит.

Спектрофотометрический детектор конструктивно отличается от такового в обычных спектральных приборах. Луч света должен быть сильно сфокусирован на капилляр,

что необходимо для устранения рассеянного излучения и увеличения интенсивности падающего света. Малая длина оптического пути ("толщины поглощающего слоя") – главный фактор, ограничивающий чувствительность метода. Особенности конструкции вызывают существенные отклонения от закона Бугера – Ламберта – Бера, приводящие к тому, что линейность градуировочного графика наблюдается в очень узком диапазоне концентраций. Особой бедой в этом нет, но пользование *методом добавок* становится невозможным, а для построения *градуировочного графика* необходимо исследовать большое число стандартных растворов.

Измеряемым параметром для построения градуировочного графика является, как и в хроматографии, *площадь пика*. На ее воспроизводимость влияют различные факторы – температура, загрязнение образца, его испарение, адсорбция стенками, различные инструментальные причины.

В целом можно считать, что на данный момент капиллярный электрофорез является быстро развивающимся методом. Диапазон его возможностей широк, и сдерживающим фактором является лишь дороговизна приборов и их малое количество.

### Вопросы для самоконтроля

1. Обоснование выбора метода исследований.
2. Погрешности при использовании классических методов исследования.
3. Этапы проведения анализа.
4. Чувствительность различных методов исследования.
5. Наиболее распространенные классические методы исследования биологических объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003,

493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 12

### Атомно-адсорбционная и атомно-эмиссионная виды спектрометрии

Если поток электромагнитного излучения направить на химическую пробу, то возможно, что проба будет поглощать какую-то часть этого излучения. При этом химические частицы (атомы, молекулы, ионы) будут переходить в возбужденное состояние. Поскольку частица может находиться лишь в нескольких дискретных (определенных) состояниях, очевидно, поглощение излучения может наблюдаться только в том случае, если падающее излучение содержит в себе кванты, обладающие энергией, в точности равной разности энергий возможных состояний частицы. При этом, наблюдая, какое излучение поглощается, можно установить природу частиц, а насколько падает его интенсивность – количество частиц в пробе.

Частица, перешедшая в возбужденное состояние, не может находиться в нем продолжительное время. Она должна возвратиться в исходное состояние, освободившись от поглощенной энергии. Эта энергия может передаваться другим частицам, превращаться в другие формы энергии (тепловую, электрическую) или испускаться в виде электромагнитного излучения. Процесс, при котором частица теряет поглощенную энергию в форме излучения, называют в общем случае люминесценцией. Падающее и прошедшее излучения являются направленными, люминесценция же имеет равную вероятность распространения в любом направлении. При этом частота излучаемого света характеризует природу частиц, а его интенсивность – концентрацию.

Частицы в пробе можно возбудить не только с помощью электромагнитного излучения. Для возбуждения частиц до более высоких энергетических состояний могут быть применены термическая, химическая и другие нерадиационные формы энергии. Если возбужденное состояние "деактивируется" с испусканием электромагнитного излучения, такой процесс называют испускательным или эмиссионным. Эмиссионные методы широко используются в спектрохимическом анализе. Как можно заметить, люминесценция представляет собой особый вид испускания.

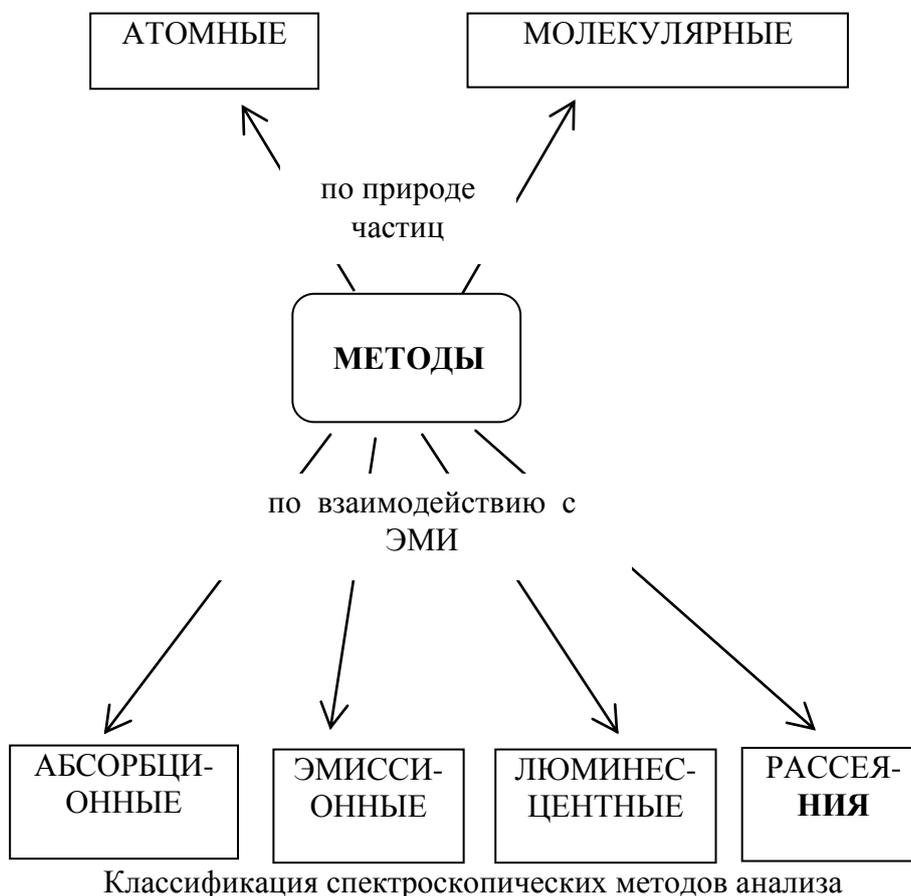
В отличие от процессов поглощения, испускания и люминесценции, рассеяние излучения не связано с переходами между квантованными состояниями атома или молекулы. В процессах рассеяния света основное значение имеет поляризуемость частицы под влиянием падающего излучения, в результате чего возникает осциллирующий диполь, распространяющий свою энергию по всем направлениям.

Результат любого из рассмотренных процессов может быть представлен в виде электромагнитного спектра – кривой, по оси абсцисс которой отложена одна из величин, характеризующих энергию квантов, а по оси ординат – интенсивность излучения (либо какая-то производная от нее величина). Спектр может быть непрерывным и дискретным.

Ограничений для частоты используемого в спектроскопических методах анализа электромагнитного излучения практически не существует. Применяют все виды излучения (от гамма-лучей до радиоволн), и принципы анализа в этом огромном интервале длин волн практически неизменны. Различается лишь природа взаимодействий, а следовательно, и характер получаемой информации, а также техника проведения анализа. Одна из классификаций спектроскопических методов анализа как раз и состоит в указании используемого диапазона длин волн.

В одних методах используют поглощение (или испускание, рассеяние и т.д.) энергии *атомами*, в других происходит взаимодействие электромагнитного излучения

сразу со всей *молекулой* вещества. Деление спектроскопических методов на атомные и молекулярные принципиально: в атомной спектроскопии имеют дело с узкими линейчатыми спектрами, в молекулярной – с широкими полосатыми. Очевидно, от того, атомные или молекулярные спектры исследуются, зависит и характер получаемой информации. Обычно спектроскопические методы анализа классифицируют двояко.



Так, имеются атомно-абсорбционные, молекулярно-абсорбционные, молекулярно-люминесцентные и т.д. методы, причем каждая группа может включать в себя несколько методов анализа. Часто в названии метода указывают и используемый диапазон электромагнитного спектра.

Нельзя сказать, что все группы одинаково применимы. Так, металлы и их сплавы часто анализируют методом атомной эмиссионной спектроскопии. Для этого объект анализа подвергают высокотемпературному возбуждению (нагревают до нескольких тысяч градусов). Понятно, что аналогичное воздействие на большинство сложных молекул (в особенности, органических веществ) приведет к распаду их на отдельные атомы, и о строении вещества судить будет сложно: получаемая информация будет ограничена элементарным составом анализируемого объекта. С другой стороны, как вы узнаете позже, не каждое вещество взаимодействует с любым видом излучения.

В каждой области деятельности более важны те или другие методы анализа.

### **Атомно-эмиссионная спектроскопия**

Методы атомной спектроскопии отличаются высокой избирательностью, исключительной чувствительностью и экспрессностью. Этими методами определяют до 70 эле-

ментов. Чувствительность обычно лежит в интервале от  $10^{-4}$  до  $10^{-8}$  масс. %. Однако диапазон определяемых содержаний невелик и редко превышает один порядок концентрации.

Атомно-эмиссионная спектроскопия основана на испускании квантов электромагнитного излучения возбужденными атомами. Т.о., общий ход процесса укладывается в схему:  $A + E \rightarrow A^* \rightarrow A + h\nu$ ,

где  $A$  – атом элемента,  $A^*$  - возбужденный атом,  $E$  – энергия, поглощаемая атомом,  $h\nu$  - испускаемый квант света.

При поглощении атомом энергии 100 - 600 кДж/моль внешний электрон переходит на один из более высоких энергетических уровней и примерно через  $10^{-8}$  с возвращается на основной (или какой-то другой) уровень. При этом энергия выделяется либо в виде кванта света определенной частоты, либо теряется в виде теплоты при столкновениях с другими частицами.

В атоме возможны только электронные переходы. Разность энергий электронных уровней достаточно велика, поэтому спектр атома состоит из отдельных линий. Поскольку число возможных электронных переходов значительно, эмиссионный спектр атома состоит из множества спектральных линий различной интенсивности.

*Интенсивность линии зависит от количества атомов, в которых осуществляется соответствующий переход*, т.е. от количества атомов в пробе и от вероятности соответствующего перехода. Наиболее вероятны переходы с возбужденного уровня, ближайшего к основному. Спектральные линии, соответствующие такому переходу, называют *резонансными*. Они обладают наибольшей интенсивностью, их чаще всего используют в анализе.

В атомной спектроскопии вещество перед измерением надо атомизировать. При атомизации одновременно происходит и возбуждение атомов. Важнейшей характеристикой любого атомизатора является температура, от которой, в конечном счете, зависят метрологические характеристики анализа.

Атомизаторы бывают пламенные и непламенные. В соответствии с этим различают несколько вариантов метода.

### **Эмиссионная фотометрия пламени**

Эмиссионная фотометрия пламени применяется в основном для *количественного анализа легковозбудимых атомов*. Метод основан на измерении интенсивности излучения, испускаемого атомами, возбуждаемыми в пламени. Использование пламени оказалось более удобным в практическом отношении, чем использование других источников энергии. Оно образуется при сгорании различных органических веществ и имеет сравнительно невысокую температуру ( $1500-3000^{\circ}\text{C}$ ). Ее достаточно для получения резонансных линий наиболее легковозбудимых атомов (в основном щелочных или щелочноземельных металлов). Анализируемый раствор непосредственно вводят в пламя горелки.

То, что спектр содержит в основном резонансные линии и не содержит лишней информации, является несомненным достоинством метода. Кроме того, достоинствами пламени являются его стабильность, простота конструкций горелок, малая степень ионизации атомов. Недостатки – наличие фонового излучения (пламя само "светится"), небольшой процент возбуждаемых атомов (из-за невысокой температуры). Стабильность пламени приводит к высокой воспроизводимости результатов анализа ( $s_r \approx 0,01 - 0,05$ ).

В пламени происходят следующие процессы:

- испарение растворителя;
- испарение твердых частиц с образованием атомного пара;
- диссоциация молекул на атомы;
- частичная ионизация;
- возбуждение атомов;
- возвращение атомов в исходное состояние с испусканием света.

Интенсивность излучения пропорциональна концентрации атомов в пламени, а следовательно, и в исходном растворе:  $I = K \cdot C$ . Однако на коэффициент пропорциональности могут повлиять самопоглощение, ионизация, образование нелетучих соединений, инструментальные причины и др. Поэтому при количественном анализе метод требует наличия *эталонов*, т.е. стандартных растворов определяемых веществ.

В практическом отношении отдают предпочтение методу градуировочного графика (зависимость показаний шкалы прибора от концентрации). При анализе объектов сложного состава обычно используют метод добавок.

Особое значение метод фотометрии пламени имеет для определения микроколичеств элементов с низкими потенциалами возбуждения, т.е. в первую очередь щелочных и щелочноземельных металлов. Для них предел обнаружения составляет 0,001 – 1 мкг/мл. Основными ограничениями метода являются необходимость переведения пробы в раствор, сильное влияние матричных элементов и обычно одноэлементность анализа.

### **Непламенные варианты атомно-эмиссионной спектроскопии**

Если температуры пламени недостаточно для возбуждения атомов, используют дуговые и искровые электротермические источники. Дуговая и искровая эмиссионная спектроскопия применяются в основном для целей качественного анализа. Количественный анализ также возможен, но не обладает высокой точностью. Это связано с нестабильностью работы непламенных атомизаторов. Самый современный источник атомизации – индуктивно связанная плазма – обладает наилучшими аналитическими возможностями, но применяется редко из-за очень высокой стоимости оборудования.

Дугу получают при пропускании тока 1-30 А при напряжении 200 В, искру – при напряжении до 40 кВ. Электроды чаще всего используют графитовые. В углубление одного из них помещают пробу, обычно твердую. Если исследуемый материал – металл, он сам может выступать в качестве одного из электродов. В пространстве между электродами при разряде образуется плазма, состоящая из атомов, ионов и электронов с температурой до 7000 К в дуге и до 10000 К в искре. При этом в атомах и ионах осуществляется большое число энергетических переходов, поэтому эмиссионные спектры состоят из множества линий. В таких источниках можно возбудить практически все элементы. Трудности возникают лишь в случае некоторых неметаллов, характеризующихся высокими потенциалами возбуждения.

Излучение воспринимают визуально, регистрируют на фотопластинке или преобразуют в электрический сигнал с помощью фотоэлементов или фотоумножителей.

Качественный анализ проводят, сравнивая полученные спектры со спектрами элементов, приводимыми в специальных атласах. Для качественного элементного анализа метод, пожалуй, не имеет равных: он высокоспецифичен, не требует предварительной обработки вещества, позволяет при кратковременном облучении нескольких миллиграммов образца обнаружить до 70 элементов.

Задача качественного спектрального анализа состоит в отыскании линий нужного элемента в спектре пробы. Принадлежность линии данному элементу устанавливают по *длине волны и интенсивности линии*. Но, поскольку число линий может быть очень велико, нет необходимости обрабатывать каждую из них. Необходимо установить наличие или отсутствие нескольких так называемых *аналитических (последних)* линий. Последними они называются потому, что являются наиболее интенсивными и сохраняются в спектре даже тогда, когда при сильном разбавлении пробы большинство линий не проявляется. Отсутствие последней линии гарантирует отсутствие и других, т.е. отсутствие данного элемента в пробе.

Количественный анализ основан на зависимости интенсивности спектральной линии от концентрации вещества в пробе. При высоких температурах на аналитическом сигнале резко сказывается самопоглощение излучения пробой. Степень самопоглощения возрастает с увеличением концентрации атомного пара, поэтому интенсивность свечения зависит от концентрации нелинейно. Наиболее удовлетворительно градуировочная функция описывается эмпирической формулой Ломакина – Шайбе:

$$I = a \cdot c^b,$$

где  $a$  и  $b$  – коэффициенты, зависящие от условий опыта.

Для построения градуировочного графика удобно переписать это уравнение в логарифмической форме:

$$\lg I = \lg a + b \lg c = \text{const} + b \lg c$$

и строить графики в координатах зависимости аналитического сигнала (логарифма интенсивности) от логарифма концентрации.

На одной и той же пластинке снимают спектр исследуемого образца и спектры не менее трех эталонов. Эталоны должны быть как можно ближе по составу к анализируемому образцу. Для повышения воспроизводимости почти никогда не измеряют абсолютное значение сигнала, а пользуются *разностью* между интенсивностями линии определяемого элемента и линии *элемента сравнения*. Для этого обычно используют т.н. внутренние стандарты. Внутренний стандарт представляет собой компонент, содержание которого во всех исследуемых образцах одинаково. Это может быть компонент основы (например, железо – при анализе сталей) или специально вводимое вещество. Две сравниваемые линии называют *гомологической парой*. Полученный таким образом график пригоден только для данной фотоэлемента (или данного фотоэлемента).

Значение эмиссионной спектроскопии для количественного анализа ограничено трудностями воспроизведения интенсивности излучения. Обычно погрешность ДОС-тигает 10-20 и более %. Поэтому при определении основы этот метод не применяют. Однако при анализе следов, где точность анализа обычно не является решающим показателем, метод эмиссионной спектроскопии используют часто, в основном благодаря его высокой чувствительности и экспрессности.

### **Классификация методов абсорбционной спектроскопии**

Характер спектра поглощения определяется природой, агрегатным состоянием и окружением поглощающих веществ. Различают спектры, связанные с поглощением электромагнитного излучения атомами, и спектры, возникающие при поглощении излучения молекулами. Соответственно различают методы *атомной и молекулярной абсорбционной спектроскопии*.

Вероятно, молекулярная абсорбционная спектроскопия нашла более широкое применение, чем атомная. Это связано с гораздо большими возможностями, реализуемыми при интерпретации молекулярных спектров поглощения.

Система, содержащая атомы лишь одного типа, поглощает сравнительно немного частот электромагнитного излучения, при этом энергии видимого и ультрафиолетового излучений достаточно лишь для того, чтобы вызвать переходы внешних (валентных) электронов. Рентгеновское излучение, обладающее гораздо большей энергией, способно к взаимодействию с электронами, расположенными ближе к ядру. Поскольку внутренние электроны не участвуют в образовании химических связей, спектр поглощения рентгеновского излучения не зависит от природы химического соединения, в которое входит рассматриваемый атом. Более жесткое гамма-излучение способно к взаимодействию с ядром, приводящему к превращению в другие элементы. Поэтому методы анализа, связанные с использованием гамма-излучения, часто относят к группе радиохимических методов.

Поглощение излучения многоатомными молекулами, особенно в жидком и твердом состоянии, представляет собой значительно более сложный процесс, поскольку число возможных энергетических состояний при объединении атомов в молекулу сильно возрастает. Соответственно и число видов электромагнитного излучения, которые могут быть использованы в абсорбционной спектроскопии, в случае молекул больше. Так, инфракрасное излучение может вызвать изменение колебательного состояния атомов в молекуле, а СВЧ-излучение влияет на вращение молекулы как целого.

Поскольку некоторые виды излучения взаимодействуют и с атомами, и с молекулами, а другие – только с молекулами или с атомами независимо от их ближайшего окружения, трудно дать четкую классификацию всех имеющихся методов абсорбционной спектроскопии. К сожалению, в связи с этим бывает и трудно разобраться в терминологии, предлагаемой авторами различных книг и монографий по спектроскопическому анализу. Все же, вероятно, удобнее разбить методы абсорбционной спектроскопии по природе используемого излучения.

В любом из этих методов аналитический сигнал несет информацию и о качественном, и о количественном составе образца. Однако каждый из них обладает преимуществами в той или иной области анализа.

Для проведения количественного анализа в абсорбционной спектроскопии необходимо измерение мощности излучения, прошедшего через образец, и знание количественных законов поглощения. Основные положения и законы абсорбции излучения справедливы для всех областей спектра – от рентгеновского до радиоизлучения.

#### Методы абсорбционной спектроскопии

Излучение	Переходы	Метод	Основное назначение
Гамма-	ядерные частицы	активационный анализ	определение примесей
Рентгеновское	внутренние электроны	рентгеновская спектроскопия	анализ твердых веществ
УФ-, видимое	внешние электроны	спектрофотометрия, ААС	количественный анализ растворов
Инфракрасное	молекулярные колебания	ИК-спектроскопия	идентификация орг. веществ
СВЧ-	молекулярное вращение	микроволновая спектроскопия	анализ газов

Радиоволны (+ магнитное поле)	ядерно-спиновые	ядерно-магнитный резонанс	исследование строения орг. веществ
-------------------------------	-----------------	---------------------------	------------------------------------

Мощность электромагнитной волны квантована, поскольку ее можно рассматривать как поток фотонов. Следовательно, рассматривая прохождение электромагнитного излучения через кювету с веществом, можно утверждать, что степень поглощения зависит от числа столкновений между фотонами и способными их поглощать частицами. Очевидно, эта степень должна зависеть от мощности падающего излучения (т.е. числа фотонов) и от концентрации частиц пробы. Эти соотношения отражены в объединенном законе Бугера – Ламберта – Бера.

### Атомно-абсорбционная спектроскопия

*Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС), предложенная в 1955 г., основана на поглощении электромагнитного излучения видимого и УФ-диапазона свободными атомами, находящимися в газовой фазе. При этом атомы из нижнего (невозбужденного) состояния переходят в возбужденное, а интенсивность излучения уменьшается. Таким образом, если в атомно-эмиссионной спектроскопии аналитический сигнал пропорционален числу возбужденных атомов, то в атомно-абсорбционной спектроскопии он пропорционален числу невозбужденных атомов.*

Следует хорошо понимать, что, как и в условиях атомно-эмиссионного анализа, атомы, возбуждись, могут испускать электромагнитное излучение. Этот процесс не должен интересовать аналитика; более того, он может помешать при анализе.

Предварительно необходимо перевести пробу в атомарное состояние (атомизировать), а затем измерить ослабление интенсивности излучения, прошедшего через поглощающую среду. Такие измерения проводят в условиях, когда выполняется закон Бугера – Ламберта – Бера. При этом величину  $\lg I_0/I_1$  называют атомным поглощением, но она полностью аналогична оптической плотности.

Поскольку в ААС аналитический сигнал получают от невозбужденных атомов, для атомизации подходят лишь такие источники, энергии которых хватает для распада молекул на атомы, но не для возбуждения последних. Этим требованиям удовлетворяют пламенные и непламенные атомизаторы, в которых используется тепловая энергия. Перед атомизацией объект анализа обычно переводят в раствор.

Пламенные атомизаторы – горелки, с использованием в качестве горючей смеси обычно смесей воздуха с ацетиленом или оксида азота (I) с ацетиленом. Пламя в атомно-абсорбционном анализе выполняет функцию не только атомизатора, но и кюветы. Исходя из закона светопоглощения, чем больше длина используемого пламени, тем выше чувствительность метода. Поэтому разработаны специальные щелевые горелки, обеспечивающие длину поглощающего слоя до 10 см. Для определения элементов, легко переходящих в атомное состояние (медь, свинец, цинк, кадмий) может быть использовано даже низкотемпературное воздушно-газовое пламя. С другой стороны, многие элементы (алюминий, бериллий, РЗЭ) не могут быть проанализированы даже в высокотемпературном пламени, и для их определения сконструированы непламенные атомизаторы.

Электротермические атомизаторы – высокотемпературные печи специальной конструкции с температурой до 3000<sup>0</sup>С. Их основная деталь – графитовая кювета, нагреваемая при помощи электрического тока большой силы (до 50 А) при низком напряжении. Применение графитовых кювет позволяет снизить пределы обнаружения почти всех элементов, что ставит атомно-абсорбционный анализ в ряд наиболее чувствительных методов. При этом имеется возможность анализа проб очень малого

объема (до 1 мкл), а также твердых веществ без перевода их в раствор. Расширяется спектральный диапазон измерений в область УФ-лучей, что невозможно в пламени из-за поглощения кислорода.

Итак, на атомы, переведенные тем или иным образом в парообразное состояние, теперь надо направить поток электромагнитного излучения подходящей длины волны и посмотреть, что с ним будет после прохождения пламени или кюветы с образцом. Линии поглощения атомов в пламени или графитовой кювете очень узки – около 0,001 нм, тогда как самые лучшие монохроматоры позволяют выделить из спектра участок не менее 0,1 нм. Казалось бы, в этом нет ничего страшного: атомы сами "выберут" то излучение, которое могут поглотить, и останется только зафиксировать долю поглощенного излучения. Однако на практике использование обычных источников непрерывного спектра с монохроматором непригодно. Дело в том, что при этом атомы поглотят столь малую долю падающего излучения, что детектор не уловит разницу между падающим и прошедшим через образец излучением. Следовательно, чтобы поглощение атомами было заметно, нужно направлять на пробу излучение практически монохроматичное.

Строгие требования к энергии квантов и полуширине линии лучше всего удовлетворяются, если использовать в приборе в качестве источника света характеристическое излучение атомов исследуемого элемента. Чаще всего для этого применяют лампы с полым катодом, изготовленным как раз из того металла, который собираются определять. В этой лампе между инертным электродом (анодом) и вторым электродом (катодом), сделанным из определяемого элемента, возникает электрический разряд малой мощности. Атомы катода возбуждаются, давая очень чистый линейчатый спектр определяемого элемента. Такая лампа испускает линейчатый спектр таких длин волн, которые может поглотить образец, и роль селектора частоты, помещаемого после лампы, сводится лишь к тому, чтобы из набора линий выделить одну, поглощение которой необходимо измерить. Очевидно, для определения каждого металла нужна своя лампа, что делает анализ, с одной стороны, не очень универсальным, но с другой – довольно избирательным. Конечно, можно изготовить катод из сплава нескольких металлов. Но в связи с тем, что могут иметь место влияния, оказываемые друг на друга различными элементами, лампы, испускающие одновременно спектры более чем трех элементов, не выпускают.

Лучшим источником монохроматического излучения для ААС является, несомненно, лазер, перестраиваемый по частоте. В настоящее время существует большое число таких лазеров на полупроводниках, но проблема точного установления требуемой длины волны и высокая стоимость таких источников сдерживают пока их широкое применение в атомно-абсорбционном анализе.

При стабильной работе источника излучения, атомизатора и детектора сигнал прямо пропорционален концентрации определяемого компонента, что позволяет использовать для определения концентрации как метод градуировочного графика, так и метод добавок. Помехи аналогичны таковым в эмиссионных методах.

Атомно-абсорбционная спектроскопия – высокочувствительный метод определения более 60 металлов и некоторых неметаллов. Трудности в анализе неметаллов состоят в том, что их резонансные линии лежат в основном в области дальнего ультрафиолета.

Для некоторых элементов пределы обнаружения в непламенном варианте ААС составляют  $5 \cdot 10^{-5}$  –  $1 \cdot 10^{-3}$  мкг/мл (т.е. до  $10^{-9}$  моль/л). А поскольку объем необходимой пробы невелик, метод часто позволяет проанализировать до  $10^{-14}$  г вещества. Предварительная обработка образцов сводится к минимуму, а заключительные

процедуры просты и не требуют длительного времени. В связи с этим важным достоинством метода является не только высокая избирательность, но и экспрессность. В некоторых случаях целесообразно предварительно выделить определяемый компонент. Для этой цели очень подходит экстракция, поскольку применение органических растворителей может увеличить чувствительность определений в несколько раз. Воспроизводимость ААС 1-5 %. Недостатки метода – трудность осуществления многоэлементного анализа и небольшой интервал линейности градуировочного графика (максимум 2-3 порядка).

Атомно-абсорбционная спектроскопия используется главным образом для определения примесных составляющих. Единственное ограничение по отношению к типу исследуемых образцов состоит в том, что они должны растворяться с образованием водных или неводных растворов. Число элементов, которые можно определить этим методом, ограничивается наличием подходящего источника излучения и возможностью создания атомного пара. Метод применяется при анализе вод, вытяжек из почвы, биологических веществ, удобрений, нефти, стали, сплавов и различных других материалов. В целом правильно будет сказать, что методы атомно-абсорбционного и атомно-эмиссионного анализа органично дополняют друг друга.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Основы атомно-абсорбционной спектрометрии.
2. Основы атомно-эмиссионной спектрометрии.
3. Классификация методов абсорбционной спектроскопии.
4. Непламенные варианты атомно-эмиссионной спектроскопии.
5. Эмиссионная фотометрия пламени

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3

2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 13

### Обработка экспериментальных данных

#### Классификация погрешностей анализа

Существует несколько различных подходов к классификации погрешностей анализа, основанных на рассмотрении различных аспектов этого понятия.

1. По способу представления погрешности принято делить на **абсолютные** ( $\Delta$ ) и **относительные** ( $\delta$ ):

$$\Delta = \bar{x} - x_{ист},$$
$$\delta, \% = \frac{|\Delta|}{x_{ист}} \cdot 100\%,$$

где  $\bar{x}$  - среднее арифметическое из серии полученных результатов,  
 $x_{ист}$  - истинное значение.

Сразу заметим, что величиной  $x$  может быть как результат анализа (содержание компонента), так и сам аналитический сигнал.

2. В зависимости от знака погрешности делят на **положительные** и **отрицательные**.

3. По типу связи между погрешностью и измеряемой величиной различают **постоянные** (абсолютная погрешность не зависит от измеряемой величины) и **пропорциональные** погрешности (их значение пропорционально измеряемой величине).

4. По источникам происхождения погрешности подразделяют на **инструментальные, реактивные, методические, погрешности пробоотбора** и т.п.

5. В зависимости от характера причин, которые их вызывают, различают **случайные, систематические и грубые** погрешности. На этой, наиболее важной, классификации остановимся более подробно.

**Систематические** погрешности – это погрешности, величину которых если не на практике, то в принципе, можно измерить и учесть, поскольку обычно они обусловлены известными причинами. Эти причины многообразны. Так, *индивидуальные* погрешности связаны с низкой квалификацией или физическими недостатками аналитика. *Инструментальные* – с несовершенством приборов. Погрешности *методические* – с отклонением поведения процесса от идеального: малая скорость реакции, неполнота ее протекания, побочные реакции и т.д. Методические погрешности особенно трудно обнаружить: часто для этого необходимо проведение продолжительных дополнительных экспериментов. Поскольку систематическая погрешность вызвана постоянно действующей причиной, она имеет постоянный знак (положительна или отрицательна) и влияет на правильность получаемого результата. К счастью, оптимизацией хода анализа ее можно свести к минимуму или устранить совсем.

**Случайные** погрешности – это погрешности, проявляющиеся в результате многократных повторных измерений. Происхождение их неизвестно, а знак и величина колеблются. Это погрешности, связанные с колебаниями температуры, давления, влажности воздуха, различным положением глаза во время измерения объема и других величин, случайными колебаниями в полноте опорожнения посуды и т.д. Случайная погрешность влияет на воспроизводимость измерений, она не может быть измерена, но может быть статистически оценена.

**Грубые** погрешности (**промахи**) – это явные огрехи анализа, допущенные из-за небрежности или заведомой некомпетентности аналитика: рассыпание образца,

неверный подсчет разновесок, неумение пользоваться аппаратурой и т.д. Промах резко искажает результат анализа и обычно легко обнаруживается.

### **Оценка воспроизводимости результатов измерений**

Напомним, что под *воспроизводимостью* понимается рассеяние результатов измерений вокруг среднего значения. Основными критериями воспроизводимости служат размах варьирования, дисперсия, стандартное отклонение, доверительный интервал.

Пусть в серии параллельных измерений получены следующие результаты:  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ . **Размах варьирования** оценивается как разность между максимальным и минимальным значениями:

$$W = x_{max} - x_{min}$$

Это – не очень надежная величина, но иногда она бывает достаточно наглядна.

Для расчета **дисперсии** (среднеквадратичной дисперсии) существует следующая формула:

$$V \equiv s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1},$$

где  $x_i$  – результат единичного определения,  $\bar{x}$  – среднее арифметическое из серии полученных результатов,  $n$  – число измерений в серии.

Чем ближе результаты измерений друг к другу, тем меньше величина дисперсии.

Более наглядна величина **стандартного отклонения**, поскольку оно имеет те же единицы измерения, что и сама рассматриваемая величина:

$$s = \sqrt{V}$$

Воспроизводимость измерений часто выражают через **относительное стандартное отклонение**:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}$$

Это достаточно наглядная величина. В обычных случаях не слишком сложных анализов  $s_r$ , как правило, не превышает 0,01 – 0,04 (или 1 – 4 %). Считается, что если  $s_r > 0,33$ , метод анализа (или методика) для количественных определений в данных условиях неприменим.

Все названные величины достаточно сложны для восприятия, в особенности при первичном знакомстве. Рассмотрим в упрощенной форме материал, который позволит нам разобраться с понятием "**доверительный интервал**". Дело в том, что даже при отсутствии систематической погрешности конечный результат анализа не может быть выражен просто как среднее арифметическое из серии параллельных определений, поскольку оно приближается к истинному значению только при условии выполнения очень большого числа измерений (по крайней мере, больше 20). В обычной аналитической практике нет возможности выполнить столь большой эксперимент. А ведь понятно, что среднее арифметическое из серии, например, 3-х определений, скорее всего, будет отличаться от такового после 4-х или 5 проведенных измерений. Поэтому результат анализа представляют в виде некоего интервала возможных значений.

**Под доверительным интервалом** понимают интервал значений измеряемой величины, внутри которого, при отсутствии систематической погрешности, можно с заданной доверительной вероятностью ожидать нахождения истинного значения этой величины.

Построение доверительного интервала основывается на законах математической статистики и обусловлено тем, что рассеяние результатов химического анализа подчиняется закону **нормального (гауссовского) распределения**. График зависимости вероятности получения той или иной погрешности от величины самой этой погрешности имеет вид симметричной колоколообразной кривой.

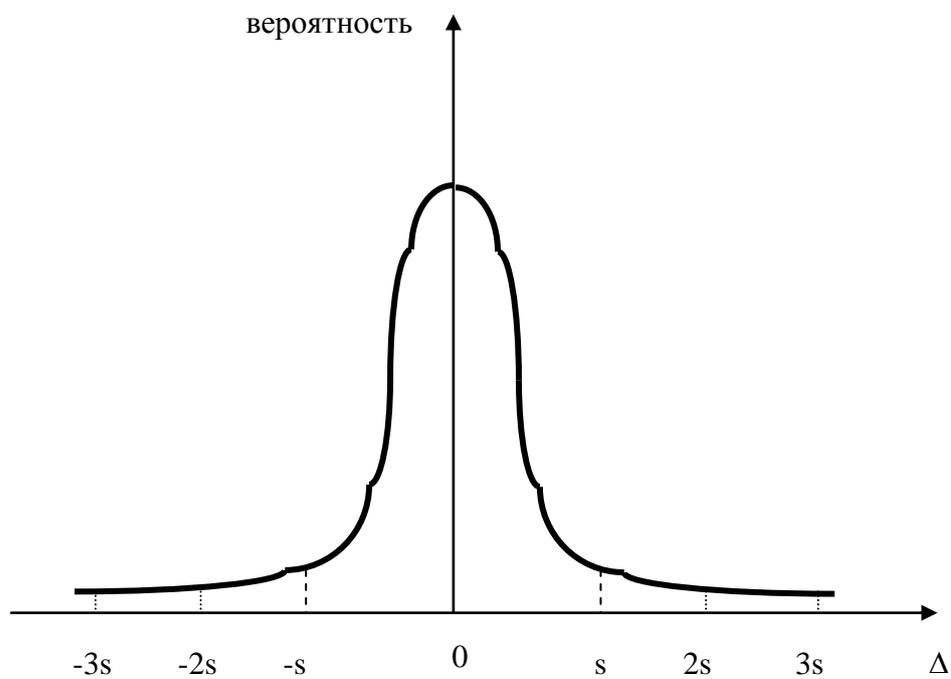


График нормального распределения

Из рассмотрения этого графика можно сделать некоторые качественные выводы.

1. Равновероятны как положительные, так и отрицательные отклонения получаемого результата от среднего арифметического.

2. Наиболее вероятны небольшие отклонения, но имеется возможность получения абсолютно любого результата: кривая не пересекается с осью абсцисс.

3. Вероятность получения явно абсурдных результатов ничтожна.

Для количественной оценки наших выводов отметим следующее. Показано, что результаты около 95 % измерений укладываются в диапазон от  $x_{уст} - 2s$  до  $x_{уст} + 2s$ . А около 99 % - в диапазон от  $x_{уст} - 3s$  до  $x_{уст} + 3s$ . Это означает, что примерно один раз из ста получается результат, резко (более чем на три стандартных отклонения) отличающийся от истинного значения. Скорее всего, этому результату не стоит доверять. Кстати, признак отклонения единичного результата за пределы  $3s$  часто используют для выбраковки данных, называя его "трехсигмовым критерием". Результат, отличающийся от истинного на  $2s$ , встречается около 5 раз из ста. Следовательно, с вероятностью 95 или 99 % можно утверждать, что истинный результат находится внутри некоторого интервала, достаточно легко рассчитываемого. Как правило, именно величиной в 95 или 99 % надежности и озадачивает себя химик-аналитик при получении конечного результата анализа. Понятно, что, если от результата зависит жизнь или здоровье человека, эту цифру стоит взять побольше (99 или даже 99,9%), в обычных же случаях ограничиваются величиной в 95 %.

Вероятность, с которой мы утверждаем, что истинное значение попадает в представленный нами интервал, называется доверительной вероятностью (P). Итак, обычно принимают  $P = 0,95$ .

В реальных анализах получают не очень много параллельных результатов (явно меньше 20), и в этих условиях закон нормального распределения работает не вполне корректно. Здесь значения подчиняются так называемому t-распределению (распределению Стьюдента). Поэтому доверительный интервал рассчитывается не совсем так, как следует из рисунка. Доверительный интервал описывается границами  $[\bar{x} \pm \varepsilon]$ , где

$$\varepsilon = \frac{t_{P,n} \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Здесь  $t$  – так называемый критерий Стьюдента (табличная величина). Его величина зависит как от заданной доверительной вероятности, так и от числа измерений. С увеличением доверительной вероятности его величина растет (следовательно, доверительный интервал становится шире). С ростом числа измерений величина  $t$  снижается.

Таким образом, при заданной доверительной вероятности для сужения доверительного интервала мы должны увеличивать число измерений или выбрать другой метод анализа, обладающий лучшей воспроизводимостью.

Рассмотрим конкретный пример.

Пусть при анализе неизвестного образца получено 5 параллельных значений измеряемой величины (например, массы компонента в мг): 20,0; 20,2; 20,4; 20,2; 20,7. Расчет среднего арифметического дает цифру 20,34. Расчет по приведенным выше формулам дает:  $s = 0,264$ . В таблице найдем коэффициент Стьюдента для  $n = 5$  и  $P = 0,95$ :  $t = 2,78$ . Таким образом,

$$\varepsilon = \frac{t_{P,n} \cdot s}{\sqrt{n}} = \frac{2,78 \cdot 0,264}{\sqrt{5}} = 0,328$$

и результат анализа надо было бы записать как  $20,34 \pm 0,328$ . Однако нельзя забывать о количестве значащих цифр. Вас уже обучали этому в курсе физики, и, если этот материал не освоен, следует изучить его самостоятельно. Поскольку все единичные результаты были даны с тремя значащими цифрами, конечный результат анализа должен быть записан следующим образом:

$$x = 20,3 \pm 0,3 \text{ при } P = 0,95 \text{ для } n = 5$$

Именно такая форма записи показывает, что после проведения 5 параллельных определений вы утверждаете, что содержание определяемого компонента находится в интервале от 20,0 до 20,6 (мг).

Однако среди полученных результатов есть и "подозрительный" – 20,7. Возможно, это промах. Наиболее надежный прием обнаружения промахов состоит в использовании так называемого Q-критерия. Находят отклонение выпадающего результата от ближайшего и делят его на размах варьирования:

$$Q_{\text{эсп}} = \frac{20,7 - 20,4}{20,7 - 20,0} = 0,43$$

Полученный результат сравнивают с табличным значением Q-критерия. Для  $n = 5$  и  $P = 0,90$   $Q_{\text{табл}} = 0,64$ . Поскольку экспериментальное значение меньше табличного, результат оставляют. В противном случае он является промахом, и его отбрасывают.

Методы математической статистики позволяют легко и надежно решать и другие вопросы, сопровождающие выполнение анализа.

## Оценка правильности результатов анализа

Результат анализа можно представить в виде доверительного интервала только тогда, когда точно известно, что систематическая погрешность отсутствует. Иначе результаты не будут являться *правильными*. Следовательно, необходимо проверять правильность получаемых результатов, особенно при использовании малознакомой методики или при анализе необычного объекта. Перед окончательным расчетом результата систематические погрешности должны быть выявлены и устранены.

Величину систематической погрешности можно легко измерить только тогда, когда известно истинное значение измеряемой величины. Однако чаще всего это значение неизвестно, и для подтверждения правильности результата приходится проводить ряд дополнительных экспериментов. При этом обычно нетрудно устранить индивидуальные и инструментальные погрешности, а с методическими приходится серьезно повозиться. Рассмотрим приемы проверки правильности результатов анализа.

1. Варьирование величины пробы. Чаще всего объем пробы в повторных экспериментах удваивают, но можно изменить его в любое количество раз. По изменению полученного результата можно обнаружить постоянную систематическую погрешность.

2. Анализ независимыми методами. При этом в основу второго метода должны быть получены принципиально другие физические законы. В случае совпадения результатов можно считать использование данного метода оправданным. Иногда повторяют анализ в другой лаборатории или поручают его другому аналитику, но это малонадежный прием.

3. Выполнение холостого (контрольного) опыта. Повторяют все операции анализа в отсутствие анализируемого объекта (т.е. вместо анализируемого раствора берут только растворитель и делают с ним все то же самое). Если есть, например, реактивная погрешность, связанная с недостаточной чистотой реактивов, она проявится. В таком случае результат контрольного опыта служит поправкой к основному измерению.

4. Метод "введено – найдено". К анализируемой пробе добавляют точно известное количество определяемого компонента, причем в той же форме, в какой он находится в объекте, и повторяют анализ. Если результат повторного анализа выше основного на величину введенной добавки (с допустимой точностью), анализ считают выполненным правильно.

5. Анализ стандартных образцов. Это самый надежный прием выявления систематической погрешности, а также аттестации методики анализа и проверки аналитических приборов. Стандартные образцы представляют собой материалы, состав и свойства которых надежно и официально установлены. Их выпускают всего на нескольких предприятиях и заранее многократно анализируют различными методами. Поэтому содержание компонентов, указанное в паспортных данных, можно принимать за истинное. Непременное условие применения стандартного образца при анализе – максимальная близость его состава и состава анализируемого объекта. Для проверки правильности методики с ее помощью проводят детальный анализ стандартного образца и сравнивают полученные данные с паспортными данными для этого образца. При совпадении результатов методику считают применимой, а основной результат правильным.

В настоящее время готовят **государственные стандартные образцы** (образцы 1-го разряда) для металлов, сплавов, продуктов химической промышленности, лекарственных препаратов и т.п. Применяют и образцы 2-го разряда, т.е. приготовленные в отдельных лабораториях или предприятиях, в т.ч. и самим химиком-аналитиком из

надежных реактивов. Естественно, использование таких образцов менее надежно. В целом следует сказать, что роль стандартных образцов в наше время сильно возрастает.

### Вопросы для самоконтроля

1. Классификация погрешностей анализа.
2. Размах варьирования.
3. Оценка воспроизводимости результатов измерений.
4. Оценка правильности результатов анализа
5. Оценка воспроизводимости результатов измерений

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

#### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 14

### Компьютерная обработка данных ФХМА

Большинство современных приборов управляется через компьютер. При этом к прибору прилагаются (иногда за дополнительную плату) базы данных и специализированные программы.

Базы данных хранят характеристики сотен тысяч соединений, поэтому (в отдельных случаях) можно обходиться без стандартных образцов. Особенно это характерно, для приборов, которые имеют масс-селективный детектор. Такими детекторами часто снабжены приборы для проведения газохроматографического анализа, высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза и т.д. Подобные приборы не получили широкого распространения из-за их высокой стоимости, однако их возможности чрезвычайно высоки, поэтому в ближайшие десятилетия они займут достойное место в оснащении биологических лабораторий.

Кроме того, в современных пакетах программ предлагаются инструменты для количественной обработки аналитического сигнала, которые экономят время исследователя, избавляя его от черновой работы. При этом, после получения экспериментальных данных, возможна их статистическая обработка.

Следует отметить, что точность измерения аналитического сигнала часто выше чем точность проведения эксперимента, поэтому важна работа самого исследователя, который должен нивелировать ошибки компьютера.

Часто компьютер выдает вероятность совпадения данных для исследуемого соединения и данных для соединения из базы данных в 99%, хотя это разные соединения, просто машина не учитывает ряд параметров, которые должен учитывать исследователь.

Необходимо учитывать не только характеристики самого соединения, но и характеристики примесей, присутствующих в нем.

Даже если исследуемый объект ранее был неизвестен, во многих случаях возможен теоретический расчет его характеристик (особенно спектральных данных), однако подобные программы поставляются за отдельную плату.

### Вопросы для самоконтроля

1. Пакеты программ для хроматографического анализа.
2. Пакеты программ для масс-спектрометрии.
3. Пакеты программ для ИК спектрометрии.
4. Пакеты программ для фотометрии.
5. Пакеты программ для ЯМР.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.

2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

*Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3

2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3

3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.

4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.

6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.

7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)

8. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)

9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## Лекция 15

### Комбинаторика классических и инструментальных методов исследования

Классические методы исследования биологических объектов часто совмещают с современными инструментальными методами анализа. Особенно данное явление распространено для регистрации аналитического сигнала.

Для непрерывного контроля состава растворов чаще всего используют дифференциальные рефрактометры, УФ-, спектрофотометрические, люминесцентные и кондуктометрические детекторы. В отдельных случаях используют ИК, масс-селективные и другие детекторы.

Дифференциальный рефрактометр – универсальный детектор, измеряющий показатель преломления системы. Его чувствительность относительно невысока, а диапазон линейности составляет около 4-х порядков концентрации.

УФ-детектор, настроенный на определенную длину волны, реагирует на все вещества, поглощающие при этой длине волны. Очевидно, он тем более чувствителен, чем сильнее молярные коэффициенты поглощения определяемых веществ отличаются от таковых для растворителя. Он достаточно селективен, предел обнаружения около  $10^{-9}$  г.

Кондуктометрический детектор применяют в ионной хроматографии, поскольку его работа основана на измерении электропроводности раствора, пропорциональной числу ионов.

Вольтамперометрический детектор используют для определения электроактивных веществ. Это один из самых высокочувствительных детекторов.

Следует отметить, что часто специализированный биохимический анализатор представляет собой обычный спектрометр приспособленный для отдельных видов исследований и, в значительной степени, лишенный универсальности.

### Вопросы для самоконтроля

1. Биохимические анализаторы с фотометрическими детекторами.
2. Автоматизация капиллярного электрофореза.
3. Цветные биохимические реакции и фотометрия.
4. Повышение чувствительности биохимических методов при помощи ФХМА.
5. Применение современных ФХМА в виде детекторов в классических методах анализа.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

#### *Основная литература*

1. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
2. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4

### *Дополнительная литература*

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
4. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
5. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
6. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
7. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
8. Сайт о химии – [www.ximuk.ru](http://www.ximuk.ru)
9. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аналитическая химия. Проблемы и подходы /ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 1. – М: МИР, 2004. – 608 с. – ISBN 5-03-003560-5, ISBN 3-527-28881-3
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks.
3. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / ред: Р. Кельнер Ж.-М. Мерме, М. Отто, Г.М. Видмер. Том 2. – М: МИР, 2004, 625 С. – ISBN 5-03-003599-1, ISBN 3-527-28881-3
4. Основы аналитической химии: в 2 т. Т. 1 / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – ISBN 978-5-7695-5821-4
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002.
6. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова.– 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9
7. Лебедев А. Т. Масс-спектрометрия в органической химии. – М: «Бином», 2003, 493 С. – ISBN 5-94774-052-4.
8. Основы аналитической химии: учебник; в 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева ; ред. Ю. А. Золотов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ВШ, 2000. – 494 с. – ISBN 5-06-003559-X.
9. Он-лайн учебник по биохимии – [www.Biochemistry.ru](http://www.Biochemistry.ru)
10. Сайт о химии – [www.xumuk.ru](http://www.xumuk.ru)
11. Электронная библиотека СГАУ – <http://library.sgau.ru>

## СОДЕРЖАНИЕ

Лекция 1. Классические методы исследования биологических объектов.....	3
Лекция 2. Пробоотбор и пробоподготовка.....	6
Лекция 3. Молекулярно-генетические методы исследования в биохимии.....	9
Лекция 4. Хроматографические методы анализа .....	15
Лекция 5. Тонкослойная и колоночная хроматографии.....	18
Лекция 6. Газовая хроматография.....	21
Лекция 7. Подбор условий хроматографии.....	24
Лекция 8. Детекторы в хроматографическом методе анализа.....	26
Лекция 9. Метод ВЭЖХ.....	31
Лекция 10. Спектральные методы исследования в биохимии.....	33
Лекция 11. Капиллярный электрофорез.....	40
Лекция 12. Атомно-адсорбционная и атомно-эмиссионная виды спектрометрии.....	45
Лекция 13. Обработка экспериментальных данных.....	55
Лекция 14. Компьютерная обработка данных ФХМА.....	61
Лекция 15. Комбинаторика классических и инструментальных методов исследования.....	63
Библиографический список.....	65
Содержание.....	67