

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ю.П. Фролов

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ БИОХИМИИ

Издательство «Самарский университет»
2003

УДК 541.1 : 577.1 : 577.3 : 578.088
ББК 28.072
Ф 911

Фролов Ю.П. Современные методы биохимии. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2003. 412 с.

ISBN 5-86465-243-1

Книга содержит описание теоретических основ и практического воплощения лабораторных методов, используемых в современной биохимии. Основное внимание уделено взятию биопроб, подготовке их к анализу и инструментальным методам исследования. В приложении приведены малый практикум по радиоизотопным методам в биохимии и правила работы с типовыми приборами, применяемыми в биохимических лабораториях.

Книга может быть использована в качестве учебного пособия по дисциплинам «Современные методы биохимии» и «Радиоизотопные методы в биохимии». Она будет также полезна для аспирантов, преподавателей и практических работников в области биологии и смежных с ней дисциплин (медицины, сельского хозяйства).

ББК 28.072
УДК 541.1 : 577.1 : 577.3 : 578.088

Рецензент д-р биол. наук М.М. Серых (Самарская сельскохозяйственная академия)

ISBN 5-86465-243-1

© Фролов Ю.П., 2003
© Изд-во «Самарский университет», 2003

*Моей внучке
Валентине Юрьевне
Пожарской
посвящаю*

ПРЕДИСЛОВИЕ

Качественное проведение исследований в области биохимии и молекулярной биологии невозможно без использования современных, прежде всего инструментальных методов анализа, основанных на последних достижениях фундаментальных наук и инженерной мысли. Работы по созданию и совершенствованию лабораторной базы дисциплин медико-биологического профиля ведутся во всем мире, и рынок насыщен разными приборами, давать описание которых не представляется возможным, да и вряд ли это нужно делать. Более важным, на наш взгляд, является написание не обремененного техническими деталями учебного пособия с четким изложением теоретических основ наиболее распространенных методов исследования в области биохимии и смежных с ней наук. Освоение работы на конкретном приборе целесообразно осуществлять путем изучения его описания и инструкции по эксплуатации. Это приучает студента к самостоятельной работе с технической документацией, часто являющейся единственным пособием при освоении нового прибора.

Следует отметить, что по физико-химическим и физическим методам анализа отечественными и зарубежными авторами написаны хорошие книги, но в настоящее время они стали библиографической редкостью. Наша первая книга (Фролов Ю.П., Древаль В.И. Физико-химические и физические методы анализа в биологической химии. Куйбышев, 1981, 66 с.) была ориентирована на проведение учебного практикума, поэтому теоретические основы методов в ней изложены очень кратко. Предлагаемая читателю книга призвана в какой-то мере устранить пробел учебной литературы по современным методам биохимии. Автор выражает признательность М.Ю. Власову и Е.Е. Макаровой, выполнившим основную часть компьютерного набора книги.

Естественно, книга не лишена недостатков, и автор будет признателен за все конструктивные предложения по улучшению книги, которые просит присылать по адресу: 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1, госуниверситет, кафедра биохимии.

Октябрь, 2002 г.

ВВЕДЕНИЕ

Предмет и задачи дисциплины «Современные методы биохимии». Биохимия изучает процессы, протекающие в биологических системах на молекулярном уровне. Биохимические процессы лежат в основе всех проявлений жизнедеятельности, без них немислима никакая биологическая система, даже такая просто организованная, как вирус. Специалистов-биологов интересуют в теоретическом и практическом плане все без исключения организмы. Однако без знания молекулярных основ жизнедеятельности невозможно ни составить полное представление о самих этих организмах, ни осуществить целенаправленные воздействия на них, что является конечной задачей практически любого научного изыскания.

Биохимия, подобно остальным естественным наукам, первичный материал для последующего его анализа, обобщения и построения теоретических моделей получает с помощью эксперимента. Таким образом, эксперимент вместе с применяемыми при его проведении методами стоит у истоков биохимического знания, а сведения, полученные в эксперименте, «питают» это знание, являются источником дальнейшего развития биохимии. Эксперимент необходим также для проверки (верификации) теоретических выводов и вытекающих из них последствий. Яркий пример тому – создание Уотсоном и Криком двухспиральной модели ДНК. Оно начиналось с рентгеноструктурных данных Уилкинса и проходило с обязательной сверкой промежуточных вариантов модели ДНК с ее рентгенограммами.

Чрезвычайная сложность биохимических процессов, усугубляемая колоссальным видовым разнообразием организмов, вынуждает исследователей постоянно расширять арсенал методов, которые позволили бы им успешно решать поставленные задачи. Невозможно назвать ни одну область естествознания, где применялся бы такой же богатый спектр физических процессов и основанных на них приборов, как это имеет место в биохимии. Не менее многообразен и круг проблем, которые приходится решать современной биохимией, включающей крайне перспективную область знания – молекулярную биологию. Однако это обстоятельство не исключает возможности использования и общих методов исследования (после соответствующей модификации их применительно к конкретному объекту), что позволяет, не углубляясь в детали, изложить их теоретические основы и описать наиболее распространенные лабораторные приборы.

Таким образом, дисциплина «Современные методы биохимии» носит прикладной характер. Ее задачами являются практическое

обеспечение процесса получения биохимического знания, прежде всего, путем разработки необходимых технических средств для получения опытных данных, а также расширение области использования этих средств в биохимии.

Проблемы, решаемые современными методами в биохимии. Выбор применяемого метода или их совокупности определяется конкретной целью исследования. Простейшей из них является определение химического строения небольшой молекулы, участвующей в биохимическом процессе. После выделения интересующего вещества в чистом виде (что нередко является непростой задачей) методами классической химии могут быть установлены его элементный состав, молекулярная масса, химические свойства и химическая формула соединения. Для биологических макромолекул решение последней задачи неизмеримо усложняется и требует применения современных приборов в сочетании с непростой аналитической работой.

Еще более сложной проблемой представляется установление конформации такой макромолекулы, состоящей обычно из тысяч атомов. Рутинными химическими методами ее решить невозможно. Важность же этой проблемы обусловлена тем обстоятельством, что большинство биомолекул, в отличие от молекул, изучаемых органической химией, относятся к числу «работающих», своего рода молекулярных машин, в основе функционирования которых лежит изменение их конформации. Последняя очень лабильна, и даже небольшие изменения температуры, pH, состава растворителя изменяют пространственное расположение атомов в биомолекуле.

Помимо знания молекулярного механизма функционирования биомолекул, например ферментов, необходимы сведения об их кинетических, термодинамических, физических, электрохимических и прочих свойствах. Для получения этих сведений используется свой комплекс современных приборов и соответствующий набор теоретических моделей.

Специфические подходы и методы требуются для изучения важнейшей проблемы биохимии – обмена веществ, количество которых в организме и отдельной клетке измеряется многозначными числами.

Особую сложность представляет изучение информационных процессов (репликация, транскрипция, трансляция, межклеточные взаимодействия и др.), составляющих сердцевину жизненного потока биосистем любого иерархического уровня (клетки, одноклеточные и многоклеточные организмы, сообщества). Здесь также используются совершенные подходы и самые современные приборы.

Не менее трудным является исследование работы клетки (особенно эукариотической) как сложнейшей саморегулирующейся системы, органически объединяющей потоки информации, материи (вещества) и энергии.

Современные методы широко используются и при изучении биохимических процессов, протекающих в целом многоклеточном организме, и при выявлении связи этих процессов с работой физиологических систем (функциональная биохимия).

Практически «белым пятном» для биохимии и молекулярной биологии является онтогенез, механизмы цитодифференцировки и морфогенеза.

Непростые, специфические подходы с использованием самых совершенных приборов и компьютерной техники потребовались и при решении прикладных проблем биохимии, имеющих жизненно важное значение. Сюда относятся проблемы, стоящие перед биотехнологией, медициной, сельским хозяйством.

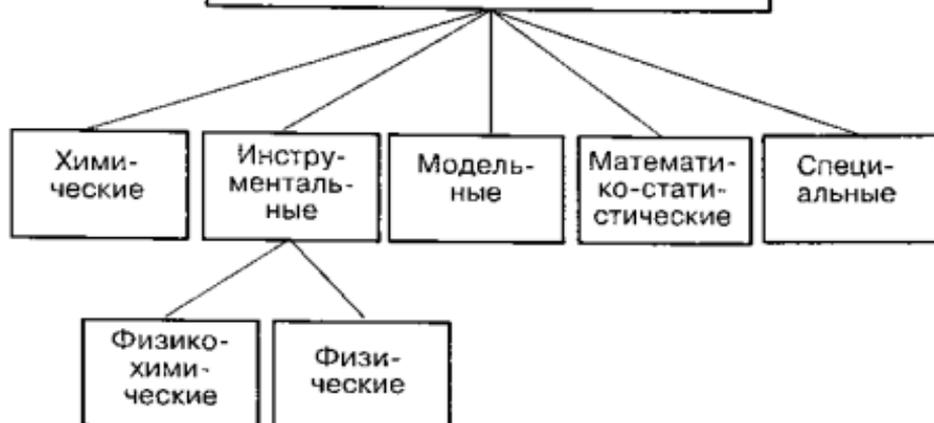
Классификация современных методов биохимии. Под стать многообразию задач, решаемых биохимией, и число различных методов, используемых в своей работе биохимиками. В зависимости от природы явления или области знания, лежащих в основе метода, его относят к той или иной классификационной группе. Следует иметь в виду, что любая классификация не является абсолютной, общепризнанной и единственно возможной. Существуют классификации (обычно в пределах одной группы), основанные на конструктивных признаках и дополняющие основную классификацию. Классификации методов имеют иерархическую структуру.

Нами будут рассмотрены с разной степенью подробности следующие группы методов: химические, физико-химические, физические, модельные и специальные (см. схему).

Химические методы хронологически являются наиболее старыми. Они основаны на использовании специфических реагентов, при взаимодействии которых с исследуемым веществом возникает определенный эффект, воспринимаемый органами чувств человека (окраска, осадок, запах и др.). Для количественной оценки результатов исследования в большинстве случаев применяются весовой или объемный методы, осуществляемые с использованием аналитических весов или бюреток.

Граница между физико-химическими и физическими методами анализа условна, и каждый автор проводит ее по-своему, а иногда эти методы вообще не разделяют. Поскольку характерным для обоих методов является использование специальных физических при-

Современные методы биохимии



Классификация современных методов биохимии

боров, их можно назвать инструментальными методами анализа. Основанием для этого служит то обстоятельство, что термином «инструмент» называют также приборы, устройства, приспособления, применяемые в науке и технике для измерений и других операций» (Сов. энциклоп. слов., 1979, с. 500).

К физико-химическим методам мы будем относить такие, которые позволяют путем регистрации физических параметров системы получать информацию о ее химических свойствах (концентрации раствора, качественном и количественном составе сложной смеси веществ, строении молекулы и др.).

Физические методы позволяют с помощью одних физических свойств системы получить сведения о других, которые, по-видимому, правильнее отнести к физическим свойствам (форма, размер, жесткость молекулы). Кроме того, во многих физических методах используются жесткие физические воздействия, которые разрушают или существенно изменяют химический состав исходной пробы, при этом в основе метода лежат явления, преимущественно связанные с атомным ядром и невалентными электронами. В целом же физические методы представляют собой сборную группу, и само деление методов анализа на физико-химические и физические, принятое нами, является достаточно условным, порою вызванным удобством изложения материала.

Для инструментальных методов анализа характерно сочетание их

с химическими методами, а также объединение в одном комбинированном методе двух разных методов. Кроме того, наряду с классическими вариантами инструментальных методов существуют и их микромодификации.

К группе методов, которые мы назвали модельными, относятся те случаи, когда с целью получения сведений о каком-то объекте (оригинале) исследуются его материальные или идеальные модели (включая математические).

Математико-статистические методы применяются при планировании эксперимента и статистической обработке полученных с его помощью данных. Эти методы являются объектом изучения специальной дисциплины (биометрии), и нами рассматриваться не будут.

К специальным методам мы условно отнесли особые усложненные случаи применения инструментального анализа для решения некоторых теоретических и прикладных задач биохимии.

Теоретические основы современных методов биохимии. Теоретической основой химических методов является химия, прежде всего такая ее дисциплина, как аналитическая химия, задачей которой является установление химического состава веществ или смесей. Аналитическая химия включает два раздела: качественный анализ и количественный анализ. В неорганической химии задачей качественного анализа является обнаружение («открытие») отдельных химических элементов или ионов. В биохимии под качественным анализом подразумевается обнаружение в биологической пробе не только элементов и ионов, но и молекул различной химической природы. С помощью количественного анализа определяется количественное содержание вещества или компонентов смеси.

Теоретической основой физико-химических методов анализа является самостоятельная научная дисциплина – физико-химический анализ. Последний использует взаимосвязь между составом химической системы и ее физическими свойствами для широкого и всестороннего изучения происходящих в ней химических и фазовых превращений. Поскольку при современном уровне развития техники физические параметры системы достаточно просто регистрируются, то с их помощью изучают химические свойства, а не наоборот. Справедливости ради следует отметить, что в ряде случаев наблюдается тесное сближение химических и физико-химических методов анализа. Так, когда путем химического метода о наличии какого-либо вещества судят по его окраске, то используют принцип физико-химического анализа. Отличие заключается лишь в способе регистрации физического свой-

ства – окраски: в первом случае она регистрируется визуально, во втором – с помощью прибора.

Физические методы в большинстве случаев используют взаимосвязь между физическими процессами, протекающими на макро- и микроуровнях. Процессы, проявляющиеся на макроуровне, можно легко зарегистрировать и использовать для исследования свойств системы на микроуровне. Теоретической основой физических методов анализа, как правило, являются различные разделы физики.

При конструировании приборов, применяемых в инструментальных методах анализа, важная роль принадлежит техническим наукам.

Использование натуральных моделей (разновидность материальных моделей) основывается на генетически обусловленной близости процессов, протекающих в оригинале и модели. При работе с идеальными, особенно математическими моделями теоретической основой являются математика, кибернетика и, естественно, как и при использовании материальных моделей, биохимия.

Теоретическими основами специальных методов анализа, с одной стороны, являются те науки, на которых базируются применяемые инструментальные методы, с другой – биологические дисциплины, которым принадлежит объект исследования.

Достоинства и недостатки современных методов биохимии. Каждый из рассмотренных видов анализа имеет свои достоинства и недостатки.

В химическом методе для анализа необходимы один или несколько специальных реагентов для осуществления аналитической реакции. Количественное содержание исследуемого вещества обычно определяют путем титрования раствора или взвешивания образующегося осадка. Достоинством этого метода является его дешевизна, так как для анализа во многих случаях требуются лишь химические реактивы, а из инструментов – бюретка или аналитические весы, при микрокристаллоскопическом методе требуется оптический микроскоп. Аналитические весы и микроскоп, в отличие от оборудования, применяемого в инструментальных методах анализа, являются стандартными лабораторными приборами, используемыми и при выполнении других работ. Химические методы удобны (и рентабельны) на некоторых производствах при выполнении простых рутинных анализов, повторяющихся изо дня в день. Их недостатки легко выявляются при сравнении с инструментальными методами.

Важнейшим достоинством физико-химических и физических методов анализа прежде всего является их универсальность – практи-

ческая независимость от химической природы конкретного вещества, лишь бы последнее обладало свойством, которое регистрирует прибор (светопоглощением, электропроводностью, адсорбцией и др.).

Инструментальные методы анализа, в отличие от химических, можно легко механизировать и автоматизировать, что позволяет практически полностью исключить ручную работу. В автоматических анализаторах после введения в прибор пробы все последующие механические операции выполняются без участия человека, которому остается лишь дождаться результата замера. Более того, современные автоматические анализаторы благодаря использованию ЭВМ освобождают оператора и от выполнения вычислительных работ над первичным результатом замера, выдавая на печать окончательный, готовый к использованию результат анализа. В случае необходимости идентифицировать вещество по параметрам, полученным с помощью такого анализатора, ЭВМ может осуществить поиск среди имеющихся в ее памяти аналогичных параметров различных веществ и установить сходство одного из них с исследуемым веществом.

Немаловажным достоинством инструментальных методов анализа является высокая чувствительность, позволяющая определить ничтожные количества вещества в пробе или вредных примесей в основном веществе (до 10^{-8} - $10^{-9}\%$). Высокая чувствительность и точность достигаются за счет использования высокоэффективных усилителей первичного электрического сигнала с датчика.

Высокая скорость анализа, которая в науке позволяет регистрировать быстропротекающие процессы, а в производстве – практически без запаздывания (в режиме реального времени) отслеживать значения параметров регулируемого процесса, обеспечивается использованием датчиков, способных практически любое свойство системы преобразовывать в электрический сигнал. Последний мгновенно усиливается, преобразуется и подается на выход прибора. Более того, этот сигнал может непосредственно поступать в систему управления производственным процессом (например, биотехнологическим) и осуществлять автоматическое регулирование его параметров.

В ряде случаев возникает необходимость передать результаты анализа напрямую (минуя человека-оператора) на большие расстояния по проводам или с помощью радиоволн. Электрическая форма сигнала, поступающего с датчика, позволяет это сделать.

Многие инструментальные методы практически не оказывают никакого влияния на исследуемое вещество, благодаря чему можно осуществлять непрерывную регистрацию биохимического (или мик-

робиологического) процесса в одном объеме (без отбора из него проб для анализа).

Существенным достоинством ряда инструментальных методов является возможность определять содержание компонентов смеси без трудоемкого предварительного выделения их из смеси.

Большинства этих достоинств лишены химические методы анализа.

Модельные методы имеют свои специфические достоинства. В качестве материальных моделей обычно выступают лабораторные животные, результаты экспериментов на которых после соответствующего анализа с определенной степенью достоверности экстраполируются (распространяются) на человека (оригинал). Достоинства такой «подмены» объекта исследования, особенно в медицине, очевидны. Эксперименты *in vitro* позволяют изменять условия протекания исследуемого процесса в таких диапазонах, которые нельзя получить в живой системе.

Математическое моделирование помогает глубже проникнуть в сущность исследуемого явления, определить «на кончике пера» оптимальные параметры протекания биохимического процесса, разработать методику определения интересующих биохимических показателей (например, различных констант в кинетике ферментативных реакций). Важная роль отводится математическому моделированию в установлении связи между биологическими свойствами макромолекул и их строением (например, между каталитической активностью белка-фермента и его первичной структурой).

Пути развития биохимических методов. Классические химические методы, применяемые в биохимии, со временем в возрастающей мере дополнялись инструментальными методами, которые сами непрерывно совершенствовались и расширяли свой ассортимент. Этим в основном и определялись пути развития биохимических методов в целом.

Не стояли на месте и методы подготовки биологических проб к анализу. Растирание в ступне потеснили методы разрушения клеток и тканей с помощью различных механических гомогенизаторов, ультразвуковых дезинтеграторов, буссинга и др. При разделении гомогената на фракции стали использовать высокоскоростные способы центрифугирования (градиентное, изопикническое), а фактор разделения современных центрифуг достигает 500 000.

На смену простейшим хроматографам, подобным тем, с которыми работал М.С.Цвет, пришли быстродействующие анализаторы состава жидких и газовых молекулярных смесей, использующие помимо адсорбции такие явления, как абсорбция, эффект молекулярных

сит, ионный обмен, биоспецифическое связывание компонентов смеси с наполнителем колонки и др., а секвенсоры (секвенаторы) позволяют получать даже непосредственную информацию о первичной структуре полипептидов. Совершенные хроматографы оснащены специализированными компьютерами, которые освобождают исследователя от рутинной обработки хроматограмм.

Не меньшие успехи получены на путях совершенствования электрохимических методов анализа, прежде всего электрофореза, который составил серьезную конкуренцию хроматографии. Переход от фронтального электрофореза к зональному неизмеримо расширил область применения метода в биохимических исследованиях. Этому способствовала разработка и таких его модификаций, как электрофорез в градиенте pH, градиенте пор полиакриламидного геля, диск-электрофорез, а также сочетание электрофореза с иммунодиффузией (иммуноэлектрофорез) и хроматографией (электрофорез-хроматография). Прimitивный по конструктивному исполнению полярограф Я.Гейровского сменили автоматические полярографы с регистрацией полярограммы на бумаге, а также на экране электронно-лучевой трубки в осциллографических полярографах. Последние позволяют изучать быстротекающие процессы. При использовании низкочастотного кондуктометрического анализа отпадает проблема с выбором приемлемого индикатора для титрования, а высокочастотная кондуктометрия позволяет контролировать ход химической реакции даже в неводных средах. Развитие потенциометрического анализа шло по пути повышения чувствительности метода, надежности аппаратуры, разработки новых конструкций электродов и приборов для автоматического титрования.

Большие возможности при проведении биохимических исследований предоставляет многочисленная группа оптических методов. Один из них, наиболее распространенный в лабораторной практике, – абсорбционный – прошел длинный путь от примитивных устройств непосредственного визуального сравнения интенсивности окраски испытуемого и стандартного растворов до современных регистрирующих спектрофотометров, работающих в широком оптическом диапазоне, включающем ультрафиолетовую и инфракрасную области спектра. Сходным образом обстоит дело и в отношении технической эволюции люминесцентного, поляриметрического, рефрактометрического и других методов, входящих в эту группу.

Подавляющая часть физических методов (электронная микроскопия, масс-спектрометрия, электронный и ядерный магнитный резонанс, радиометрия и радиоавтография, аналитическое ультрацент-

рифурование, рентгеноструктурный анализ, эмиссионный спектральный анализ и др.) возникла и прошла стремительный путь технического совершенствования в XX веке, позволив получить такую информацию о биосистемах, которая недоступна другим методам. Так, электронная микроскопия дала возможность увидеть отдельные макромолекулы, а рентгеноструктурный анализ – определить геометрические параметры их пространственной структуры. После открытия явления искусственной радиоактивности в 30-х годах прошлого века ученые получили универсальный метод избирательного «мечения» молекул с целью детально проследить их превращение в клетках и организмах. Электронный парамагнитный резонанс позволил количественно зарегистрировать свободные радикалы, срок жизни которых измеряется ничтожными долями секунды.

Число различных инструментальных методов, применяемых в биохимии, неуклонно растет по мере открытия ранее неизвестных физических явлений, которые после освоения учеными кладутся в основу создания новых приборов. Затем следует методичная работа по техническому совершенствованию этих приборов с целью повышения их чувствительности, быстродействия, точности, надежности, стабильности, экономичности, удобства эксплуатации и т.д. Как правило, современные приборы оснащены специализированными электронно-вычислительными блоками. Важным требованием в большинстве случаев является обеспечение минимального вмешательства метода в естественное состояние (структуру, работу) изучаемого объекта.

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ

ВЗЯТИЕ ПРОБ И ПОДГОТОВКА ИХ К АНАЛИЗУ

ГЛАВА ПЕРВАЯ ВЗЯТИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ

1.1. Некоторые особенности работы с биологическими пробами

Биологические пробы, используемые для биохимических анализов, различаются между собой прежде всего по агрегатному состоянию. Они бывают твердыми (костная ткань, раковины моллюсков, сухие зерна злаков, древесина и т.д.), жидкими (плазма крови, моча, молоко, пищеварительные соки и др.), газообразными (выдыхаемый воздух, биогаз, феромоны и др.), а также занимающими промежуточное положение между твердыми и жидкими, которые условно можно назвать пластическими. К ним относятся мягкие ткани животных и растений. Агрегатное состояние в значительной мере определяет технологию дальнейшей подготовки пробы к анализу.

Пробы небиологического происхождения (назовем их химическими) также могут находиться в названных выше агрегатных состояниях. Однако биологические пробы обладают рядом особенностей, обусловленных их принадлежностью к живым системам и предъявляющих существенные требования к работе с ними. Главная особенность состоит в том, что биологические пробы, представляющие наибольший интерес для исследователя, крайне лабильны в химическом отношении и сохраняют свои нативные свойства лишь находясь в составе живого организма. Будучи извлеченными из него, они по ряду причин начинают сразу же необратимо изменяться. К числу таких биопроб в первую очередь относятся мягкие ткани. В отличие от большинства химических проб, которые условно можно назвать статическими, они постоянно своего состава поддерживают за счет функциональной активности, прекращение которой после извлечения проб из организма делает невозможным сохранение ими своего прежнего состояния. Такие пробы, по-видимому, можно назвать динамическими.

В живом организме соответствующие системы и органы достаточно строго поддерживают определенный состав и рН внутренней среды, нередко – постоянную температуру, обеспечивают подвод к клеткам

необходимых питательных веществ и кислорода, удаление ненужных продуктов обмена, защиту от вредных микроорганизмов. Все это позволяет биологическим макромолекулам сохранять нативную конформацию, а внутриклеточным образованиям – свою нормальную структуру. Постоянный подвод энергии дает возможность поддерживать концентрационные градиенты внутри клетки и за ее пределами, осуществлять замену поврежденных молекул и структур новыми.

После взятия пробы ткани в нее прежде всего прекращают поступать питательные вещества, несущие энергию и материал для биосинтетических реакций. Из-за отсутствия притока энергии нарушается слаженный трансмембранный транспорт веществ, возникает хаотическое перемещение различных молекул внутри клетки. Особую деструктивную роль играют гидролитические ферменты, выходящие из лизосом и осуществляющие аутолиз (самопереваривание) клеток и тканей. В результате этого клетки лишаются биологически важных молекул, ответственных за анаболические процессы, которые при отсутствии источников энергии практически прекращаются. Катаболические процессы, как правило, не нуждаются в энергии, специальных структурах и протекают с большой скоростью. Преобладание катаболических реакций над анаболическими, а также многообразные, в норме не имеющие место реакции между продуктами распада клетки искажают ее истинный химический состав и ведут к неверным результатам анализа.

Биологические ткани являются питательным субстратом для многих микроорганизмов. В случае несоблюдения правил асептики размножившиеся микроорганизмы израсходуют на свои потребности часть пробы, загрязнят ее продуктами обмена и своей биомассой, что также исказит результаты анализа.

Все сказанное выше обязывает работающего с биологическими пробами, в первую очередь с метаболически активными тканями, соблюдать ряд очевидных требований:

1. Во избежание заражения человека или животного болезнетворными микроорганизмами и загрязнения ими биологической пробы отбор последней и дальнейшие операции с ней необходимо проводить с соблюдением правил асептики.

2. Взятую пробу до начала анализа необходимо хранить на холоде. Если взятие пробы связано с забоем животного и продолжительной процедурой ее извлечения из организма, эти операции желательно проводить в «холодной» комнате (для мелких животных – можно в кювете со льдом или снегом).

Понижение температуры на каждые 10° в 2-3 раза уменьшает

скорость деструктивных процессов в пробе и интенсивность жизнедеятельности микроорганизмов в случае их попадания в нее.

3. Необходимо максимально сократить время хранения пробы до начала анализа. Для этого нужно заранее отработать метод анализа и приготовить все необходимое для его проведения.

4. Подготовку пробы к анализу и сам анализ желательно проводить в минимально возможные сроки.

5. С целью приближения структуры изучаемых биомолекул к нативной необходимо создать для них условия, по возможности мало отличающиеся от тех, при которых они находились в клетке. Для этого используют буферные растворы с оптимальным значением pH, соответствующим составом солей, оптимальной температурой.

Крепкие реактивы и сильные физические воздействия используются лишь в тех случаях, когда структура молекул практически не оказывает влияния на полученный результат (например, при определении элементного состава молекул).

При работе с особо нестабильными веществами приходится использовать очень низкие температуры (жидкий азот), бескислородную атмосферу, специальные добавки, стабилизирующие структуру молекул, и т.д.

1.2. Взятие проб для анализа

Процедура взятия биологических проб зависит от специфики отбираемого материала, его количества, а также от анатомических и физиологических особенностей организма-донора. Она по-разному сказывается на физиологическом состоянии организма. В одних случаях отбор пробы не ощущается им, в других – вызывает болезненное ощущение, в третьих – связан с забоем животного, что исключает возможность его повторного использования в эксперименте. Если масса отбираемой пробы недостаточна для проведения анализа, объединяют несколько проб от разных организмов.

1.2.1. Прижизненные пробы

Взятие крови. Процедура отбора крови зависит от требуемого объема пробы. Небольшой объем крови (до 1 мл) у человека берут путем укола глубиной 2-3 мм в мякоть пальца или мочку уха. У маленьких детей кровь можно брать из большого пальца ноги или пятки. Обычно кровь берут из IV пальца левой руки (меньше всего подвергающегося загрязнению) с помощью специального ланцета (скарификатора) с фиксированной глубиной прокола кожи, которую пред-

варительно обрабатывают кусочком ваты, смоченной спиртом, затем эфиром. Кровь отбирают с помощью абсолютно чистой микропипетки, промытой сначала хромовой смесью, затем дистиллированной водой, спиртом, эфиром и высушенной током воздуха. Внутренний диаметр микропипетки – 1,0-1,7 мм. По своему составу отбираемая путем укола капиллярная кровь ближе к артериальной, нежели к венозной.

У животных небольшое количество крови можно брать путем укола наружной или внутренней поверхности уха, мягкой части ступни, а также надреза края уха, гребня (у птицы), срезания ножницами концов пальцев лапки (у лягушки). Кровь набирается с помощью пипетки или по каплям собирается в часовое стекло, которые рекомендуется предварительно ополоснуть противосвертывающей жидкостью (например, 5%-ным раствором лимоннокислого натрия).

Большое количество крови у человека берут из вены руки с помощью шприца или иглы (без шприца), собирая ее в пробирку. У маленьких детей и младенцев кровь можно брать из наружной яремной или височной вены.

У крупных животных (лошадь, корова) кровь берут из ушной или яремной вены, сонной артерии с помощью иглы от шприца или специальной иглы для кровопускания, у свиней – из крупных сосудов уха или путем отсекания кончика хвоста длиной 1-2 см; у собак и кошек – из яремной вены или из вены бедра; у кроликов – пункцией грудной вены или сердца; у морских свинок – пункцией яремной вены или сердца; у крыс и мышей – путем отрезания кончика хвоста (у крупных крыс возможна пункция хвостовой вены); у лягушек – пункцией большой кожной вены, расположенной на середине живота, а также пункцией сердца; у птиц – пункцией подкрыльевой вены или сонной артерии. Во всех случаях необходимо соблюдать правила асептики, а инструмент для отбора крови рекомендуется предварительно ополаскивать противосвертывающим раствором. Учитывая, что кровь птиц обладает высокой свертываемостью, ее собирают в сосуд с противосвертывающей жидкостью. Одновременно можно отобрать: у кролика – 15-20 мл, морской свинки – 5-10 мл, крысы – 1-1,5 мл, мыши – 0,5-0,7 мл, курицы и гуся – 10-15 мл, голубя – 1-1,5 мл крови.

Взятие цереброспинальной жидкости. Спинномозговую жидкость (ликвор) берут путем пункции. Прокол делают в месте сочленения позвоночного столба с черепной коробкой или между последним поясничным и первым крестцовым позвонками. Место прокола тщательно дезинфицируется, у животного здесь предварительно выстригается и выбривается шерсть. Игла вводится в ткань со вставленным мандре-

ном. У крупного рогатого скота можно набрать до 100 мл и более ликвора, который стекает в посуду каплями или стружкой.

Взятие костного мозга. Костный мозг для анализа берется путем пункции толстой иглой со щитком и вставленным мандреном. Обработка места прокола такая же, как при взятии спинномозговой жидкости. Место прокола: у человека – рукоятка грудины, у крупных животных (лошадей, крупного рогатого скота, свиней) – грудина или подвздошная кость, у собак – грудина или бедренная кость, у кроликов – грудина или берцовая кость, у птиц – коленный сустав или верхняя треть плюсневой кости. Процедура взятия костного мозга болезненная, поэтому применяют обезболивание, животных фиксируют. У человека одновременно отбирают 0,1-0,3 мл костного мозга, который отсасывают с помощью шприца.

Собирание пищеварительных соков. К ним относятся: слюна, желудочный сок, желчь, панкреатический и кишечный соки.

Слюна. Слюну человека можно собирать несколькими способами:

1. В цилиндрическую емкость ставят стеклянную воронку с вложенным складчатым фильтром, слегка смоченным дистиллированной водой. Воронку постепенно наполняют порциями слюны (плевками). Сбор ее начинают за несколько часов до опыта, так как слюна фильтруется медленно.

2. Слюна собирается после предварительного полоскания рта водой. Фильтрация слюны не обязательна.

3. Для отдельного собирания слюны, выделяемой одной из трех пар желез (подчелюстной, подъязычной, околоушной), используется капсула Красногорского (рис. 1.1), которая состоит из внутренней и наружной камер. Внутренняя камера служит для собирания слюны, которая отводится из полости рта по резиновой трубке. Наружная кольцевая камера служит для укрепления капсулы на слизистой рта за счет разрежения, которое сохраняется после пережимания резиновой трубки зажимом.

У животных слюна собирается с помощью капсулы Красногорского или, в хронических опытах, путем хирургического выведения протока слюнной железы на поверхность кожи (по методике наложения хронических фистул И.П. Павлова).

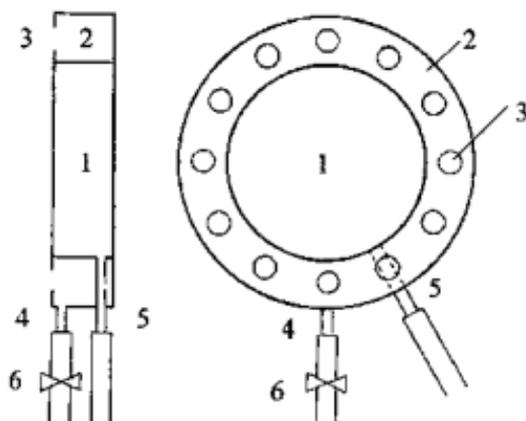


Рис. 1.1. Капсула Красногорского (схема) для сбора слюны из околоушной железы: 1 – внутренняя камера; 2 – наружная камера; 3 – отверстия для присасывания камеры к слизистой рта; 4 – трубка для присасывания; 5 – трубка для отвода слюны; 6 – зажим

Желудочный сок. Для одномоментного отбора желудочного сока используется толстый зонд, который вводится человеку и мелким животным через рот, а лошадям, крупному и мелкому рогатому скоту – через ноздрю. Чтобы животное не перекусило зонд в случае его введения через рот, между челюстями вставляют зевник (пластину с отверстием для зонда).

Многочасное собирание желудочного сока производят с помощью тонкого зонда.

Для получения чистого (не содержащего примесей) желудочного сока у человека используется двойной зонд с раздуваемым баллончиком для механического раздражения желудка.

В хронических опытах на животных постоянно чистый желудочный сок можно получать из изолированного по методу И.П. Павлова «малого желудочка». Сок отводится из него по фистульной трубке.

Содержимое двенадцатиперстной кишки. У человека содержимое двенадцатиперстной кишки, в которую изливаются желчь, панкреатический и кишечный соки, отбирают с помощью дуоденального зонда, состоящего из мягкой тонкой (3-5 мм в диаметре) резиновой трубки с маленькой металлической оливой на конце, снабженной многочисленными мелкими отверстиями. Олива вводится в двенадцатиперстную кишку, содержимое которой через отверстия оливы попадает в трубку, а из нее отсасывается шприцем.

У животных в хронических опытах сок поджелудочной железы по-

лучают путем выведения ее протока на брюшную поверхность с помощью хирургической операции. Желчь получают путем наложения фистулы на желчный пузырь или посредством выведения хирургическим путем желчного протока на брюшную поверхность. Кишечный сок получают также хирургическим путем с помощью кишечных фистул, накладываемых на интересующий участок кишечника (двенадцатиперстной кишки).

Сбор мочи. У крупных животных мочу собирают с помощью специальных мочесобирателей, закрепляемых на животном.

Для отдельного сбора незагрязненной мочи и твердых экскрементов (при выполнении балансовых исследований на лабораторных животных) используются специальные обменные клетки с сетчатым дном. К обменной клетке снаружи крепятся кормушка и поилка. Отверстие в стенке клетки со стороны кормушки сделано так, чтобы в него просовывалась лишь голова животного во избежание разбрасывания корма и попадания его в клетку. Разделение мочи и кала осуществляется с помощью различных устройств. В частности, мы для этой цели использовали установленную наклонно над большой воронкой мелкоячеистую сетку, по которой кал скатывался в коробку, а моча проходила через сетку (рис. 1.2).

При стоянии на воздухе моча быстро портится, поэтому ее желательно держать в герметично закрытом сосуде на холоде. Для лучшей сохранности в мочу рекомендуется добавлять крупинку тимола, или 2,5 мл хлороформа, или 5 мл толуола в расчете на 1 л мочи. Для удаления хлороформа перед исследованием мочу нужно подогреть.

У животных чистую мочу собирают также с помощью резинового или пластмассового катетера, который вводят через мочеиспускательный канал в мочевой пузырь. Кроме того, в хронических опытах используются операции наложения фистулы на мочевой пузырь или выведения мочеточников на кожную поверхность брюха.

Собирание пота. Пот, выделяемый различными частями тела, неодинаков по составу. Незаведенный пот с различных частей тела можно непосредственно собирать в химический стакан, проводя его краями по интересующему участку или обтирая этот участок кисейным полотенцем.

Для собирания пота, выделяемого всем телом, используют камеру с кондиционированным воздухом. Перед началом исследования испытуемый тщательно моется теплой водой с мылом, после чего его обмывают струей бидистиллированной воды и обсушивают полотенцем. Затем он надевает белье из кисейной ткани, из которой

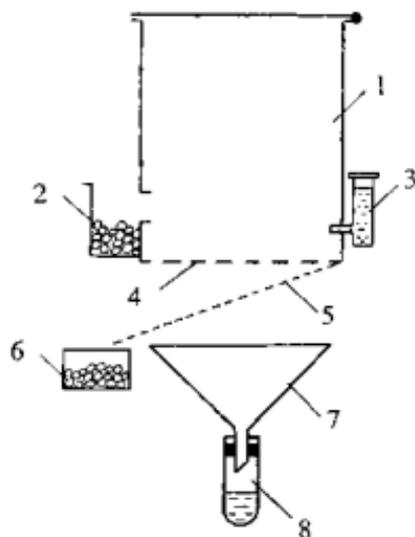


Рис. 1.2. Обменная клетка для раздельного сбора мочи и кала (схема): 1 – клетка; 2 – кормушка; 3 – полка; 4 – сетчатое дно; 5 – мелкоячеистая (разделительная) сетка; 6 – коробка для сбора кала; 7 – стеклянная воронка; 8 – склянка для сбора мочи

предварительно были удалены все растворимые ингредиенты. Через заданный срок белье снимают, тело испытуемого тщательно обтирают полотенцами, после чего белье и полотенца, а также тело испытуемого пять-шесть раз ополаскивают дистиллированной водой. Все промывные воды объединяют, концентрируют и подвергают анализу.

1.2.2. Посмертные пробы

Взятие тканей у животного в большинстве случаев связано с его забоем. Предварительное умерщвление животного путем декапитации, воздушной эмболии, обескровливания, воздействия электрическим током и т.д. вызывает такие глубокие изменения в организме, которые при исследовании лабильных биохимических соединений могут совершенно исказить результаты. Применение наркоза также является небезразличным, так как он нарушает нормальную нервную регуляцию функций. Поскольку при изучении химизма тканей и органов задачей исследователя является воспроизведение по возможности той картины, которая имела место во время нахождения ткани в составе орга-

низма, необходимо учитывать те изменения, которые происходят в ней при умерщвлении животного и последующей подготовке к анализу. При этом далеко не безразлично, что предполагается исследовать – содержание тех или иных субстратов или ферментативную активность. В первом случае необходимо быстро затормозить работу ферментов, во втором, напротив, сохранить по возможности неприкосновенными ферментные системы.

Хорошим методом фиксации тканей является моментальное их замораживание в жидком воздухе или кислороде, а при их отсутствии – в смеси ацетона или эфира с «сухим льдом» (твердой двуокисью углерода), позволяющей получить температуру до -80°C . Смесь 10 частей $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ с 7 частями снега снижает температуру до -55°C , 3 частей снега с 1 частью NaCl – до -31°C .

Наиболее надежным способом фиксации химического состава органов и тканей является погружение животного в жидкий кислород (-183°C) или жидкий азот ($-195,7^{\circ}\text{C}$). Промерзание тушки мелкого животного (лягушки, мыши, крысы) происходит за 2-3 секунды. Перенеся тушку в стальную ступку, разбивают ее молотком с целью извлечения нужного органа или ткани, которые затем растирают пестиком в порошок при непрерывном подливании новых порций жидкого кислорода (или азота) для предохранения от оттаивания. Если орган исследуется не целиком, то измельчение его позволяет затем получить действительно среднюю пробу для анализа.

Поскольку крупное животное заморозить в жидком кислороде технически не представляется возможным, замораживают извлеченные из него после забоя отдельные части тела.

Если при забое животного избежать наркоза не удастся, рекомендуют пользоваться производными барбитуровой кислоты (амитал, пентотал, гексенал), которые в отличие от наркотиков жирного ряда (хлороформ, эфир) не вызывают возбуждения животного в момент наркотизирования. Дозировка барбитуратов, дающая глубокий равномерный сон у животных, составляет 50-100 мг на 1 кг веса. Амитал вводят подкожно или внутрибрюшинно, а пентотал и гексенал – внутривенно в виде 1-5%-ного раствора.

В ряде случаев, например при исследовании тканевых белков, производят промывание органов или всего организма от крови (перфузию). О.Б. Кузовлева (1960) в этом случае рекомендует применять аппарат Боброва (для подкожного и внутривенного введения жидкостей), с помощью которого в сосудистое русло подается физиологический раствор (0,85%-ный раствор NaCl в дистиллированной воде). Перфузию печени крысы осуществляют немедленно, после

умерщвления и вскрытия брюшной и грудной полостей животного, через верхнюю полую вену, в которую вставляют канюлю. Перфузию почек крысы проводят после вскрытия брюшной полости через брюшную аорту, в которую вместо канюли вставляют толстую иглу от шприца. Прижизненную перфузию всего организма крысы осуществляют под наркозом, вводя после вскрытия грудной полости канюлю в верхнюю полую вену.

ГЛАВА ВТОРАЯ

ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ

Технология подготовки биологических проб к анализу зависит прежде всего от их конкретной природы, а также от вида анализа.

Газообразные пробы могут быть сразу подвергнуты анализу, например с помощью газовой хроматографии.

Биологические жидкости (пищеварительные соки, моча и др.) не требуют сложной подготовки и после освобождения от нежелательных взвешенных частиц путем фильтрования или центрифугирования готовы для анализа.

Некоторые особенности имеются при подготовке к анализу крови.

Если предстоит работа с плазмой или цельной кровью, необходимо сразу после взятия пробы добавить в нее небольшое количество антикоагулянта (противосвертывающего вещества). Для этой цели обычно используют гепарин, гирудин, цитрат, оксалат или фторид натрия и др. В частности, 4%-ный раствор цитрата натрия добавляют в кровь из расчета 1:10, а 0,3%-ный раствор гепарината натрия или калия в соотношении 1:20. После этого смесь тщательно перемешивают.

Для получения плазмы такую кровь центрифугируют на настольной центрифуге в течение 15 минут при 2000-3000 об/мин.

Если исследованию подлежат форменные элементы, то после отсасывания плазмы к ним добавляют до первоначального объема стерильный изотонический раствор хлорида натрия и вновь центрифугируют. Эту операцию (промывку форменных элементов) повторяют 3-4 раза, пока надосадочная жидкость (супернатант) не станет прозрачной.

Гемолиз эритроцитов осуществляют путем добавления к их взвеси дистиллированной воды.

Для получения дефибринированной крови свежевыпущенную кровь

наливают в стерильную колбу со стеклянными бусинами, начиная взбалтывать ее в момент заполнения сосуда. Приблизительно через 20 минут на бусинах оседают нити фибрина, после чего свободную от него кровь переливают в новый сосуд.

Сыворотку крови получают после осторожного заполнения пробирки кровью и последующего выдерживания ее при комнатной температуре в течение 1-2 часов (или при 37° в течение получаса). Чтобы не было вспенивания крови в момент заполнения пробирки, ее направляют по стенке пробирки. После образования сгустка крови его отделяют от стенок пробирки тонкой стеклянной палочкой или проволокой, обводя ими осторожно по стенке пробирки вокруг сгустка. Затем сыворотку аккуратно сливают, чтобы не захватить с ней эритроцитов. От последних в случае необходимости сыворотку освобождают центрифугированием.

Подготовка твердых проб к анализу обычно начинается с их механического размельчения, которое ускоряет последующее извлечение интересующего исследователя вещества (за счет увеличения суммарной поверхности частичек, контактирующих с экстрагирующей жидкостью). Кроме того, размельчение пробы позволяет брать из нее навески с одинаковым (усредненным) составом. Последующий химический анализ, который нередко сочетается с инструментальным методом, имеет дело со взвесью частиц пробы или освобожденной от них путем фильтрации или центрифугирования жидкостью.

Измельчение проб производят в ступках, с помощью электрических размельчителей и мельниц, мясорубок, ножниц, стемпелезок и других инструментов. Извлечение из размельченного материала интересующих веществ осуществляют путем настаивания их в растворителе при комнатной температуре или при повышенной температуре с использованием обратного холодильника, а также специальных аппаратов (например, аппарата Сокслета).

При проведении многих анализов, прежде всего связанных с определением неорганических веществ, биологическая проба предварительно подвергается озолению. Оно осуществляется сухим путем, мокрым путем с использованием равных частей концентрированной серной и чистой азотной кислот для окисления органического вещества при нагревании; хлорной кислотой в смеси с азотной (порой дополнительно серной) кислотой; азотной кислотой с пергидролем; пергидролем.

Существуют и другие способы подготовки биологических проб к химическому анализу. Однако наибольший интерес для биохимика

представляет исследование пластических проб (животных и растительных тканей) с отдельным определением содержания разных веществ во внутриклеточных структурах. Для этого производят разрушение клеточных оболочек и получают суспензию субклеточных структур (гомогенат, гомогенизат), которые затем фракционируют.

2.1. Гомогенизация клеток и тканей

Клетки животных и растений представляют собой чрезвычайно сложные системы. Их исследование базируется на принципе так называемого редукционизма, то есть на допущении, что познание сложного должно идти через расчленение его на возможно более простые части, которые и становятся фактическим предметом изучения.

Экспериментальные возможности изучения строения и функций клетки в условиях *in vivo* крайне ограничены. Поэтому исследователь вынужден расчленять ее на составляющие структуры и изучать их по отдельности. Разделению содержимого клетки на субклеточные фракции предшествует гомогенизация (дезинтеграция) биологической пробы, то есть превращение последней в однородную взвесь субклеточных структур. Известный биохимик К. де Дюв писал, что при гомогенизации "мы теряем часть морфологической информации, но такова плата за возможность последующего использования бесчисленного множества биохимических методов". К счастью, современные оптические и электронные микроскопы позволяют восполнить потерю этой морфологической информации.

Существует большое число способов дезинтеграции биологических проб. В зависимости от механизма, лежащего в основе дезинтеграции клеток, различают механические, физические, химические и энзиматические методы.

Механические методы. К числу механических относятся экструзионный, декомпрессионный, баллистический методы, а также дезинтеграция с помощью ножевых и пестиковых гомогенизаторов. Экструзионное разрушение клеток осуществляется путем продавливания замороженной пробы через малое отверстие с помощью пресса. Декомпрессионный метод используют в основном для разрушения микробных клеток, суспензию которых помещают в толстостенную камеру из нержавеющей стали. Создают в ней высокое давление газа, а затем резко его снижают, в результате чего клетки лопаются. Баллистический метод основан на абразивном разрушении стенок бактерий стеклянными бусинками (диаметр 50-500 мкм) на встряхивателе Микля,

сообщающем емкости с суспензией бактерий и бусинок до 3000 колебаний в минуту, или в специальной приставке к рефрижераторной центрифуге.

Для дезинтеграции грубых тканей животных и растений используют гомогенизаторы с вращающимися ножами (блендеры). Остро отточенные ножи вращаются с большой скоростью, механически разрушая стенки клеток предварительно размельченной пробы, находящейся в жидкости, и одновременно перемешивая ее. Нежелательного разогрева избегают путем охлаждения стакана, в котором происходит гомогенизация (рис. 1.3).

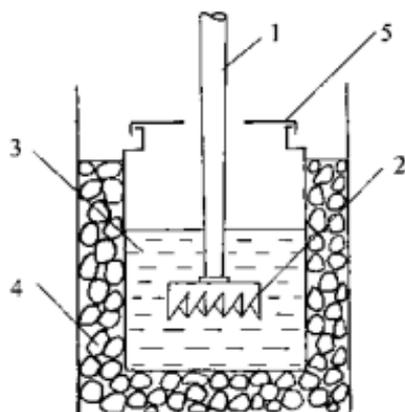


Рис. 1.3. Дезинтеграция клеток с помощью блендера: 1 – вал; 2 – нож; 3 – стакан с гомогенатом; 4 – охлаждающий стакан со льдом; 5 – крышка

Паренхиматозные ткани, например печеночные, легко подвергаются дезинтеграции в жидкой среде, заполняющей стакан гомогенизатора с вращающимся пестиком. Чтобы облегчить гомогенизацию и избавить гомогенат от мешающих в последующей работе обрывков соединительно-тканых волокон, пробу желателно предварительно продавить с помощью ручного пресса через пластину с мелкими (диаметром 0,8–1,0 мм) отверстиями (фильеру) (рис.1.4). Ткань, прошедшую через фильеру, собирают в стеклянную посуду и переносят в стакан гомогенизатора.

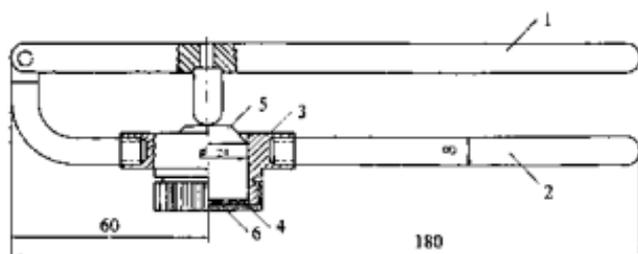


Рис. 1.4. Ручной пресс для выдавливания тканей перед гомогенизацией: 1 – рукоятка нажимная; 2 – рукоятка опорная; 3 – цилиндр; 4 – фильера; 5 – плунжер; 6 – биопроба

При биохимических исследованиях обычно используют стеклянный стакан для гомогенизации, во время работы погружаемый в воду со льдом. Такой гомогенизатор имеет ряд недостатков, которые отсутствуют у гомогенизатора с охлаждающей рубашкой, разработанного автором книги [7] и более четверти века используемого в биохимической лаборатории (рис. 1.5 а).

Рабочими элементами гомогенизатора являются вращаемый электродвигателем тефлоновый пестик (11) и тонкостенная (1,5 мм) гильза (1) из нержавеющей стали (длиной 90 мм). Снизу в гильзу запрессовано доньшко (2) из нержавеющей стали, которое упирается в тефлоновый вкладыш (6). С верхним стаканом (4), изготовленным из эбонита, гильза соединена с помощью эпоксидной смолы (10), хотя возможно и резьбовое соединение. Для удобства переливания гомогената в верхней части стакана сделана выточка (на рис. не показана); металлический ободок (5) предохраняет кромку стакана от растрескивания. Наружный кожух (3) также изготовлен из эбонита. С помощью резьбы (М36х1,25) и резиновой прокладки (7) он герметично соединен с верхним стаканом. Эбонит обладает малой теплопроводностью, поэтому кожух и стакан не охлаждаются рукой, а она не нагревает воду, омывающую гильзу. В кожух ввернуты 2 штуцера (8) с резьбой М8, герметичность обеспечивают резиновые прокладки (9). На штуцеры надевают куски тонкой резиновой трубки (внутренний диаметр 6 мм) длиной 500-600 мм, соединенные через переходники с химической трубкой большего диаметра. Последняя подключает гомогенизатор непосредственно к источнику холода. Использование тонкостенной гильзы из нержавеющей стали в паре с тефлоновым пестиком позволяет не только получать и в течение длительного времени выдерживать необходимый зазор между ними (0,1-0,2 мм), но и обеспечивает эффективный отвод тепла, выделяющегося при гомогенизации, так как коэффициент теплопроводности стали в 60 раз превышает данный показатель для стекла. Это позволяет для охлаждения использовать водопроводную воду. В случае необходимости более низкая температура охлаждающей воды может быть получена с помощью жидкостного ультратермостата. При этом резиновые трубки гомогенизатора соединяют со штуцерами перемешивающего насоса термостата, контактный термометр устанавливают на нулевую отметку, а

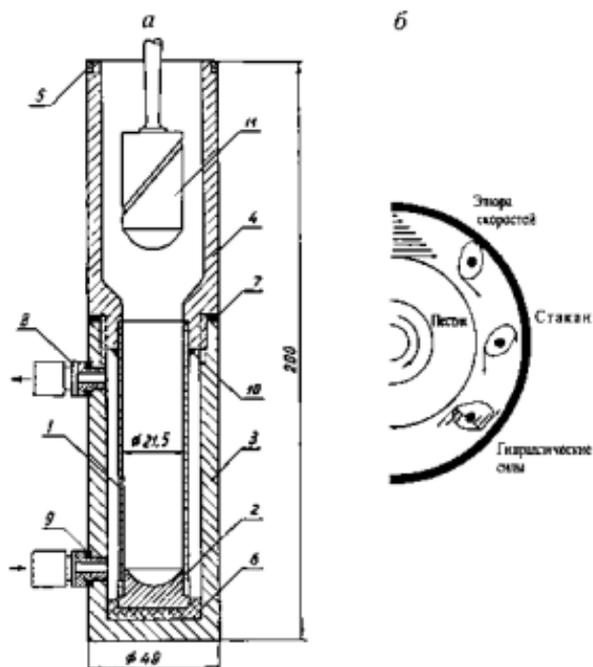


Рис. 1.5. Гомогенизатор с охлаждающей рубашкой (объяснения – в тексте):
а – конструкция гомогенизатора;
б – механизм разрушающего действия гомогенизатора

в термостат, заполненный водой, опускают аккумулятор холода (металлический стакан со льдом или снегом). Универсальным способом получения холодной воды является использование фреоновой агрегата отслужившей срок рефрижераторной центрифуги. Для этого ее рабочий объем герметизируют и заполняют водой. Вместо крышки сверху на центрифугу кладут деревянный щит с закрепленным на нем перемешивающим насосом, снятым с ультратермостата. Насос осуществляет циркуляцию охлажденной с помощью фреоновой агрегата воды через кожух гомогенизатора. Температуру воды в рабочем объеме центрифуги контролируют по опущенному в нее термометру.

Идеальным способом для отвода тепла, которое выделяется при гомогенизации биологических тканей с помощью ножа или пестика, было бы использование полупроводникового термоэлектрохолодильника, закрепленного на наружной поверхности гомогенизатора. В замораживающем микротоме издавна применяется микрохолодильник, понижающий температуру за счет эффекта Пельтье, однако гомогенизаторы с такого рода охлаждением промышленностью не выпускаются.

Гомогенизаторы с вращающимся пестиком являются наиболее щадящими в отношении внутриклеточных структур, поскольку разрушение клеточной стенки происходит не путем резания, как это имеет ме-

сто в случае применения блендеров, а под действием гидродинамических сил, возникающих в узком зазоре между гильзой и пестиком. Поскольку скорость кругового движения жидкости около внутренней поверхности гильзы равна нулю, а у поверхности пестика близка к его линейной скорости вращения, в зазоре создается большой градиент скорости, который разрывает клеточную стенку, не повреждая внутриклеточные структуры (рис. 1.5б). Чтобы дезинтеграции подверглась вся проба, стакан гомогенизатора во время работы с определенной частотой поднимают и опускают. При этом под выталкивающим действием пестика (подъем стакана) и атмосферного давления (опускание стакана) происходит продольная циркуляция гомогенизируемой среды через зазор. Неглубокая винтовая канавка (или продольные канавки) на пестике предотвращают забивание зазора тканью в начале гомогенизации. Ориентировочная скорость вращения пестика при гомогенизации, предшествующей фракционированию субклеточных частиц, составляет 1000 об/мин. Время гомогенизации зависит от механических свойств ткани.

Помимо типа гомогенизатора и режима гомогенизации (число оборотов в минуту, время гомогенизации) большое влияние на ее результат оказывает среда гомогенизации (суспендирования). Во многих случаях биологическая проба десятикратно разбавляется средой гомогенизации (соотношение проба:среда равно 1:9), хотя возможны и другие варианты. Обычно для создания в среде оптимального осмотического давления, исключающего набухание и разрыв внутриклеточных частиц, применяют сахарозу (или маннит). Ее концентрация зависит от типа ткани; в частности, некоторые авторы рекомендуют для тканей животных концентрацию сахарозы 0,88 М, а для растительных тканей – 0,25-0,50 М. В целом же оптимальный состав среды гомогенизации является индивидуальным для каждой пробы. Так, для выделения ядер и хромосом используют лимонную кислоту, которая подавляет активность «нейтральных» дезоксирибонуклеаз. При выделении ядер применяют растворы глицерина и этиленгликоля, пластид из клеток растений – полимеры этиленгликоля. Хлоропласты обычно выделяют в средах, содержащих вместо сахарозы маннит и сорбит. Чтобы избежать возможной инактивации ферментов фенолами, которые выделяются при гомогенизации растительных тканей, в среду добавляют поливинилпирролидон, связывающий фенолы. В ряде случаев применяют солевые (сердечная мышца), неводные (при выделении хлоропластов) среды и даже дистиллированную воду (при выделении микросом мозга). Электролитный состав среды сказывается на состоянии субклеточных структур. Высокие концентрации солей могут вызвать изменение плотности органелл, их агрегацию (слипание). Среда должна содержать определенное количество

ионов калия, кальция и др. Наличие ионов калия способствует более длительному дыханию митохондрий, а добавление ЭДТА сохраняет целостность митохондрий и микросом. На процесс гомогенизации оказывает влияние и pH среды. Установлено, что в интервале pH от 7,4 до 7,8 число неразрушенных клеток минимально, а при pH ниже 7 резко возрастает загрязнение гомогената целыми клетками и клеточными агрегатами. Нужного значения pH добиваются прибавлением к среде раствора КОН с концентрацией 4-5 моль/л.

Контроль за процессом гомогенизации обычно ведется с использованием оптического (в том числе – фазово-контрастного), а при необходимости и электронного микроскопа. Полноту гомогенизации оценивают по числу неразрушенных клеток в расчете на 1000 ядер. Ядра клеток растений можно окрашивать раствором метилового зеленого (6%-ная уксусная кислота, 0,04% метилового зеленого и 0,002M CaCl₂), а ядра клеток животных окрашивают гематоксилином (в фиолетовый цвет). О степени разрушения органелл в процессе гомогенизации можно судить и без микроскопа – по окраске мазка. Например, неповрежденные хлоропласты окрашиваются водным 1%-ным раствором толуидинового синего лишь в бледно-голубой цвет, а разрушенные хлоропласты – в интенсивно-синий цвет.

Гомогенизация с трудом поддается стандартизации. Режим гомогенизации (скорость вращения пестика – об/мин и время гомогенизации) зависит от биологического объекта (вида и возраста животного, органа), величины зазора между гильзой и пестиком, диаметра пестика, материала гильзы и пестика, состава среды гомогенизации, степени разбавления пробы средой, массы пробы и др. В целом же, как отмечают специалисты, гомогенизация по-прежнему остается в значительной степени искусством, нежели освоенной наукой лабораторной процедурой.

Для того, чтобы избавиться от гомогената перед последующим фракционированием от неразрушенных клеток и остатков соединительнотканых волокон, его продавливают через слои парашютного шелка.

Физические методы. К их числу относят процедуру замораживания – оттаивания, ультразвуковую дезинтеграцию, осмотический шок и др.

При замораживании тканей в клетках образуются кристаллы льда, которые своими острыми вершинами механически повреждают (перфорируют) клеточные стенки. После оттаивания такая проба может быть подвергнута окончательной дезинтеграции на гомогенизаторе с пестиком.

Ультразвуковая дезинтеграция используется для разрушения клеточных стенок путем пропускания ультразвукового излучения через

клеточную суспензию. Многократное чередование повышенного и пониженного давления (с частотой 20 кГц и выше) возможно ведет к механическому «износу» клеточных стенок. При ультразвуковой дезинтеграции выделяется большое количество тепла, которое необходимо отводить от сосуда с суспензией.

Осмотический шок возникает при помещении клеток в гипотонический раствор. Разрушение клеточной стенки вызывает осмотическое давление, возникающее внутри клетки вследствие односторонней диффузии воды через полупроницаемую мембрану клетки. Частным случаем осмотического шока является переход содержимого эритроцита в окружающий гипотонический раствор вследствие разрыва его оболочки (гемолиз).

Химические методы. Для разрушения некоторых клеток используют кислоты, щелочи, соли, органические растворители (этилацетат, толуол), поверхностно-активные вещества (ПАВ). В частности, для разрушения клеточной стенки хлореллы может быть использован диметилформамид. В биохимической практике химические методы дезинтеграции клеток используются редко.

Энзиматические методы. Эти методы основаны на гидролитическом расщеплении материала клеточных стенок с участием отдельных ферментов (лизоцим) или комплексного препарата, выделенного из виноградной улитки (*Helix pomatia*) и содержащего целлюлазу, хитиназу и липазу. К числу энзиматических методов может быть отнесен и аутолиз (автолиз) – саморастворение растительных и животных тканей и клеток под действием их собственных гидролитических ферментов.

Среди рассмотренных методов дезинтеграции клеток при отдельном биохимическом исследовании субклеточных структур наибольшее распространение получило разрушение клеток с помощью гомогенизаторов с пестиком и блендеров (для механически прочных тканей).

2.2. Разделение субклеточных структур с помощью центрифуг

Субклеточные фракции. Для детального биохимического исследования субклеточных структур нужно выделить их из гомогената. Разделение гомогената на отдельные фракции (фракционирование) осуществляют, опираясь на различие между собой субклеточных структур по определенным показателям. Действительно, органоиды

клетки отличаются размером, формой, плотностью (удельным весом), величиной и знаком электрического заряда, который они несут на своей поверхности, и некоторыми другими свойствами.

Из тканей животных выделяют:

- 1) ядра,
- 2) митохондрии,
- 3) лизосомы,
- 4) микросомальную фракцию, состоящую из субфракций (подфракций) рибосом и микросомальных мембран,
- 5) надосадочную жидкость.

Из растительных тканей дополнительно могут быть выделены фракции: пластиды (хлоропласты, лейкопласты, хромопласты), различные внутриклеточные включения (крахмальные и алейроновые зерна, кристаллы минеральных солей).

Гомогенат на фракции можно разделить, используя электрофорез в градиенте плотности среды и некоторые другие способы. Однако практически в подавляющем большинстве случаев субклеточные фракции выделяют с помощью центрифугирования.

Теоретические основы центрифугирования. Известно, что некоторые частицы, в зависимости от величины своей плотности, могут подобно эритроцитам осаждаться (седиментировать) или, наоборот, всплывать (флотировать), как это происходит при стоянии молока с капельками жира. Казалось бы, что для разделения гомогената на фракции нужно дать ему возможность отстояться, при этом самопроизвольно более тяжелые органеллы должны осесть на дно сосуда первыми, самые легкие – последними, а промежуточные по массе занять место между этими крайними фракциями. Отобрать же фракции раздельно из сосуда, в котором они оседали, технической сложности не представляет. Так обстояло бы дело, будь органеллы достаточно крупными частицами, хотя бы размером с клетку. Однако, будучи очень малыми по размеру, субклеточные частицы находятся в постоянном хаотическом (броуновском) движении. Последнее обусловлено соударениями с молекулами окружающей среды. Импульсы сил молекулярных ударов для малых частиц оказываются неуравновешенными, что порождает их хаотическое движение. С другой стороны, гравитационное оседание частиц происходит с очень малой скоростью, поскольку ему препятствуют сопротивление среды и ее выталкивающая сила. Так как плотность частиц обычно лишь незначительно превышает плотность воды, результирующая сила, вызывающая их седиментацию, мала. В связи с этим хаотическое движение частиц сводит на нет их направленное движение под

действием веса, и никакого упорядоченного оседания органоидов не произойдет. Позитивный результат можно получить только в том случае, если силу тяжести заменить другой, на многие порядки большей силой, способной обеспечить скорость оседания частиц, на порядки превышающую скорость броуновского движения. В качестве нее решили использовать центробежную силу, которая в состоянии «утяжелить» органоиды в десятки – сотни тысяч раз. Благо, такие аппараты, своего рода «гравитационные генераторы», уже были созданы, это – центрифуги различных мощностей и конструкций.

Чтобы количественно оценить влияние различных факторов на скорость движения частиц при центрифугировании, рассмотрим упрощенную модель, когда на сферическую частицу, находящуюся в центрифужной пробирке, действуют всего лишь две силы: движущая и сопротивления (рис. 1.6).

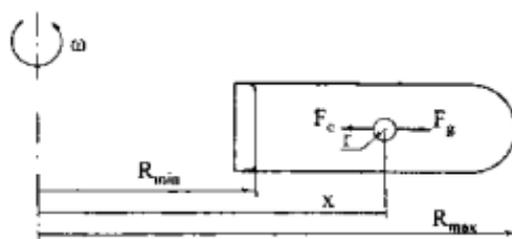


Рис. 1.6. Силы, действующие на частицу при центрифугировании

Движущая сила F_z – сложная, является равнодействующей центробежной и выталкивающей сил. Центробежная сила направлена от оси вращения ротора центрифуги, выталкивающая сила имеет противоположное направление. Влияние последней можно отразить, вычтя в формуле для центробежной силы из плотности частицы (ρ_v) плотность окружающей ее среды (ρ_{cp}). Для сферической частицы с радиусом r , находящейся на расстоянии от оси ротора, вращающегося с угловой скоростью ω (рад/с), движущая сила

$$F_k = \frac{4}{3} \pi r^3 (\rho_v - \rho_{cp}) \omega^2 x, \quad (1.1)$$

где $\frac{4}{3} \pi r^3$ – объем частицы,

$(\rho_v - \rho_{cp})$ – своего рода приведенная плотность частицы,

$\omega^2 x$ – центробежное ускорение.

Движущая сила сообщает частице скорость dx/dt . Сила сопротивления F_c направлена в противоположную движению сторону; ее величина прямо пропорциональна скорости, вязкости среды (η), размеру частицы (r) и зависит от формы последней. В соответствии с законом Стокса сила сопротивления

$$F_c = 6\pi\eta r \frac{dx}{dt}. \quad (1.2)$$

При движении частицы в направлении дна пробирки в связи с увеличением расстояния x от оси значение движущей силы тоже увеличивается, а с ней возрастает и скорость частицы. Однако в связи с малой величиной этого линейного ускорения d^2x/dt^2 в первом приближении можно считать, что скорость движения частицы в любой момент времени постоянна, а $F_k = F_c$. Совместное решение (1.1) и (1.2) дает формулу для скорости движения частицы

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2}{9} \cdot \frac{r^2 (\rho_v - \rho_{cp})}{\eta} \cdot \omega^2 x. \quad (1.3)$$

Анализ этого уравнения показывает, что скорость dx/dt зависит от трех пар переменных величин (параметров). Первая пара (r, ρ_v) связана с частицей, вторая (ρ_{cp}, η) – со средой, третья (ω, x) – с центрифугой. Существует еще седьмой параметр, который характеризует форму частицы (фактор формы). Для сферической частицы он равен $2/9$ и влияет на сопротивление среды движению частицы, являясь своего рода связующим звеном между частицей и средой. Таким об-

разом, скорость движения частицы зависит от ее формы, прямо пропорциональна размеру ротора (через x), разнице между плотностями частицы и среды, квадратам размера частицы (r) и числа оборотов; лишь с одним параметром – вязкостью – скорость находится в отношении обратной пропорциональности. Представляет интерес соотношение между значениями ρ_v и ρ_{cp} . Если $\rho_v > \rho_{cp}$, то частица оседает, если $\rho_v < \rho_{cp}$ - частица всплывает, то есть движется в направлении, противоположном действию центробежной силы. При $\rho_v = \rho_{cp}$ частица будет оставаться на месте при любой скорости вращения ротора.

Существует показатель, не зависящий от значения центробежного ускорения и определяемый только параметрами частицы и среды. Он равен отношению скорости движения частицы к центробежному ускорению и называется константой седиментации \bar{S} . Его легко найти из уравнения (1.3):

$$\bar{S} = \frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \frac{2}{9} \cdot \frac{r^2 (\rho_v - \rho_{cp})}{\eta}. \quad (1.4)$$

Размерность \bar{S} – секунда. На практике используют величину сведберг (св), названную так в честь шведского ученого, лауреата Нобелевской премии (1926 г.) Т. Сведберга, сконструировавшего первую ультрацентрифугу, $1\text{св} = 1 \cdot 10^{-13}$ с.

Чтобы сделать \bar{S} не зависящей от среды центрифугирования и превратить ее в показатель, однозначно характеризующий только частицу, центрифугирование проводят в «стандартной» среде – воде при температуре 20° . Такую константу седиментации обозначают буквой \bar{S} с индексами: $\bar{S}_{20,0}$

Помимо этого показателя существует другой, называемый фактором разделения G , который характеризует только седиментационные возможности центрифуги. Он равен отношению центробежного ускорения $\omega^2 x$ к ускорению свободного падения g . У мениска пробирки он минимален, у ее дна – максимален. Его среднее значение вычисляют для $x = \bar{R} = (R_{\max} + R_{\min})/2$:

$$G = \frac{\omega^2 \bar{R}}{g} = \left(\frac{2\pi n}{60} \right)^2 \frac{\bar{R}}{g}, \quad (1.5)$$

где n – скорость вращения ротора (об/мин);
 $g = 981 \text{ см/с}^2$; \bar{R} – выражено в см.

В окончательном виде

$$G = 1,12 \cdot 10^{-5} \cdot n^2 \cdot \bar{R}. \quad (1.6)$$

Это уравнение связывает между собой три переменных величины: G , n и \bar{R} . Для графического нахождения одной из них по заданным значениям двух остальных используют номограмму, составленную на основании (1.6) Доулом и Котциасом (рис. 1.7).

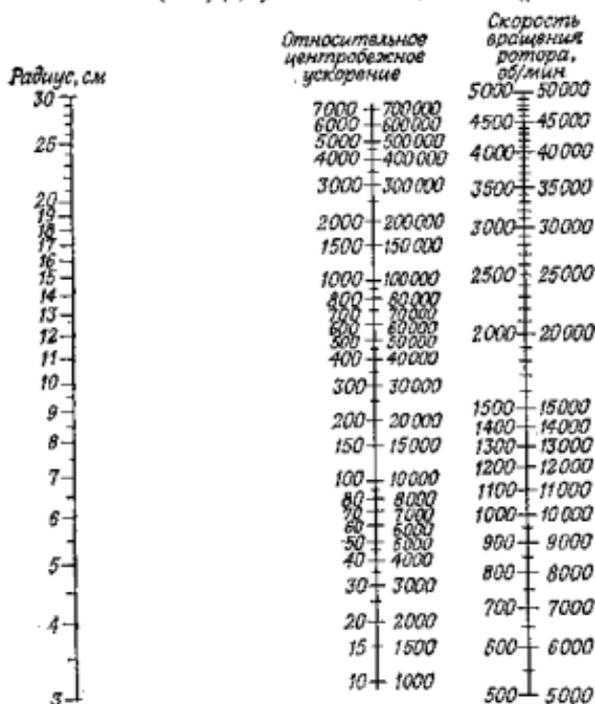


Рис. 1.7. Номограмма для нахождения параметров центрифугирования [4]

Если технические возможности центрифуги не позволяют достичь требуемого значения фактора разделения G , осадить фракцию можно за счет увеличения времени центрифугирования t . В определенном диапазоне значений одинаковый эффект получают при равных значениях временного интеграла $G \cdot t$ (его размерность – g -мин).

Препаративные центрифуги. Для разделения гомогената на фракции с целью последующего биохимического анализа их используют высокооборотные препаративные центрифуги.

Препаративные центрифуги подразделяют на три группы: центрифуги общего назначения, скоростные центрифуги и препаративные ультрацентрифуги. Центрифуги общего назначения в большинстве случаев имеют максимальную скорость вращения ротора не выше 10 000 об/мин и центробежное ускорение менее 10 000 g . По конструктивному исполнению они обычно являются настольными приборами. Скоростные центрифуги дают предельную скорость 25 000 об/мин и максимальное значение центробежного ускорения до 89 000 g . Они являются рефрижераторными (камера ротора охлаждается) и стационарными. Препаративные ультрацентрифуги имеют предельную скорость вращения ротора до 75 000 об/мин и максимальное центробежное ускорение более 500 000 g . Помимо холодильника они имеют вакуумную систему и представляют собой сложные стационарные установки.

Для препаративного разделения субклеточных фракций применяют скоростные центрифуги и препаративные ультрацентрифуги.

Основными узлами современной препаративной ультрацентрифуги являются: высокооборотный электродвигатель; системы смазки подшипников и охлаждения электродвигателя; система охлаждения камеры ротора; двухступенчатая вакуумная система, состоящая из форвакуумного и диффузионного масляного насосов; ротор; система автоматики и пульт управления.

При вращении ротора происходит неравномерный разогрев его из-за трения о воздух: на периферии (у дна пробирок) температура будет выше (линейная скорость вращения больше), около оси вращения (у верха пробирок) – ниже. Вследствие этого в жидком содержимом пробирок возникнут конвективные токи, которые нарушат картину распределения осаждаемых фракций. К тому же на преодоление трения ротора о воздух требуется повышенная мощность, а нагрев содержимого пробирок нежелательным образом сказывается на компонентах разделяемой пробы. Вакуумная система осуществляет откачивание воздуха из камеры ротора. Его начинает форвакуумный

насос, создающий разрежение до 0,1-0,5 мм рт. ст. Диффузионный масляный насос, который находится между форвакуумным насосом и камерой ротора, создает в последней разрежение, равное 0,001 мм рт. ст. Таким образом исключается нагревание ротора, а дальнейшее охлаждение его осуществляет холодильная система.

С помощью пульта управления производят установку режима работы центрифуги (температура, число оборотов ротора, время центрифугирования, скорость разгона и интенсивность торможения ротора). Система автоматики выдерживает заданный режим работы центрифуги и осуществляет функцию защиты ее и персонала от аварий и несчастных случаев.

Важным узлом центрифуги является ротор. Во время работы он подвергается мощным силовым воздействиям, поэтому изготовлен из легких и прочных металлов: алюминиевого сплава или титана. Превышение ротором допустимого числа оборотов может привести к его разрыву со всеми вытекающими последствиями. Допустимая суммарная длительность его работы (ресурс) для алюминиевых роторов составляет 2500, для титановых – 10 000 часов. Это время соизмеримо (и даже ниже) с ресурсом таких ответственных и сложных аппаратов, как самолеты, вертолеты, что свидетельствует о чрезвычайно больших нагрузках на ротор и быстром старении его металла.

Коллектив ученых и инженеров, возглавляемый академиком И.К. Кикоиным, разработал и создал отечественную ультрацентрифугу К-32, которая в 1978 г. была выдвинута на соискание Государственной премии СССР. Серийная центрифуга К-32 успешно прошла приемные испытания, и комиссия под председательством академика А.С. Спирина дала ей высокую оценку. Максимальная скорость вращения ротора центрифуги К-32, выполненного из нового алюминиевого сплава, – 72 000 об/мин, ресурс его работы – 4000 часов, максимальное центробежное ускорение – более 400 000. Для сравнения следует отметить, что ресурс работы электропривода центрифуги фирмы «Бэкман», стоящего более 6000 долларов, – 1500 часов. Стоимость замены подшипника центрифуги К-32, который служит в 4-5 раз дольше, на порядки меньше. С учетом этих и других достоинств США и Англия выдали патенты на центрифугу К-32 и новый алюминиевый сплав для роторов.

Наиболее часто на препаративных центрифугах используются угловые роторы и роторы со свободно подвешенными пробирками (бакет-роторы). В угловом роторе пробирки располагаются в гнездах под углом от 14-20° до 40° к оси вращения. Ротор – монолитный, во время работы сверху герметично закрывается крышкой. Пробирки

изготавливают из нитроцеллюлозы, полиалломера (сополимера этилена и пропилена) и поликарбоната. Сверху они тоже герметично закрываются уплотнительными крышками. Бакет-роторы несут 3 или 6 пробирок, устанавливаемых в свободноповешенные металлические гильзы – «бакеты» (от англ. «bucket» – ведро). Во время работы гильзы с установленными в них пробирками принимают горизонтальное положение. Перед установкой пробирки вместе с содержимым необходимо уравновесить с точностью 0,1 г. В трехпозиционных бакет-роторах все 3 пробирки должны иметь одинаковый вес, а в шестипозиционных допускается попарное уравновешивание противоположно устанавливаемых пробирок.

Кроме названных роторов, также используют зональные роторы Андерсона. Заполнение ротора и извлечение из него фракции производится «на ходу» (во время вращения ротора со скоростью 2-3 тыс. об/мин). Ротор Андерсона позволяет разделять весьма большие объемы материала (более подробно о зональных роторах можно прочесть в литературе, приведенной в конце раздела).

Типы центрифугирования. Уравнение (1.3) свидетельствует о большом числе факторов, влияющих на скорость разделения смеси субклеточных структур. Отсюда и большое количество способов проведения центрифугирования с упором на тот или иной фактор. Рассмотрим лишь наиболее распространенные типы центрифугирования, отметив, что в названиях их нет единообразия (один и тот же тип авторы называют по-разному).

Дифференциальное центрифугирование основано на различии в скоростях седиментации частиц, определяемых размерами и плотностью последних. Каждую фракцию выделяют в виде осадка при своем значении центробежного ускорения, которое при переходе к следующей фракции ступенчато увеличивают (вместе с продолжительностью центрифугирования). Вначале выделяют наиболее легко осаждающуюся фракцию – ядерную, затем – митохондриальную, за ней – лизосомальную и, наконец – фракцию микросом. Осадок каждой фракции промывают путем ресуспендирования и повторного центрифугирования, как это делается при промывке эритроцитов (см. главу 1). Дифференциальное центрифугирование является наиболее часто применяемым типом. Для его осуществления обычно используют угловой ротор.

Зонально-скоростное центрифугирование также основано на различии частиц по размерам и плотности. От дифференциального центрифугирования оно отличается тем, что в первом вся пробирка заполняется гомогенатом, а в зонально-скоростном центрифугирова-

нии проба тонким слоем наносится на поверхность раствора с непрерывным градиентом плотности среды. Для этой цели обычно используется водный раствор сахарозы, концентрация которого возрастает от мениска ко дну пробирки. Плотность всех разделяемых частиц выше плотности среды, а градиент используется лишь для уменьшения ее конвекции. При центрифугировании каждый вид частиц движется со своей скоростью и образует отграниченный от среды слой (зону). Центрифугирование до образования осадка не доводят, а фракции (зоны) отбирают по отдельности, например, методом «раскапывания» (см. ниже). При зонально-скоростном центрифугировании используют бакет-ротатор.

Градиентное центрифугирование основано на различии частиц по плотности. Для этого в пробирке создается градиент концентрации (плотности) сахарозы, диапазон которого включает плотности всех разделяемых частиц. Проба наслаивается на среду аналогично тому, как это делается при зонально-скоростном центрифугировании. Частицы,двигающиеся под действием центробежной силы, останавливаются, достигнув своего изоплотностного слоя (где плотность среды равна их плотности). В результате по высоте пробирки образуются зоны, в которых сосредотачиваются частицы с соответствующей плотностью. Для раздельного сбора фракций этих частиц используют несколько методов (способов). Один из них – метод «раскапывания» – основан на послойном сборе фракций в отдельные пробирки с помощью тонкой иглы, которая путем прокола доньшка пробирки вводится в ее нижнюю часть. Другой вариант этого метода – отсасывание градиента со дна пробирки через опущенную сверху иглу с ровно обрезанным концом. Лучше всего содержимое отцентрифугированной пробирки вытеснять путем подачи с помощью иглы на дно пробирки жидкости с высокой плотностью (например, раствора сахарозы с концентрацией 55-60%). На пробирку сверху герметично одевают колпачок с трубкой для отвода фракций, которые поднимаются под выталкивающим действием подаваемой через иглу жидкости с высокой плотностью.

Наиболее часто градиент плотности получают с помощью сахарозы, которая в силу хорошей растворимости в воде позволяет готовить растворы в широком диапазоне концентраций. Кроме того, ее молекулы обладают слабой диффузией, что способствует длительному сохранению градиента плотности.

Для создания градиента плотности в центрифужной пробирке используют разные способы. Один из них заключается в последовательном наслаивании при помощи пипетки определенных объемов раствора сахарозы со ступенчато понижающейся концентрацией. Если такой системе со ступенчатым градиентом плотности дать воз-

возможность постоять, произойдет его сглаживание и превращение в плавный градиент. Для получения сразу плавного градиента используют специальное устройство (рис. 1.8), конструктивно представляющее собой блок из оргстекла (1), в котором имеются две соединенные между собой цилиндрические камеры (2,3). Канал между ними может перекрываться игольчатым краном (4).

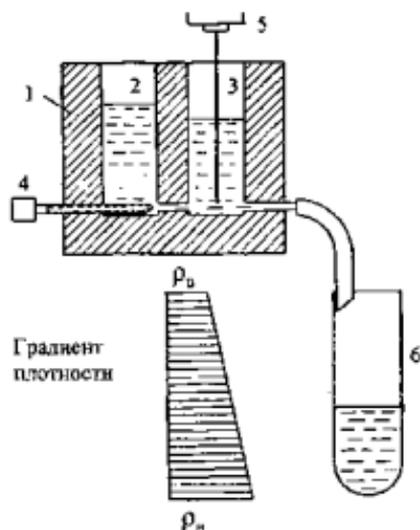


Рис. 1.8. Устройство для создания градиента плотности раствора (объяснения в тексте)

Одну из камер (2) заполняют раствором сахарозы с низкой концентрацией, другую (3) — раствором с высокой концентрацией. Камера (3) с помощью тонкой полиэтиленовой трубки соединяется с центрифужной пробиркой (6). Включают микромешалку (5), открывают кран (4), снимают зажим с полиэтиленовой трубки. Пробирка начинает заполняться раствором сахарозы с непрерывно понижающейся концентрацией. С помощью такого устройства получают градиент плотности, близкий к линейному. Форму градиента можно установить путем его «раскапывания» и последующего определения концентрации сахарозы в отбираемых пробах с помощью рефрактометра.

Изопикническое центрифугирование имеет принципиальное сходство с градиентным, но позволяет получить лишь одну фракцию из гомогената. Для этого пробу добавляют в пробирку с раствором сахарозы такой концентрации, чтобы после смешивания получить плотность среды, равную плотности частиц, которые желают выделить из гомогената. После центрифугирования более легкие фракции флотируют,

более плотные – оседают на дно, а во всем объеме пробирки оказываются рассредоточенными выделяемые частицы. Затем освобождаются от поверхностного слоя частиц и осадка, а оставшуюся взвесь разбавляют водой. Повторное центрифугирование переводит бывшую ранее изопикническую фракцию в осадок (концентрирует).

Помимо сахарозы для создания градиентов плотности используют и другие вещества, в частности полисахарид фикоколл-400, полученный сополимеризацией сахарозы и эпихлоридгидрина.

Температура сравнительно слабо влияет на плотность растворов сахарозы, но на их вязкость оказывает существенное влияние (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Плотность (ρ , г/см³) и вязкость (η , сП) растворов сахарозы при разной температуре [5]

Параметр	Концентрация раствора, мас. %				
	5	10	15	20	25
ρ	5 ⁰ С				
	1,020	1,041	1,062	1,084	1,107
η	1,753	2,043	2,513	3,135	4,042
ρ	20 ⁰ С				
	1,018	1,038	1,059	1,081	1,103
η	1,148	1,337	1,592	1,946	2,449

Параметр	Концентрация раствора, мас. %				
	30	35	40	45	50
ρ	5 ⁰ С				
	1,131	1,156	1,182	1,209	1,236
η	5,422	7,636	11,453	18,604	33,160
ρ	20 ⁰ С				
	1,127	1,151	1,177	1,203	1,230
η	3,184	4,323	6,163	9,376	15,420

Для ориентировочной оценки возможностей рассмотренных типов центрифугирования по фракционированию внутриклеточных структур в табл.

1.2 представлены значения их размеров и плотности, полученные разными авторами.

Таблица 1.2
Размеры и плотность органелл клеток печени [3]

Органеллы	Диаметр частицы, мкм	Плотность, г/см ³
Ядра	3000-8000	1,286-1,328
Митохондрии	300-1000	1,188-1,221
Лизосомы	200-600	1,216-1,253
Рибосомы	15-20	1,41-1,51

Обращает на себя внимание широкий диапазон варьирования размеров частиц, который является определяющим при дифференциальном и зонально-скоростном центрифугировании, особенно с учетом того, что размер частицы в уравнение (1.3) входит во второй степени. Различия в плотности органелл сравнительно небольшие, а ее значения у митохондрий и лизосом частично перекрываются.

Если учесть, что и размеры этих органелл также частично перекрываются, то вправе ожидать сложностей при их раздельном выделении. Чтобы устранить такое нежелательное для разделения митохондрий и лизосом перекрытие, последние подвергают искусственной модификации, вводя *in vivo* некоторые вещества, способные в них накапливаться. Так, нелитический детергент тритон WR-1339 накапливается в лизосомах печени и понижает их плотность при одновременном увеличении размера; «нагружение» лизосом железом или коллоидным золотом, напротив, увеличивает их плотность, а декстраном-500 – размеры. Лизосомы при этом становятся отделимы от митохондрий с помощью центрифугирования.

В целом же следует отметить, что плотность частиц в большой мере зависит от состава среды, в которой они находятся. Частицы могут быть проницаемыми для одних соединений, находящихся в растворе, и непроницаемы для других или же присоединять молекулы раствора, в том числе воды. В этом случае говорят о так называемой плавучей плотности.

2.3. Контроль чистоты фракций и выделение из них химических соединений

Контроль чистоты фракций. Для контроля чистоты выделенных с помощью центрифугирования фракций применяют морфологический (гистологический), химический, иммунологический и ферментный методы.

Сущность морфологического анализа состоит в исследовании под микроскопом суспензии частиц, входящих в данную фракцию, с целью обнаружения в ней загрязняющих структур из других фракций. Для этого применяют фазово-контрастные, обычные световые в сочетании с окраской мазков, а при необходимости и электронные микроскопы.

При химическом анализе чистоты фракций нежелательные примеси обнаруживают путем химического анализа на некоторые вещества, связанные с определенными фракциями. В частности, более 90% массы клеточной ДНК сосредоточено в ядерной фракции, цитохром *c* находится в митохондриальной, а цитохром *b₅* – в микросомальной фракции.

Для обнаружения загрязнения фракции каким-либо индивидуальным веществом (например, индивидуальным белком) это вещество предварительно выделяют и после очистки иммунизируют им лабораторное животное. Затем сыворотку последнего, содержащую антитела к индивидуальному веществу, используют в качестве специфического реагента на это вещество.

Наиболее распространенным и сравнительно доступным является ферментный метод. Он основан на определении активности специфических для определенных фракций ферментов, которые называют индикаторными ферментами (табл. 1.3).

Для получения достоверного результата рекомендуется определять не менее двух индикаторных ферментов для каждой фракции. С целью экономии материала фракций используют микроэкспресс-анализ.

Выделение химических соединений из фракций. Почти все органоиды клетки снаружи ограничены мембраной. Микросомальная фракция содержит фрагменты мембран. Чтобы извлечь содержимое органоидов, необходимо разрушить мембраны. Липиды мембран нерастворимы в воде. Мембраны удерживают на своей поверхности периферические белки, которые растворимы в воде и легко извлекаются, а также интегральные белки, которые расположены глубоко в липидном слое и даже пронизывают его насквозь. Извлечение интегральных белков сопряжено с определенными трудностями. Свои ме-

тоды разработаны для выделения РНК и белков из рибосом, гистонов из хроматина, для разделения олигомерных белков на субъединицы и т.д.

Таблица 1.3

Индикаторные ферменты клеток печени [3]

Субклеточная фракция	Индикаторный фермент
Ядра	НАД-пирофосфорилаза
Митохондрии	Сукцинатдегидрогеназа Цитохромоксидаза Глутаматдегидрогеназа
Лизосомы	Кислая фосфатаза Кислая РНК-аза Кислая ДНК-аза Катепсин Арилсульфатазы А и В β - гликозидаза
Микросомы	Глюкозо-6-фосфатаза Неспецифическая холинэстераза Антимицин-резистентная НАДН-цитохром-с-редуктаза
Клеточный сок	Аланин-аминотрансфераза Альдопаза Лактатдегидрогеназа

Наибольший интерес представляет выделение белков в силу их многообразия и важности выполняемых функций. Было установлено, что около половины белков животной ткани (30-50%) экстрагируется водой, растворами солей, буферными растворами, разбавленными кислотами и щелочами. Эту часть белков принято называть водорастворимыми. Остальные белки преимущественно связаны с мембранами, их удается экстрагировать растворами поверхностно-активных веществ (ПАВ). Белки можно выделять как из гомогената в целом, так и из отдельных субклеточных фракций.

При выделении белков и других соединений из гомогената в целом отпадает требование сохранения целостности органоидов, так как последующего фракционирования не будет. Напротив, в процессе дезинтеграции ткани необходимо основательнее разрушить суб-

клеточные структуры, чтобы облегчить процедуру извлечения химических соединений. Для этого используют растирание пробы в стеклянном гомогенизаторе или ступке с песком, ультразвуковое воздействие, сочетание замораживания – оттаивания с механическими и физическими методами дезинтеграции. Экстракцию интересующих веществ нередко совмещают с операциями разрушения тканей и центрифугированием.

Если необходимо извлечь интересующие соединения из отдельной субклеточной фракции, ее подвергают тем же процедурам, что и гомогенат.

Химическая природа, концентрация и pH экстрагирующих растворов зависят от индивидуальных особенностей выделяемого вещества. В частности, растворы с низкой ионной силой лучше извлекают из мышечной ткани актин, а с высокой ионной силой – миозин. Содержание в растворе пирофосфата натрия и хлористого магния способствует диссоциации актомиозина. Рибосомальные белки выделяют из рибосомальной фракции с помощью растворов LiCl-мочевины или уксусной кислоты, которые способствуют отделению белков от РНК.

Широко используемые для выделения водонерастворимых белков мембран ПАВ представляют собой водорастворимые органические соединения, молекулы которых состоят из двух частей: полярной (гидрофильной) и неполярной (гидрофобной). Различают ионные ПАВ, диссоциирующие в воде на ионы, и неионные. Неионные ПАВ (тритон X-100, нонидет Р-40 и др.) не денатурируют белки и сохраняют, а в некоторых случаях стимулируют и активируют ряд мембранных ферментов. Они также не оказывают влияния на поведение белков при ионообменной хроматографии и электрофорезе. Анионный детергент додецилсульфат натрия (ДДС, ДСН) эффективно растворяет белки, отделяя их от липидов и образуя с теми и другими комплексы. С помощью растворов, содержащих ДДС, удается извлечь до 100% мембранных белков. Белки различного состава насыщаются ДДС, если берутся в соотношении соответственно 1:1,4. Белки денатурируются и приобретают отчетливо выраженную конформацию – спиральные полипептидные цепочки, сложенные пополам в середине. Детергент сообщает всем белкам отрицательный заряд.

Особенно трудной задачей является выделение труднорастворимых белков, например, склеропротеинов (белки покровных и соединительных тканей – кератин, фиброин шелка и др.). В этих случаях после удаления большей части растворимых белков исполь-

зуют устойчивость склеропротеинов к действию пепсина и трипсина, разрушая с их помощью остатки сопутствующих белков. Нередко для изучения отдельных особенностей состава и структуры этих белков приходится заведомо идти на их растворение в условиях, вызывающих частичную фрагментацию белковых молекул (в растворах щелочей, мочевины, бромистого лития, восстановителей, расщепляющих дисульфидные связи, и т.п.).

Специфические трудности возникают при экстракции и анализе белков из вегетативных органов растений. Полифенолоксидазы, попадающие в раствор из растертых тканей, вызывают быстрое окисление тирозиновых остатков. Свободные эндогенные фенолы, и особенно продукты их окисления, могут вызвать нарушение структуры белковой молекулы, изменение активности ферментов. Добавление синтетических полимеров, в частности капронового порошка, позволяет предотвратить окисление природных фенолов за счет их адсорбции на нем. При экстракции растительных белков из объектов, богатых фенольными соединениями, для последующего электрофоретического анализа в полиакриламидном геле в качестве защитных добавок рекомендуются: аскорбиновая кислота, специфический ингибитор полифенолоксидазы – диэтилдитиокарбонат и ЭДТА.

Полярные органические растворители экстрагируют и солибилизируют (солюбилизация – самопроизвольное проникновение низкомолекулярного вещества внутрь мицелл ПАВ или макромолекулярных клубков полимера) мембранные липиды и при этом денатурируют и прерципитируют белки. При применении органических растворителей (хлороформ – метанол, хлороформ – этанол) вместе с водой липиды переходят в органическую фазу, а белки – в водную.

Молекулы ДНК и РНК выделяют из гомогената с помощью водонасыщенного фенола.

Крахмал из размельченных растительных тканей, например из клубней картофеля, экстрагируют водой. После отстаивания крахмала воду сливают, а осадок на 2 часа заливают 10%-ным раствором хлористого натрия для удаления белков. После этого жидкость сливают, а крахмал окончательно отмывают водой.

Извлечение гликогена из крови и тканей животных осуществляют путем обработки исследуемой пробы концентрированной щелочью или трихлоруксусной кислотой с последующим осаждением его спиртом.

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ГЛАВА ТРЕТЬЯ

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБ

Химические методы в биохимии используют прежде всего для выявления в пробах биомолекул и определения количественного содержания их. Кроме того, с помощью этих методов устанавливают строение и химические свойства биомолекул. Использование химических методов или их сочетания с инструментальными методами позволяет количественно оценивать активность ферментов.

Химические методы нередко предшествуют дальнейшему использованию инструментальных методов анализа.

3.1. Белки

Обнаружение белка в биопробах и определение количественного содержания его основано как на общих свойствах, присущих всем белковым молекулам, так и на частных особенностях их состава.

Определение белков. Для качественного обнаружения пептидов используются методы, в основе которых лежат цветные реакции: нингидриновая, ксантопротеиновая, Миллона, Адамкевича, на серу, на остаток аргинина, диазореакция, на присутствие углеводных компонентов и др.

Белки (хотя и в меньшей степени, чем аминокислоты и полипептиды) дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином. Нингидриновая реакция характерна для аминогруппы в α -положении.

При нагревании с крепкой азотной кислотой большинство белков дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при добавлении щелочи или аммиака. Эта реакция, получившая название ксантопротеиновой (или реакции Мульдера), характерна для бензольного ядра циклических аминокислот тирозина и триптофана.

Фенолы и их производные, включая аминокислоту тирозин, при нагревании с реактивом Миллона способны образовывать ртутную соль нитротирозина, окрашенную в пурпурно-красный цвет. Реактив Миллона, именем которого названа данная реакция, готовится на ртути и азотной кислоте.

Реакция Адамкевича основана на способности триптофана в кис-

лой среде реагировать с глиоксиловой кислотой с образованием соединения, окрашенного в красно-фиолетовый цвет.

Белки, содержащие цистеин и цистин, в щелочной среде при нагревании способны образовывать сульфид натрия, который реагирует с плюмбитом натрия с образованием черного или бурого осадка сульфида свинца. Эта реакция на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу, носит имя Фоля.

Белки, содержащие остатки аргинина, с гипобромитом (или гипохлоритом) и α -нафтолом в щелочной среде дают красное окрашивание.

Остатки тирозина, триптофана и гистидина, входящие в состав пептидов, дают оранжево-красное окрашивание с диазореактивом. Диазореакция используется также для количественного определения тирозина и гистидина в белковых гидролизатах.

Белки, содержащие в своем составе углеводные компоненты, в присутствии серной кислоты дают характерное для углеводов фиолетовое окрашивание с α -нафтолом (реакция Молиша) или красное окрашивание с тимолом.

При 15-20-минутном нагревании на кипящей водяной бане щелочного раствора дезоксирибонуклеопротеида с дифениламиновым реактивом образуется синяя окраска, принадлежащая продукту реакции между дезоксирибозой и дифениламином.

Существуют специфические цветные реакции на простетические группы и других белков, в частности на геминовую группу гемопротеидов.

Количественное определение белка в биологическом материале нередко начинают с перевода его в осадок с помощью различных осадителей (трихлоруксусной или хлорной кислот, солей тяжелых металлов и др.). В случае использования для этой цели трихлоруксусной кислоты CCl_3COOH (ТХУ) ее добавляют к исследуемому раствору из расчета, чтобы ее конечная концентрация составила 3-4%. После тщательного перемешивания раствор оставляют на 10-20 мин. Выпавший осадок белка отделяют центрифугированием и промывают на центрифуге 2%-ным раствором ТХУ. К осадку добавляют 1-2 мл одномолярного раствора щелочи и осторожно подогревают до растворения осадка. Раствор количественно переносят в мерную колбу (на 25 или 50 мл), доводят водой до метки, тщательно перемешивают и проводят определение белка.

Наиболее типичным и универсальным является метод, использующий биуретовую реакцию (реакцию Пиотровского). Он основан на способности пептидной группы ($-\text{CO}-\text{NH}-$) белков, полипептидов

и олигопептидов (вплоть до трипептидов) образовывать в щелочной среде с ионами меди комплексное соединение фиолетового цвета с красным или синим оттенком в зависимости от числа пептидных связей в молекуле. Количественное определение производят колориметрическим методом при длине волны 540-650 нм. Для анализа достаточно 1 мл раствора, содержащего 1-10 мг белка.

Для микроопределения белка (0,1-2 мг) используют реактив Бенедикта, который представляет собой модификацию биуретового реактива.

Наиболее чувствительным является метод Лоури, основанный на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Он позволяет определить белок в количестве 10-100 мкг. Колориметрирование осуществляют при длине волны 750 или 500 нм.

Помимо рассмотренных колориметрических методов (биуретового, микробиуретового, по Лоури), совмещающих химический и инструментальный методы, для количественного определения белка используют и классические химические методы. К их числу относится определение белка по азоту, содержание которого для большинства белков одинаково и может быть принято равным 16%. Начальной операцией этого метода является минерализация пробы. Минерализацию осуществляют в колбе Кьельдаля, нагревая пробу, содержащую 10-20 мг белка, в присутствии небольшого количества (0,5 мл) концентрированной кислоты на газовой горелке или электрической плитке. Белок по азоту окисляется до аммиака, который реагирует с серной кислотой, образуя сульфат аммония. После минерализации пробы содержимое колбы Кьельдаля количественно переносят в мерную колбу (на 25 или 50 мл), осторожно нейтрализуя ее содержимое до слабокислой реакции. Следующую операцию – определение в этом растворе химически связанного аммиака – часто осуществляют путем изотермической перегонки его в чашке Конвея (рис. 2.1).

Последняя имеет две камеры – центральную и наружную кольцевую с перегородкой. Во внутреннюю камеру вводят 1 мл 1/100–1/200 н раствора серной или соляной кислоты. После этого чашку слегка наклоняют в сторону перегородки и с одной стороны от нее пипеткой вводят 1 мл раствора из мерной колбы, а с другой – 1 мл насыщенного раствора углекислого кальция. Затем чашку герметично накрывают стеклянной пластиной, переводят ее (чашку) в горизонтальное положение и вращательными движениями перемешивают содержимое кольцевой камеры. Чашку ставят на 2 часа в термостат (37°) для осуществления изотермической перегонки аммиака из кольцевой камеры в центральную, где он поглощается кислотой. Параллельно такой же опыт проводят с контрольной чашкой, в которую вместо исследуемого

раствора вводят 1 мл дистиллированной воды. После завершения перегонки жидкость во внутренней камере титруют 1/200 н раствором щелочи в присутствии индикатора Ташира (смесь метилового красного и метиленовой сини) до появления зеленого оттенка. По разности объемов щелочи, пошедшей на титрование содержимого центральных камер контрольной и опытной чашек, рассчитывают содержание аммиака в исследуемой пробе белка, а затем и самого белка.

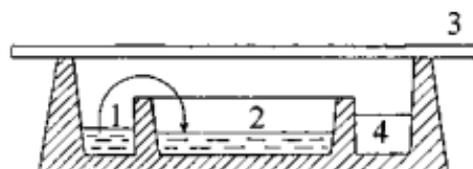


Рис. 2.1. Изотермическая перегонка аммиака (показана стрелками) в чашке Конвея: 1 – кольцевая камера; 2 – центральная камера; 3 – стеклянная пластинка; 4 – перегородка кольцевой камеры

Чашки Конвея обычно отливают из парафина в специальных формах. Конструкция разъемной формы, изготовленной из алюминиевого сплава, представлена на рис. 2.2.

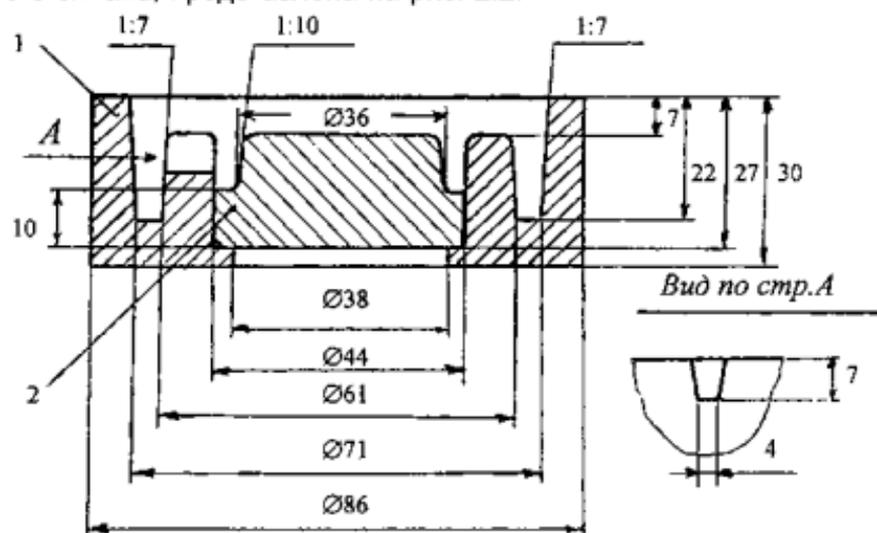


Рис. 2.2. Форма для отливки чашек Конвея [5]: 1 – корпус; 2 – выталкиватель. Выталкиватель соединен с корпусом по скользящей посадке

Перед заливкой парафина внутренние поверхности формы с помощью ватного тампона протирают вазелином. Для быстрого застывания парафина залитую форму помещают в посуду с холодной водой. Отливку после затвердевания освобождают от формы. Для этого нажимают снизу на выталкиватель, извлекают его из корпуса вместе с чашкой Конвея, которую затем снимают с выталкивателя.

Герметичное прилегание стеклянной пластины к парафиновой чашке достигается притиранием слегка нагретой пластины к торцу чашки и последующей смазкой его вазелином.

Среди методов количественного определения белка в пробе следует назвать весовой, при котором его осаждают, осадок тщательно промывают, высушивают и взвешивают.

Аминокислотный состав белков. Следующая задача анализа белка – определение аминокислотного состава белковой фракции или молекулы индивидуального белка. Для индивидуальных белков разработаны методы выделения их из биологических проб в чистом (кристаллическом) виде. Чтобы превратить белок в смесь аминокислот, его навеску гидролизуют. Чаще всего белки гидролизуют нагреванием с минеральными кислотами (например, с 5 н раствором соляной или серной кислоты) или со щелочью (5 н раствором гидроксида натрия) в течение нескольких часов при температуре 100-110°. Если гидролиз проводят с соляной кислотой, то после его завершения гидролизат упаривают до состояния густого сиропа, затем разводят водой и упаривают при 60-70° (трижды) для полного удаления HCl. В полученной смеси аминокислот определяют содержание каждой из них по отдельности, используя специфические, обычно цветные реакции, с последующим фотометрированием при определенных длинах волн.

Ферментативная кинетика. Ферменты в пробе обычно выявляют с помощью субстратов, которые ферменты превращают в окрашенные продукты. Для этого фермент не обязательно выделять из гомогената или субклеточной фракции. По активности фермента, которая выражается через скорость реакции, можно судить об изменении его содержания при различных физиологических состояниях, если реакцию проводить в стандартных условиях. Задачи кинетики корректнее решать, работая с чистыми ферментами, при этом определение скорости реакции сводится к нахождению концентрации продукта (или субстрата) в начале и конце реакции химическими методами, нередко дополняемыми последующим фотометрированием. Так, активность каталазы можно определять по объему выделившегося кислорода (газометрически), манганометрическим методом (с использованием титрования) и сочетанием химического метода с фотометрией

(по изменению интенсивности окраски, которую дает продукт реакции перекиси водорода с солями молибдена). В первом методе ведут учет образовавшегося продукта реакции (кислорода), во втором и третьем – расходуемого субстрата (перекиси водорода).

3.2. Углеводы

Качественные реакции на углеводы. Очень чувствительными реакциями на обнаружение углеводов и углеводных компонентов в более сложных веществах (например, гликопротеидах) являются реакции с α -нафтолом или тимолом в присутствии концентрированной серной кислоты. Реакция с α -нафтолом (Молиша) дает характерное фиолетовое, с тимолом – красное окрашивание. Окраску с α -нафтолом или тимолом дают фурфурол и его производные, которые образуются из углеводов под действием концентрированной серной кислоты.

Крахмал легко обнаруживается по образованию продукта синего цвета при взаимодействии с йодом. Для этой цели используют раствор йода в йодистом калии (Люголя).

Гликоген окрашивается раствором Люголя в красно-бурый цвет.

Все моносахариды, а также более сложные сахара (включая большинство дисахаридов), имеющие свободную карбонильную (альдегидную, кетонную или гидроксильную, образующуюся на месте карбонильной в циклической форме сахара) группу, обладают способностью восстанавливать металлы (медь, висмут, серебро, железо и др.) в щелочной среде (сахароза, крахмал такой способностью не обладают). На этой их способности основаны реакции Троммера и с фелинговой жидкостью, при которых происходит восстановление окисной формы меди в закисную, а также реакция Ниландера, сопровождающаяся превращением гидроокиси висмута до металлического висмута.

Фруктоза и другие кетогексозы дают вишнево-красное окрашивание при нагревании с соляной кислотой и резорцином (реакция Селливанова).

Пентозы при кипячении с кислотами в присутствии следов хлорида железа дают зеленое окрашивание с орцином (реакция Биалья) и красное – с флороглюцином.

Количественное определение углеводов. На способности глюкозы восстанавливать окисленное железо основан метод Хагедорна-Иенсена, применяемый для ее количественного определения. Однако он не специфичен и может быть использован также для оп-

ределения других моносахаридов (и некоторых дисахаридов), хотя в этом случае при расчетах необходимо вводить соответствующие поправки. Глюкоза, содержащаяся в биопробе, восстанавливает Fe^{3+} , находящееся в молекуле красной кровяной соли ($K_3[Fe(CN)_6]$), до Fe^{2+} . Образующуюся желтую кровяную соль ($K_4[Fe(CN)_6]$), содержащую восстановленное железо, с помощью сернистого цинка переводят в нерастворимое состояние. Для анализа берут известное количество титрованного раствора красной кровяной соли в избытке. После осаждения желтой кровяной соли в реакционном объеме создают кислую среду и добавляют йодистый калий, при этом оставшаяся невосстановленной красная кровяная соль превращается в желтую кровяную соль, выделяя эквивалентное количество свободного йода, который оттитровывают гипосульфитом, а затем производят соответствующий расчет.

В ортотолуидиновом методе определения глюкозы получают окрашенное (сине-зеленое) соединение, образующееся при нагревании глюкозы с орто-толуидином в растворе уксусной кислоты. Окрашенное соединение затем фотометрируют.

Особую группу представляют ферментные методы количественного определения веществ. Для количественного определения глюкозы используется смесь глюкозооксидазы и пероксидазы. Глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы до глюконолактона, который спонтанно гидролизует в глюконовую кислоту. Одновременно образуется перекись водорода, которая в присутствии пероксидазы окисляет хромогенный кислородный акцептор (например, орто-дианизидин). Количественное определение глюкозы сводится к фотометрированию окрашенного соединения, образующегося при окислении орто-дианизидина.

Для количественного определения фруктозы используют упомянутую выше реакцию Селиванова, дополняя ее фотометрированием полученного окрашенного раствора.

Количество пентозы в биопробе определяют по методу Мейбаум, основанному на реакции Биаля (см. выше), дополненной фотометрированием окрашенного в зеленый цвет соединения, образующегося при взаимодействии пентозы с орцином.

Количественное определение крахмала путем фотометрирования окрашенного соединения, полученного в реакции с йодом, недостаточно точно, поскольку взаимодействие последнего с амилозой и амилопектином, соотношение которых в крахмале не является постоянным, происходит по-разному. Применение этого метода оправдано для сравнительных измерений.

Наиболее достоверные результаты получают путем определения

содержания глюкозы, образовавшейся при гидролизе крахмала с участием амилазы. Существуют и другие методы количественного определения крахмала.

Для определения содержания гликогена наиболее часто используют реакцию с антроновым реактивом или с фенолом и серной кислотой. Оба метода не требуют предварительного гидролиза гликогена. При работе с антроновым реактивом получают соединение, окрашивающее раствор в синий цвет, который фотометрируют.

Универсальный метод количественного определения клетчатки (по Кюршнеру и Ганеку) основан на окислении, разрушении и растворении различных химических соединений, входящих в пробу, смесью уксусной и азотной кислот. При этом клетчатка практически не растворяется. После отфильтровывания и промывки ее сушат и взвешивают.

3.3. Нуклеиновые кислоты

Химические методы, как правило в сочетании с фотометрией и хроматографией, позволяют определить количественное содержание РНК и ДНК, а также установить их нуклеотидный состав.

Для определения нуклеиновых кислот в биологических пробах существует много способов. Все они основаны либо на колориметрическом определении окрашенных с помощью специфических реагентов углеводов (рибозы, дезоксирибозы) и фосфорной кислоты, либо на непосредственном измерении поглощения ультрафиолетовых лучей (УФЛ) в определенном диапазоне азотистыми основаниями нуклеиновых кислот.

Суммарное содержание нуклеиновых кислот. Его определяют в свежей или фиксированной биологической пробе. Определению предшествует отделение фосфора кислоторастворимой фракции (растворами ТХУ) и фосфолипидов (органическими растворителями). Очищенную суммарную фракцию нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) минерализуют путем нагревания с серной кислотой, в результате чего получают ортофосфорную кислоту. Сущность определения фосфора колориметрическим методом Фиске-Суббароу заключается в том, что ортофосфорная кислота образует с молибденовой кислотой комплексное соединение, которое легко восстанавливается различными восстановителями с образованием окрашенного в синий цвет соединения (молибденовой сини). В качестве восстановителя в методе Фиске-Суббароу применяют 1-амино-2-нафтол-4-сульфоновою кислоту (эйконоген). Окрашенный раствор фотометрируют при красном светофильтре.

Раздельное определение ДНК и РНК. Для этой цели можно использовать метод Шмидта-Таннгаузера, который предусматривает разделение ДНК и РНК. Сущность его состоит в щелочном гидролизе РНК и отделении от гидролизата раствором хлорной кислоты ДНК (выпадает в осадок). Осадок ДНК гидролизуют в растворе хлорной кислоты на кипящей водяной бане. Содержание РНК и ДНК определяют путем фотометрирования их гидролизатов в УФ-области.

Для фотометрирования в видимом диапазоне спектра используют цветные реакции на рибозу и дезоксирибозу. Метод определения РНК по Мейбаум основан на реакции рибозы с орциновым реактивом, дающей продукт зеленого цвета. ДНК определяют по методу Дише, в котором к ее гидролизату добавляют раствор дифениламина, дающего после нагревания на кипящей водяной бане синее окрашивание.

Определение нуклеотидного состава. Гидролизат ДНК или РНК подвергают разделению на нуклеотиды с помощью хроматографии или электрофореза. Идентификацию нуклеотидов осуществляют с помощью так называемых свидетелей (разделение в таких же условиях чистых препаратов нуклеотидов). Нуклеотидные фракции после хроматографии (или электрофореза) элюируют. Количественное содержание их находят путем замера экстинкции элюатов при характерных длинах волн λ_{\max} (им соответствует максимум поглощения света $E_{\lambda_{\max}}$). Молярную концентрацию нуклеотида C в пробе вычисляют по формуле

$$C = E_{\lambda_{\max}} \cdot V / (K \cdot 10^{-3}),$$

где $K \cdot 10^{-3}$ – молярный коэффициент экстинкции; V – объем пробы (мл).

Так, для аденилового нуклеотида $\lambda_{\max} = 257$ нм, $K \cdot 10^{-3} = 15,1$; соответственно для гуанилового нуклеотида эти величины равны 256 нм и 12,2, для уридилового – 262 нм и 10,0, для цитидилового – 280 нм и 13,0.

3.4. Липиды

К липидам относят жиры и жироподобные вещества (липоиды).

Качественные реакции. Одним из способов обнаружения жиров, в состав которых входит глицерин, является постановка акролеиновой пробы. При нагревании жира с сухим порошком кислого сернокислого калия глицерин теряет воду и образует ненасыщенный аль-

дегид – акролеин, который выделяется в виде густого белого пара, имеющего резкий раздражающий запах. Фильтровальная бумага, смоченная раствором фуксин-сернистой кислоты, под действием этих паров приобретает ярко-розовую окраску.

Лецитины (фосфатидилхолины), которые относятся к фосфолипидам, растворенные в спирте, при добавлении насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия образуют с ним комплексное соединение, дающее белый хлопьевидный осадок.

Одним из тестов на холестерин, который относится к стероидам, является реакция с серной кислотой (Сальковского). После добавления серной кислоты к хлороформному раствору холестерина, осторожного встряхивания пробирки и отстаивания жидкости образуется верхний хлороформный слой красного цвета и нижний – желто-красного цвета с зеленой флуоресценцией.

В лабораторной практике применяются и другие реакции для обнаружения многообразных представителей липидов.

Количественное определение. Наиболее простым методом определения суммарных липидов в тканях является длительное настаивание биопробы в хлороформ-метанольной смеси. Процентное содержание липидов находят по разности масс пробы до и после экстракции.

Другой метод выделения и количественного определения липидов в тканях растений и животных как бы дополняет предыдущий. Липиды из размельченной биопробы извлекают смесью метанола и хлороформа, которая разрушает липопротеидные комплексы, что способствует достаточно полному извлечению липидов. Добавляя после гомогенизации ткани со смесью метанола и хлороформа в гомогенат избыток хлороформа и воды, получают двухфазную систему, у которой практически все липиды оказываются растворенными в хлороформе. Отбирают в бюкс определенный объем этого хлороформа, выпаривают его досуха, осадок высушивают в вакуум-эксикаторе до постоянной массы, взвешивают и производят расчет содержания липидов во всей биопробе.

Количественный анализ биопроб на содержание фосфолипидов осуществляют в следующей последовательности. Из размельченной пробы смесью хлороформа с этанолом (2:1) экстрагируют липиды. После ряда промежуточных процедур из экстракта ацетоном осаждают фосфолипиды. Последние с помощью тонкослойной хроматографии разделяют на фракции. Их идентификацию осуществляют с использованием цветных реакций: лецитины – с помощью реактива Драгендорфа (содержит нитрат висмута), при этом пятна окрашиваются в

оранжевый цвет; гликолипиды – с помощью дифениламина, который дает светло-голубое окрашивание; инозитфосфатиды окрашиваются смесью AgNO_3 , NH_3 и NaOH в черный цвет; фосфатидилсерины при взаимодействии с 0,5%-ным раствором нингидрина дают красное окрашивание. Количественное определение фракций фосфолипидов производят путем отдельного соскабливания их (вместе с сорбентом) с пластинки, элюирования системой хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода, минерализации элюата в колбе Кьельдаля серной кислотой и пергидролем, получения окрашенного раствора после добавления к минерализованному содержимому молибденовокислого аммония и фотометрирования этого раствора при 820 нм (количественное определение фосфолипидов по фосфору). Подробнее эта методика изложена в [2].

Количественное определение холестерина (холестерола) осуществляют с использованием цветной реакции Либермана-Бурхарда. Из навески размельченной биопробы (например, головного мозга) спирто-эфирной смесью экстрагируют холестерин. Затем экстракт фильтруют, экстрагент (спирто-эфирную смесь) выпаривают на водяной бане досуха, а остаток после выпаривания растворяют в хлороформе и проводят цветную реакцию на холестерин. Для этого в раствор холестерина добавляют уксусный ангидрид и небольшое количество серной кислоты. Через некоторое время раствор приобретает зеленую окраску, интенсивность которой измеряют на фотоэлектроколориметре при 656 нм. Количество холестерина в пробе определяют с помощью калибровочного графика.

Определение химических параметров жиров. К их числу относятся насыщенность, кислотное число и число омыления жиров.

Насыщенность жира обусловлена присутствием в его составе непредельных жирных кислот. Последние легко присоединяют по два атома галогена по месту каждой двойной связи. Принято степень ненасыщенности выражать йодным числом, равным количеству граммов йода, которое химически связывается со 100 г жира. Жир (масло) растворяют в спирте, добавляют титрованный спиртовой раствор йода, приливают дистиллированную воду и все это перемешивают путем встряхивания колбы. Затем ее содержимое оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата, причем в качестве индикатора используют раствор крахмала (титруют до исчезновения синего окрашивания). За контроль берут описанную выше смесь, но без жира. Количество йода, присоединившегося по месту двойных связей, вычисляют через разность объемов тиосульфата, пошедшего на титрование контроля и опыта (пробы жира).

Кислотное число характеризует кислотность жира, которая обусловлена наличием в нем свободных жирных кислот. Оно измеряется количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для

нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира. В качестве цветного индикатора используют раствор фенолфталеина.

Числом омыления называется количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации суммы свободных и связанных с глицерином жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Навеску жира помещают в колбу со спиртовым раствором гидроксида калия и нагревают. По окончании омыления содержимое опытной колбы титруют в присутствии фенолфталеина раствором соляной кислоты. Аналогичные операции проводят с контрольным раствором, в который вместо жира добавили такой же объем воды. Число омыления вычисляют по разности объемов соляной кислоты, пошедшей на титрование контрольного и опытного растворов.

Эфирное число, равное количеству миллиграммов гидроксида калия, необходимому для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот в 1 г жира, определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

3.5. Витамины и гормоны

Как витамины, так и гормоны представляют собой группы различных в химическом отношении соединений, для обнаружения и количественного определения которых не существует единых типичных реакций. Как правило, для каждого из этих соединений применяют свои химические методы, основанные на особенностях строения их молекул.

В качестве примера рассмотрим химические методы обнаружения и количественного определения аскорбиновой кислоты (витамина С) и адреналина (гормона мозгового вещества надпочечников).

Витамин С. Качественные реакции основаны на способности витамина С легко вступать в окислительно-восстановительные реакции, в частности восстанавливать метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол и другие соединения. При добавлении к биопробе, содержащей витамин С, раствора метиленовой сини, последний обесцвечивается. Аналогичный эффект наблюдается и при добавлении к биопробе раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола – розовая окраска последнего исчезает. В обоих случаях происходит восстановление окрашенных веществ аскорбиновой кислотой, которые в восстановленной форме не имеют окраски.

При количественном определении витамина С растительную пробу измельчают, растирают в ступке с песком в присутствии раствора метафосфорной кислоты, которая экстрагирует витамин. После фильтрации экстракта его титруют раствором дихлорфенолиндофенола (до появления розовой окраски), а затем рассчитывают концентрацию витамина С.

Адреналин. Химические свойства адреналина определяются наличием в структуре его молекулы пирокатехинового кольца. Как и все двухатомные фенолы, адреналин является сильным восстановителем.

Адреналин в пробе обнаруживают с помощью цветных реакций. Так, с раствором йодата калия в присутствии уксусной кислоты он дает красно-фиолетовое окрашивание. С раствором хлорного железа адреналин дает изумрудно-зеленое окрашивание, постепенно переходящее в желтоватое.

Количественное определение адреналина осуществляют по методу Фолина, основанному на колориметрическом определении интенсивности синего окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина. Окраску исследуемого раствора сравнивают с окраской стандартного раствора адреналина, обработанного тем же способом. Реактив Фолина состоит из солей фосфорновольфрамовой и фосфорномолибденовой кислот. Эти соли при взаимодействии с фенолом и полифенолами восстанавливаются с образованием более низких окислов металлов, комплексы которых окрашены в синий цвет.

3.6. Минеральные вещества

Количественное определение минеральных веществ в биологической пробе, как правило, определяют после ее минерализации.

Наиболее простым способом минерализации является сжигание пробы. Однако при этом ряд соединений фосфора, серы, галогенов и щелочных металлов улетучивается. Поэтому для количественного определения этих элементов применяют мокрое сжигание в серной или азотной кислоте (либо в их смеси).

Суммарное количество золы определяют гравиметрическим методом (ее взвешиванием) после сжигания пробы.

Количественное определение химических элементов в пробе производят с использованием характерных для каждого из них реакций, в большинстве случаев завершающихся образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски, а следовательно, и содержание минерального вещества определяют фотометрированием окрашенного раствора. Реже для количественного определения химических элементов используется титрование.

Характерные реакции на химические элементы описаны в книгах по аналитической химии, а соответствующие биохимические методы лишь учитывают некоторые особенности конкретных биохимических проб.

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ГЛАВА ЧЕТВЕРТАЯ

ХРОМАТОГРАФИЯ

4.1. Общие принципы и классификация хроматографических методов

Термином хроматографический анализ или просто – хроматография называют обширную группу методов, позволяющих анализировать и фракционировать смеси веществ различной химической природы. В основе этих методов лежат разные физические и химические процессы. Тем не менее существует ряд общих характерных свойств, позволяющих объединить их в общую большую группу.

Во всех хроматографических методах имеются две фазы. Одна из них неподвижна, а другая перемещается относительно первой и увлекает хроматографируемое вещество, которое непрерывно распределяется между этими фазами. Скорость перемещения каждого из компонентов разделяемой смеси определяется соотношением степеней сродства их к неподвижной и подвижной фазам. Различие в значениях этого соотношения обуславливает разную скорость миграции компонентов, благодаря чему они пространственно отделяются друг от друга, образуя обособленные хроматографические зоны (в дальнейшем – просто зоны) в направляющей системе, роль которой выполняют трубки (колонки) с наполнителем, тонкие слои порошка на пластинках, полоски специальной бумаги и т.д.

Существует ряд критериев, по которым классифицируют хроматографические методы. Наиболее существенный из них – природа явления, лежащего в основе разделения смеси веществ. Согласно этой классификации выделяют следующие виды хроматографии: адсорбционную, молекулярно-ситовую, ионообменную, распределительную, осадочную и аффинную.

В основе адсорбционной хроматографии лежит сорбция разделяемых веществ на поверхности твердых тел (например, гранул наполнителя колонки).

Молекулярно-ситовая хроматография основана на распределении молекул между подвижной фазой и точно такой же жидкостью,

находящейся во внутренних, соизмеримых с размерами молекул пористых частиц.

Разделение смеси с помощью ионообменной хроматографии осуществляется путем обратимого обмена ионов смеси с ионами твердой неподвижной фазы (матрицы).

В распределительной хроматографии разделение смеси происходит за счет неодинакового распределения ее компонентов между смешивающимися жидкими фазами – подвижной и неподвижной.

Осадочная хроматография основана на различии в растворимости образующихся осадков компонентов разделяемой смеси.

В основе аффинной хроматографии лежит биологическая специфичность хроматографируемых молекул, благодаря которой они обратимо связываются с особым образом подготовленной поверхностью матрицы.

По конструктивному исполнению хроматографического метода выделяют хроматографию на колонке, в тонком слое, на бумаге, пленке и др.

При разделении веществ на колонке ее заполняют неподвижной фазой. Затем через колонку пропускают подвижную фазу, увлекающую за собой компоненты смеси. Подвижная фаза перемещается по колонке под действием своего веса или прокачивается насосом.

В тонкослойной хроматографии (ТСХ) тонкий слой пористого материала располагается на поверхности стеклянной пластинки или тонкого алюминиевого листа. Подвижная фаза перемещается под действием капиллярных сил и увлекает в направлении своего движения молекулы разделяемых веществ, смесь которых была предварительно нанесена на тонкий слой.

Хроматография на бумаге напоминает ТСХ. Разделение происходит на полоске или листе фильтровальной (или специальной) бумаги, которая выполняет роль своего рода тонкого слоя.

Хроматография на пленках сходна с хроматографией на бумаге. В ней вместо бумаги используют пленки из модифицированной целлюлозы, полиамидные и другие пленки.

Возможна классификация хроматографических методов по величине давления подаваемой в колонку жидкости, по направлению движения растворителя в хроматографии на бумаге (восходящая, нисходящая, горизонтальная), форме его фронта (линейная, секторная, круговая) и т.д. Кроме того, при разделении смеси на бумаге, пленке и в тонких слоях хроматографию классифицируют на одномерную и двухмерную.

Существенным параметром хроматографического процесса яв-

ляется масса разделяемой пробы. Если она мала, то хроматография является аналитической. Она позволяет осуществить качественный и количественный анализ пробы, но не дает в количествах, достаточных для дальнейшего исследования, разделенные компоненты смеси, как это имеет место в препаративном варианте хроматографии.

В зависимости от того, в каком агрегатном состоянии находится подвижная фаза (и анализируемая проба в колонке), различают жидкостную и газовую хроматографию.

Поскольку названные критерии классификации характеризуют разные свойства хроматографического процесса, хроматография может быть, например, одновременно ионообменной, «колоночной», аналитической и, естественно, жидкостной. Возможны и другие варианты названий.

4.2. Адсорбционная хроматография

Адсорбционную хроматографию в зависимости от агрегатного состояния пробы разделяют на жидкостную и газовую.

4.2.1. Жидкостная адсорбционная хроматография

Теоретические основы метода. Сорбцией, которая лежит в основе адсорбционной (молекулярно-адсорбционной) хроматографии, называют поглощение газов, паров и растворенных веществ твердыми и жидкими поглотителями. Термин «сорбция» происходит от латинского слова *sorbeo*, которое означает – поглощаю, втягиваю.

Она подразделяется на адсорбцию, абсорбцию, хемосорбцию и капиллярную конденсацию.

Адсорбция – поглощение веществ поверхностью твердого или жидкого тела.

Абсорбция – поглощение газов, паров или растворенных веществ всем объемом твердой или жидкой фазы.

Хемосорбция – поглощение веществ твердыми или жидкими сорбентами с образованием химических соединений.

Капиллярная конденсация – образование жидкой фазы в порах и капиллярах твердого сорбента при поглощении паров вещества.

Выделение веществ, поглощенных сорбентом, называется десорбцией. Все виды сорбции, за исключением хемосорбции, обратимы, то есть при соответствующих условиях (нагревании, изменении pH и т.д.) сорбенты способны выделять поглощенное вещество. Хемосор-

бция, как правило, необратима, так как при ней образуются устойчивые химические соединения.

Адсорбция вещества обусловлена наличием на поверхности адсорбента различного рода полей, удерживающих адсорбируемые молекулы, попавшие в зону действия этих полей. Сюда относятся: дипольные взаимодействия, которые возникают в результате действия электрического поля, существующего в ближайшей окрестности молекулы сорбента или вещества, или их обоих, если по своей структуре они представляют собой постоянные диполи; Ван-дер-Ваальсовы силы притяжения, действующие на очень малых расстояниях и возникающие в результате тенденции электронов близлежащих молекул двигаться в фазе друг с другом; водородные связи, которые действуют на больших расстояниях; ионные связи, которые обусловлены силами электростатического взаимодействия, проявляющимися на значительных расстояниях.

В связи с наличием такого разнообразия взаимодействий молекулы практически всех веществ в той или иной мере удерживаются поверхностью адсорбента. Теория адсорбции была разработана американским ученым, лауреатом Нобелевской премии И. Ленгмюром (1881-1957). Согласно этой теории, в результате действия силовых полей адсорбента на молекулы, находящиеся вблизи его поверхности, образуется насыщенный мономолекулярный адсорбционный слой, в котором молекулы плотно расположены одна рядом с другой. Адсорбированные молекулы совершают колебательные движения, при этом некоторые из них могут оторваться и снова перейти в жидкую или газовую среду, и наоборот. В результате одновременно протекающих процессов адсорбции и десорбции наступает динамическое равновесие



где А – адсорбируемая молекула, В – адсорбент, АВ – «адсорбционное соединение» (адсорбат). Различные вещества одним и тем же адсорбентом поглощаются в разных количествах. Последнее зависит также от значения удельной поверхности, под которой подразумевают истинную, участвующую в адсорбции поверхность одного грамма адсорбента. У хороших адсорбентов она достигает сотен квадратных метров, главным образом за счет их пористости.

Адсорбция молекул существенно зависит от пористой структуры адсорбента. Для активированных углей различают три разновидности пор: макропоры, играющие роль крупных транспортных артерий для

молекул адсорбируемых веществ; переходные поры, заполняющиеся при сорбции паров органических веществ путем капиллярной конденсации; микропоры, которые образуются вследствие не вполне упорядоченного пространственного расположения шестичленных колец из атомов углерода и не доступны для крупных молекул. Поскольку удельная поверхность макропор составляет не более 1-2 м²/г, основная доля молекул адсорбируется переходными порами. Силикагели обладают однопористой (монодисперсной) структурой.

Различные участки поверхности адсорбента обладают неодинаковой адсорбционной способностью. Вначале адсорбция идет на наиболее активных местах поверхности. Менее активные участки способны удерживать адсорбированные молекулы только при сравнительно низкой температуре, когда энергия колебательного движения их мала.

Количество поглощенного вещества, кроме поверхности адсорбента, зависит от температуры и концентрации сорбируемого вещества. Чем выше температура (T), тем меньше сорбируется вещества; чем выше концентрация вещества (c) в окружающей адсорбент среде, тем большее количество его адсорбируется (a). Эта зависимость при постоянном значении температуры выражается уравнением Ленгмюра:

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

где a_{∞} – максимально возможное при данной температуре количество адсорбированного вещества; b – константа, характеризующая поверхностную активность адсорбируемого вещества по отношению к данному адсорбенту.

Кривая, построенная на основании уравнения Ленгмюра, напоминает график Михаэлиса-Ментен и называется изотермой адсорбции (рис. 3.1). Каждой температуре соответствует своя изотерма адсорбции.

Сорбируемость веществ на конкретном адсорбенте зависит от их химической природы. Так, органические соединения ориентировочно можно расположить в следующий адсорбционный ряд (по убыванию сродства к адсорбенту): кислоты – спирты, amino- и тиосоединения – альдегиды, кетоны, эфиры – галоидные соединения – ненасыщенные углеводороды – насыщенные углеводороды.

Адсорбенты. По химическому составу и физико-химическим свойствам применяемые в хроматографии адсорбенты существенно различаются между собой.

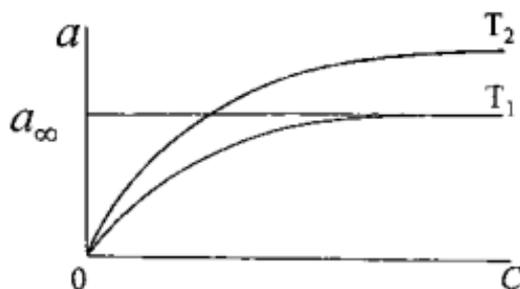


Рис. 3.1. Изотермы адсорбции ($T_2 > T_1$)

Активный (активированный) уголь. Сырьем для него является древесина или каменный уголь. В хроматографии обычно используют уголь из березы или бука. Его получают путем сухой перегонки древесины и последующего активирования угля при высокой (до 1000°) температуре перегретым водяным паром в течение нескольких десятков часов. Структура активного угля в целом повторяет структуру исходной древесины, ее клетки и капилляры. Используется для очистки буферных или солевых растворов от разного рода низкомолекулярных органических примесей. Он является гидрофобным сорбентом. В хроматографии применяется ограниченно ввиду плохой воспроизводимости его сорбционных характеристик.

Силикагель. Представляет собой высушенную желатинообразную двуокись кремния. Исходным веществом для его получения является силикат натрия («жидкое стекло», силикатный канторский клей). В результате воздействия на силикат натрия серной кислоты в конечном счете образуется силикагель. Он является гидрофильным сорбентом. Применяется в хроматографии относительно малых органических молекул, для которых в качестве элюентов используются органические растворители.

Оксид алюминия. Получают путем прокаливания при высокой температуре гидроксида алюминия, образующейся в результате протекания химической реакции между хлоридом алюминия и гидроксидом натрия. Сорбент представляет собой порошок белого цвета. Как и силикагель, является гидрофильным сорбентом. Широко применяется в жидкостной хроматографии, особенно при разделении окрашенных соединений, которые хорошо видны на белом фоне сорбента.

Цеолиты. Представляют собой алюмосиликаты щелочных и щелочноземельных металлов искусственного или природного происхождения.

Искусственным путем цеолит получают путем смешивания едкого натра, силиката и алюмината натрия. Образующийся гель кристаллизуют при 100°, а полученный кристаллический порошок промывают на фильтре, смешивают с глиной, формируют в виде гранул, которые обжигают при 600°.

Цеолиты естественного происхождения изготавливают из кизельгура (целит, трепел, диатомовая земля, инфузорная земля), представляющего собой осадочную горную породу, состоящую из окаменевших панцирей древних диатомовых водорослей. Состоят из двуокиси кремния (90%), окиси алюминия (4%), окислов других металлов, в том числе окислов железа (1,4%). Последние удаляют путем обработки кизельгура 10%-ной соляной кислотой, затем его сушат при 110° и перемалывают до нужного размера.

Цеолиты гидрофильны, химически инертны и обладают высокой адсорбционной способностью.

Оксиапатит. Может быть представлен брутто-формулой $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Получают искусственным путем из хлорида кальция и двузамещенного фосфата натрия в виде мелких хрупких кристаллов. Используется в качестве сорбента для белков и нуклеиновых кислот.

Из неорганических адсорбентов используются также карбонат кальция (мел), оксиды цинка, магния, различные сорта глин и др.

Среди органических адсорбентов пригодными для молекулярной хроматографии являются сахароза, молочный сахар, целлюлоза, крахмал, полиамидные порошки.

При выборе адсорбента для разделения компонентов смеси необходимо учитывать их полярность и помнить, что полярные вещества лучше адсорбируются на полярном адсорбенте, а неполярные – на неполярном адсорбенте.

Активный уголь является неполярным (гидрофобным) адсорбентом, силикагель, окись алюминия и другие гидрофильные вещества – полярными адсорбентами.

Элюенты. Подвижная фаза (элюент, подвижный растворитель) выбирается с учетом химической природы разделяемых веществ и адсорбента. Элюенты условно разделяют на неполярные или малополярные (петролейный эфир, бензин, бензол и др.) и полярные (вода, этанол, уксусная кислота и др.). Их элюирующую способность оценивают показателем, который называют элюирующей силой. Расположение растворителей в порядке возрастания элюирующей силы дает так называемые элюотропные ряды. Так, для всех полярных адсорбентов имеет место одинаковый порядок изменения (возрастания) элюирующей силы (фрагмент):

n-пентан – циклогексан – циклопентан – сероуглерод – изопропиловый эфир – бензол – этиловый эфир – ацетон – этанол – метанол – уксусная кислота.

Для неполярного адсорбента (графитовой сажи) порядок возрастания элюирующей силы имеет противоположную направленность:

вода – метанол – этанол – ацетон – пропанол – этиловый эфир – бутанол – этилацетат – *n*-гексан – бензол.

Кроме того, на выбор элюента влияет безопасность работы с ним (токсичность, воспламеняемость), тип используемого детектора, вязкость и т.д. Так, в случае применения ультрафиолетового спектрофотометрического детектора следует исключить растворители ароматической природы. Вязкость замедляет хроматографический процесс и требует более высокого давления.

Способ элюирования (элюентный, вытеснительный) также определяет выбор элюента.

Способы жидкостной адсорбционной хроматографии (ЖАХ). В лабораторной практике используются три способа хроматографии: элюентный (проявительный), фронтальный и вытеснительный.

Элюентный способ. Рассмотрим реализацию элюентного способа ЖАХ в колоночном варианте. Колонка при классическом проведении ЖАХ представляет собой стеклянную цилиндрическую трубку, которая заполнена адсорбентом, пропитанным растворителем. Столб адсорбента снизу опирается на пористую перегородку. Сверху на адсорбент наносят пробу, которая начинает под действием собственного веса и капиллярных сил перемещаться внутрь его, одновременно пространственно разделяясь. Компонент, слабее удерживаемый адсорбентом (А), оказывается впереди, наиболее прочно удерживаемый (С) – сзади, а промежуточный по сродству к адсорбенту (В) – между ними (рис. 3.2а).

Полного разделения компонентов не произошло. Чтобы они полностью пространственно обособились и образовали отдельные хроматографические зоны, на вход колонки начинают подавать элюент, обладающий слабым сродством к адсорбенту. При разделении смеси на неполярном адсорбенте применяют полярный элюент, для полярного адсорбента лучше подходит неполярный или малополярный элюент. Подвижную фазу подают до тех пор, пока из колонки не выйдет последний компонент. Если компоненты смеси окрашены, их в форме элюата (компонент+элюент) собирают в отдельные склянки, после чего колонка готова к разделению следующей пробы.

Если компоненты исходной смеси разбиваются на группы, существенно различающиеся между собой по скорости передвижения в

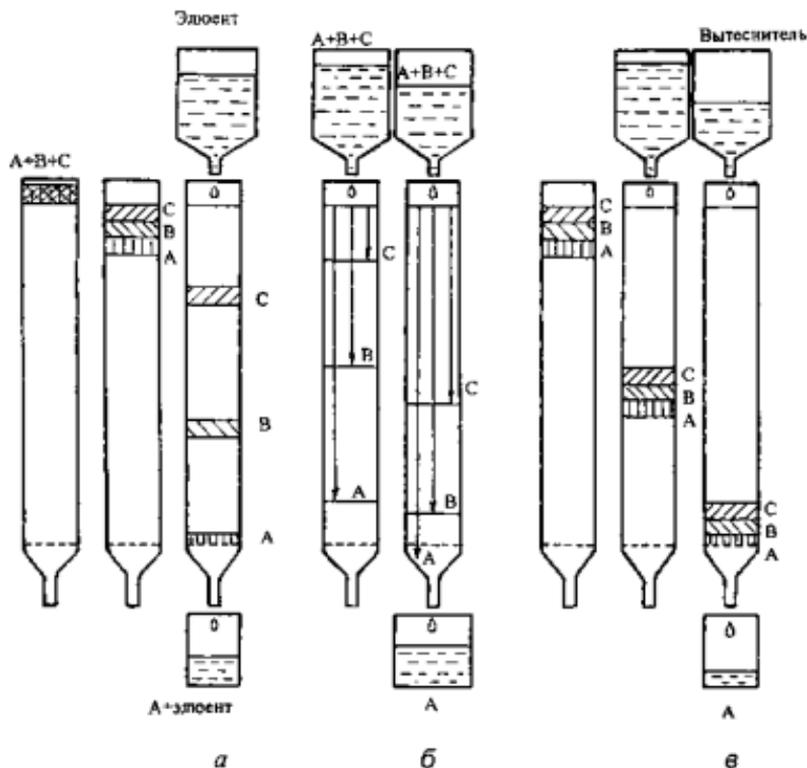


Рис. 3.2. Схема разделения компонентов смеси при элюентном (а), фронтальном (б) и вытеснительном (в) способах

колонке (по степени сродства к сорбенту), применяют так называемую градиентную элюцию. Суть ее состоит в том, что при подходе к выходу из колонки наиболее подвижной группы компонентов производят замену элюента другим, повышающим подвижность следующей группы компонентов. Такую разновидность градиентной элюции называют ступенчатой элюцией. Кроме того, с помощью специальных устройств можно осуществлять плавное изменение состава элюента, поступающего в колонку. Такую элюцию обычно называют просто градиентной элюцией.

Фронтальный способ. В хроматографическую колонку непрерывно подается элюент с растворенной в нем смесью веществ (А,В,С). В отличие от элюентного способа в колонке образуются не зоны, а фронты. Порядок их расположения такой же, как зон при элюентном способе. После достижения первым фронтом пористой перегородки из колонки начинает вытекать вещество А, которое мож-

но собирать в чистом виде до тех пор, пока выхода колонки не достигнет фронт вещества В. После этого из нее станет вытекать смесь веществ А и В. Когда пористой перегородки достигнет фронт С, из колонки начнет выходить смесь всех трех веществ (рис. 3.2б).

Вытеснительный способ. Напоминает элюентный способ, но после вхождения пробы в адсорбент на вход колонки начинают подавать подвижную фазу, обладающую большим сорбционным сродством, чем каждый из разделяемых компонентов (А,В,С). Она вытесняет из адсорбента эти вещества и вынуждает их двигаться к выходу из колонки в виде неразошедшихся зон (рис. 3.2в).

Наибольшее распространение в лабораторной практике получил элюентный способ.

Аппаратурное оформление ЖАХ. Хроматографический метод был разработан российским ученым М.С. Цветом (1872-1919). В 1906 г. он ввел термин «хроматография». Сущность своего метода М.С. Цвет описал следующими словами: «Если петролейно-эфирный раствор хлорофилла профильтровать через столбик адсорбента (я применяю для этого, главным образом, углекислый кальций, плотно набитый в узкие стеклянные трубки), то пигменты по расположению их в адсорбционном ряду отлагаются отдельными окрашенными зонами по столбику сверху вниз, благодаря тому, что пигменты с более выраженной адсорбцией вытесняют книзу столба слабее удерживаемые. Это разделение становится практически совершенным, если после пропускания вытяжки пигментов сквозь столбик адсорбента его промыть струей чистого растворителя «....». Как лучи света в спектре, в столбике углекислого кальция закономерно располагаются различные компоненты, давая возможность своего качественного и количественного определения. Полученный таким образом препарат я называю хроматограммой, а предлагаемую методику – хроматографической» [9].

Как следует из приведенного авторского описания метода, основу его составляет хроматографическая колонка (трубка), заполненная адсорбентом. Для ускорения процесса хроматографии на выходе из нее М.С. Цвет создавал разрежение (фильтрование под вакуумом).

Хроматографирование под вакуумом снижает время разделения смеси ненамного, так как перепад давления между входом в колонку и выходом из нее не может превышать 1 атм. Достоинство этого способа заключается в том, что одновременно из колонки удаляются пузырьки воздуха, которые ухудшают качество хроматографического анализа. Больше сокращение времени разделения смеси дает хроматография под давлением. Если последнее не превышает 5 атм.,

то ее называют хроматографией при низком давлении, если превышает это значение – хроматографией при высоком давлении (ЖХВД).

Простейший способ повысить давление – поднять на определенную высоту емкость с подвижным растворителем. Так как возможности этого способа ограничены, часто применяют специальные дозирующие насосы с регулируемой скоростью подачи жидкости.

Выпускаемые промышленностью хроматографические колонки ориентировочно имеют внутренний диаметр от 5 до 25 мм и длину до 170 см. С увеличением длины колонки, с одной стороны, повышается качество разделения смеси (разрешающая способность хроматографического процесса), с другой – происходит расширение зон за счет диффузии и возрастает гидравлическое сопротивление колонки. Последнее требует использования более высокого давления, которое к тому же вызывает деформацию гранул сорбента. Диаметр колонки должен не менее чем в 50 раз превышать диаметр гранул сорбента, чтобы уменьшить влияние торможения тока подвижной фазы, ведущего к расширению зон. Последнее происходит и при увеличении размера гранул (за счет большей неоднородности тока жидкости и особенно вследствие неравномерности распределения молекул разделяемых веществ между подвижной и неподвижной фазами). С учетом многих обстоятельств для аналитических колонок, работающих в режиме изократической элюции (при неизменных температуре и составе элюента), рекомендуется отношение длины колонки к ее диаметру выдерживать в диапазоне от 20 до 100.

Для количественной оценки качества хроматографического процесса нередко используют показатель, называемый числом теоретических тарелок (N). Он равен отношению эффективной (работающей) длины колонки (L) к высоте теоретической тарелки (H), под которой подразумевают параметр, учитывающий совокупность физических факторов, размывающих хроматографическую зону. Параметр H имеет размерность длины. Число теоретических тарелок

$$N = 16(L/W)^2,$$

где W – полная ширина зоны.

Удобнее пользоваться формулой

$$N = 16(V_R/V_P)^2,$$

где V_R – объем элюента, вышедшего из колонки с начала хроматографического процесса до появления середины зоны; V_P – объем элюента, с которым вышла зона.

Параметр N является комплексной характеристикой колонки в целом, хроматографируемого вещества и условий элюции.

Дозирующие насосы, применяемые в ЖАХ, бывают перистальтического, плунжерного и мембранного типов. Для хроматографии при низком давлении используют перистальтические насосы, в которых подача жидкости в колонку осуществляется путем попеременного сжатия с помощью роликов и расслабления за счет упругости силиконовой трубки. Производительность насоса регулируется путем изменения скорости вращения роликов и диаметра трубки.

Перистальтические насосы бывают одноканальными и многоканальными. Последние позволяют одновременно подавать независимо друг от друга элюенты в разные колонки.

Качественный и количественный анализ разделенных с помощью колонки компонентов осуществляют разными способами. Наиболее старый из них, применявшийся еще М.С. Цветом, – послойный. Суть его состоит в том, что столбик адсорбента с разделившимися компонентами выталкивают из колонки, вырезают окрашенные зоны, соответствующим растворителем извлекают из них компоненты, после чего с помощью химического или (и) инструментального метода осуществляют качественный и количественный анализ смеси.

Если компоненты не имеют окраску, но способны к флуоресценции, извлеченный из колонки столбик в темном помещении освещают ультрафиолетовыми лучами (ультрахроматографический анализ). Зоны становятся видимыми, после чего с ними поступают как с исходно видимыми зонами.

Возможен и другой вариант – проявление хроматограмм. Для этого через колонку после разделения компонент пропускают раствор, который делает невидимые зоны видимыми.

Если разделенные неокрашенные компоненты содержат радиоактивную метку, их расположение в столбике адсорбента может быть выявлено с помощью счетчика частиц.

Следующий, принципиально отличный от послойного, – фракционный способ. Суть его состоит в том, что компоненты смеси не оставляют в виде хроматографических зон в колонке, а вымывают из нее подвижным растворителем и с помощью специального устройства – автоматического коллектора фракций – собирают в отдельные пробирки. Затем производят качественный и количественный анализ содержимого пробирок, как это делают в послойном способе с растворами веществ, извлеченных из адсорбента.

Автоматический коллектор фракций последовательно заполняет пустые пробирки заданным объемом элюата, в виде капель выходящего из колонки. Отмеривание объема осуществляют по числу ка-

пель элюата, с помощью сифона, по времени заполнения пробирки и другими способами.

Если в основу дозирования объема положено отмеривание заданного количества капель (объем каждой из них практически одинаков), то счет их осуществляет специальное устройство, в котором падающие из колонки капли элюата пересекают луч света, воспринимаемого фотозлементом. После того, как фотозлектрический счетчик зафиксирует заданное число капель, происходит автоматическая смена пробирки.

Когда дозирование осуществляется с помощью сифона, используется фотозлектрическая регистрация момента его опорожнения. Сифон представляет собой стеклянный сосуд с U-образным коленом, вмещающий определенный объем жидкости (к коллектору прилагается набор сифонов на разные объемы). Выбранный сифон устанавливают под хроматографической колонкой. Во время ее работы капли элюата попадают в U-образное колено, после заполнения которого вследствие неразрывности струи происходит практически мгновенное опорожнение сифона. При этом вытекающая жидкость пересекает луч света, падающего на фотозэлемент, и подается команда электромеханическому устройству на замену пробирки, а сифон заполняется новой порцией элюата (рис. 3.3).

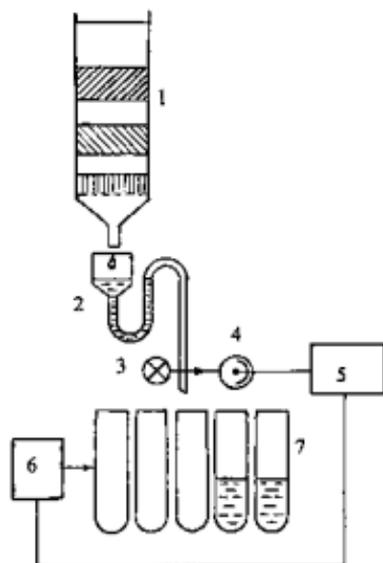


Рис. 3.3. *Схема работы автоматического коллектора фракций с сифоном: 1 – хроматографическая колонка; 2 – сифон; 3 – источник света; 4 – фотозэлемент; 5 – командное устройство; 6 – исполнительное устройство (заменяет пробирки); 7 – пробирки*

Дозирование по времени заполнения пробирки целесообразно использовать, когда подача подвижного растворителя осуществляется с помощью перистальтического насоса, стабильно обеспечивающего заданную скорость подачи растворителя в колонку независимо от изменения ее гидравлического сопротивления.

Для одновременного обслуживания нескольких хроматографических колонок автор предложил несложный по конструкции автоматический коллектор фракций [13].

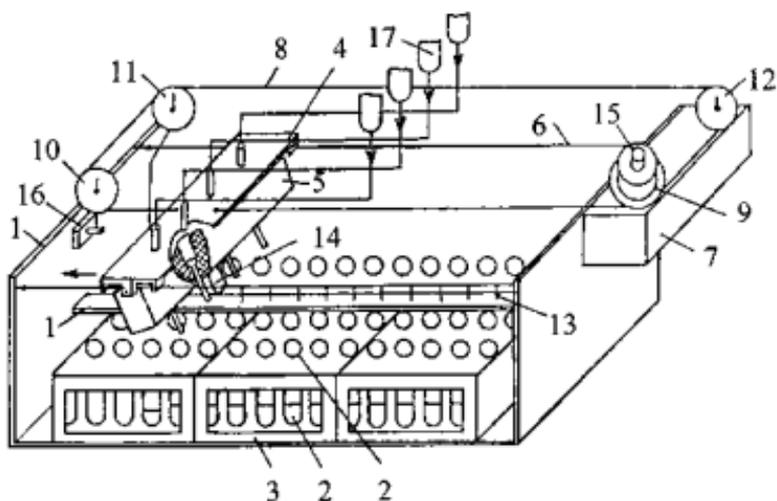


Рис. 3.4. *Схема работы коллектора фракций для нескольких хроматографических колонок (объяснения в тексте)*

Коллектор (рис. 3.4) состоит из корпуса 1 с продольными рядами пробирок 2, установленных в съемных штативах 3, ползуна 4 с адаптером в виде блока воронок 5, механизма перемещения ползуна 4 по струнам 6, содержащего электропривод 7, шнур 8 и шкивы 9-12. На корпусе 1 с шагом, равным расстоянию между осями пробирок 2, установлены штыри 13, при помощи которых осуществляется через планку 14 поворот блока воронок 5 относительно горизонтальной оси. Прижимная гайка 15 сцепляет ведущий шкив 9 с валом электропривода 7. На корпусе 1 установлен микровыключатель 16. Хроматографические колонки 17 установлены посередине коллектора, что сокращает длину трубок, подводящих элюат к ползуну 4. Коллектор работает следующим образом. С помощью коробки передач электропривода 7 задают требуемую скорость перемещения ползуна 4, ослабляют прижимную гайку 15 и устанавливают ползун 4 против нужного поперечного ряда пробирок 2. Затем затягивают прижимную гайку 15 и включают электропривод 7. По мере перемещения ползуна 4 планка 14 доходит до штыря 13 и начинает скользить по нему, поворачивая блок воронок 5 вокруг оси, при этом выходы воронок остаются над заполняемыми

пробирками 2. Затем происходит соскакивание планки 14 с поверхности штыря 13, выходы воронок устанавливаются над следующим рядом пробирок 2, и цикл заполнения повторяется. После заполнения последнего ряда пробирок 2 ползун 4 нажимает на микровыключатель 16, который отключает электропитание коллектора фракций. Элюент в колонки подает многоручьевый перистальтический насос (на рисунке не показан).

Непрерывный способ анализа заключается в непрерывном определении концентрации компонентов анализируемой смеси в элюате, выходящем из колонки, с помощью различного рода детекторов и регистрации показаний на ленте самописца.

Наиболее распространенными являются оптические детекторы, использующие зависимость значений различных параметров света от состава компонентов, выходящих из хроматографической колонки. Прежде всего это детекторы, которые регистрируют поглощение света. Они работают в ультрафиолетовом или видимом диапазоне. Ультрафиолетовые детекторы (УФ-детекторы) удобны при регистрации белков, нуклеиновых кислот и других веществ, хорошо поглощающих свет в УФ-диапазоне. Для окрашенных веществ используется видимый диапазон. Бесцветные вещества также можно регистрировать в этом диапазоне, предварительно превратив их в окрашенные соединения с помощью соответствующих цветных реакций. В этих датчиках детектируемый раствор непрерывно проходит через цилиндрическую или прямоугольную проточную кювету объемом в несколько десятков микролитров с длиной оптического пути от 2 до 10 мм. Прошедший через кювету свет улавливается высокочувствительным фотозлементом. Напряжение с сопротивления нагрузки последнего усиливается и регистрируется самописцем.

На явлении фотолюминесценции основана работа детекторов, также достаточно широко распространенных в жидкостной хроматографии. Интенсивность люминесценции компонентов смеси, проходящих через проточную кювету, регистрируется с помощью фотоэлектронных умножителей (ФЭУ).

Одними из первых в хроматографии стали использоваться рефрактометрические детекторы, основанные на зависимости показателя преломления от химической природы и концентрации вещества. Они, подобно рассмотренным выше спектрофотометрическим детекторам, работают по двухлучевой схеме с регистрацией пучков света фотозлементом. Датчик имеет ячейку для образца и ячейку сравнения.

В детекторах, работающих на принципе измерения электропроводности, выходящий из колонки раствор проходит через проточную ячейку малого объема, в которую вмонтированы плоские параллель-

ные электроды из платины, включенные в одно из плеч моста Уитстона. Возможно использование датчиков типа дизелькометров, работающих на высоких частотах, у которых проточная кювета располагается между электродами. В этом случае сопротивление переменному току обусловлено диэлектрической проницаемостью вещества, выходящего из колонки. Применяются также полярографические датчики.

Если хроматографированию подвергаются соединения, меченые радиоактивными изотопами, используют детекторы, которые регистрируют их излучение. Регистрация осуществляется с помощью сцинтилляционных счетчиков.

Определенный интерес представляют транспортно-ионизационные детекторы. Чувствительным элементом в них является плазменно-ионизационный детектор, аналогичный тому, что применяется в газовой хроматографии (см. ниже). Анализируемая жидкость, выходящая из колонки, смачивает непрерывно движущийся металлический транспортер (провода, ленту). По пути к плазменно-ионизационному детектору находящаяся на транспортере проба подвергается высушиванию (удаляется подвижный растворитель), а затем пиролизу или сжиганию. Образующиеся продукты подаются в плазменно-ионизационный детектор.

Аппаратурное оформление ЖХВД имеет некоторые конструктивные особенности перед жидкостной хроматографией низкого давления. Элюент в колонку подается под давлением до 400 атм и более. Весь хроматографический процесс занимает 10-30 мин. Колонки и трубопроводы выполнены из нержавеющей стали. Обычно используют готовые колонки, заполненные сорбентом на основе силикагеля с размером гранул от 3 до 10 мкм. Столь малый размер гранул создает высокое гидравлическое сопротивление, для преодоления которого применяют плунжерные (поршневые) насосы с плунжерами и клапанами из сапфира или рубина. Такие насосы способны создавать давление до 500 атм. Внутренний диаметр хроматографических колонок лежит в диапазоне от 1,5 до 10 мм. Колонки с диаметром 7,8 мм и более в ЖХВД считаются препаративными. Длина колонок – от 10 до 30 см, хотя выпускаются и более длинные – до 1,5 м. Срок службы колонки – до одного года. С целью защиты колонки перед входом в нее стоит стальной фильтр с диаметром пор 2 мкм и короткая сменная предколонка, заполненная силикагелем. В ней происходит насыщение элюента силикагелем, которое препятствует растворению силикагеля в хроматографической колонке.

Ввод пробы в аналитическую колонку осуществляют непосредственно перед входом в нее через специальный инжектор. Помимо

этого можно вводить пробу и через более простой инжектор наподобие дозатора, применяемого в газовой хроматографии, с помощью шприца Гамильтона. Шприц представляет собой толстостенную стеклянную трубку с тонкой иглой. Поршнем является стальная проволока с тефлоновым наконечником. Благодаря малому диаметру поршня нажатием пальца можно создать давление в сотни атмосфер, что позволяет вводить пробу в колонку «на ходу» путем прокола специальной прокладки инжектора. Она изготовлена из силиконовой резины, усиленной нейлоном (нейлоном). После извлечения иглы отверстие в прокладке герметично затягивается.

Детектирование компонентов смеси, выходящих из колонки, осуществляется с помощью устройств, аналогичных описанным выше. Отличительная особенность детекторов для ЖХВД – высокое быстродействие, связанное с малым временем проведения анализа. Кроме того, ряд детекторов осуществляет непрерывную регистрацию УФ-спектра «на ходу», используя принцип быстрых колебаний дифракционной решетки или проецирование спектра на большое количество фотодиодов, расположенных по всей длине спектра. Это позволяет осуществлять идентификацию (качественный анализ) компонентов смеси.

Современные приборы для ЖХВД оснащены дополнительными устройствами для автоматизации процесса, включая микропроцессоры. По заданной программе они осуществляют: автоматическое введение проб в колонку, создание определенного профиля элюента при градиентной элюции (или ступенчатое переключение элюентов), изменение режима работы насосов и условий детектирования, обработку сигналов, поступающих с детекторов и т.д.

При классификации жидкостной хроматографии по давлению иногда в отдельную группу выделяют хроматографию при умеренном давлении (до 30-50 атм). Она занимает положение между хроматографией при низком и высоком давлении. Последняя в этом случае будет начинаться не с 5, а с 30-50 атм.

4.2.2. Газовая хроматография

В газовой хроматографии в колонку, заполненную твердым сорбентом, разделяемую смесь вводят в виде газа. Подвижная фаза тоже является газом (газ-носитель).

Если сорбация разделяемых веществ происходит непосредственно на поверхности сорбента, то хроматографию называют газо-адсорбцион-

ной. Когда сорбция компонентов смеси происходит в тончайшей пленке жидкости, нанесенной на поверхность твердого сорбента, хроматографию называют газо-жидкостной. По механизму разделения она является распределительной хроматографией, в ее основе лежит не адсорбция (как в газо-адсорбционной хроматографии), а абсорбция в жидкой пленке. Абсорбция газов жидкостью подчиняется закону Генри.

Газовая хроматография применяется преимущественно для аналитических целей, хотя существует и препаративный вариант газовой хроматографии. В аналитической газовой хроматографии используют преимущественно элюентный (проявительный) способ. Фронтальный и вытеснительный способы применяют главным образом для препаративных целей.

Наполнителем колонки в газо-адсорбционной хроматографии является адсорбент, прочно удерживающий разделяемые вещества. В газо-жидкостной хроматографии наполнитель, напротив, должен быть инертным по отношению к разделяемым веществам и адсорбентом по отношению к неподвижной фазе. В качестве такого носителя неподвижной фазы используют пористые материалы: модифицированный силит, уголь, пемзу, дробленый и просеянный огнеупорный кирпич и т.д. Не следует применять носитель с тонкопористой структурой, мелкие поры которого, заполненные жидкостью, все равно не будут принимать участие в разделении смеси. Основные требования, предъявляемые к неподвижной фазе, заключаются в химической устойчивости, нелетучести и нахождении в состоянии жидкости с малой вязкостью при рабочей температуре колонки. В качестве неподвижной жидкой фазы используют парафиновые углеводороды (вазелиновое масло, парафин), нефтяные фракции (смазочные масла, апиезоны, битумы), полигликоли (полиэтиленгликоль 400, карбовакс 1540), силиконы (высоковакуумная смазка, метилсиликоновый каучук SE-30), полимеры сложных эфиров (полиэтиленгликольадипинат), сложные эфиры ароматических кислот и алифатических спиртов (дibuтилфталат) и др. Эти вещества в виде раствора в подходящем органическом растворителе пропитывают пористый носитель, который затем высушивается. Органический растворитель улетучивается, а нелетучая неподвижная фаза в виде тончайшей пленки оседает на поверхности носителя. Применение для неподвижной фазы многочисленного набора веществ, обладающих более выраженной селективностью, чем адсорбенты, способствует предпочтительному использованию газо-жидкостной хроматографии.

В качестве подвижной фазы (газа-носителя) используются азот, аргон, гелий, водород, углекислый газ и др.

Аппаратурное оформление газовой хроматографии. Основным элементом газового хроматографа является *колонка*. Она представляет собой стеклянную или металлическую трубку с внутренним диаметром около 5 мм (от 2 до 12-15 мм) и длиной от 1 до 20 м. Для компактности ей придают U-образную или спиральную форму. Заполнение трубки сорбентом производят до ее сгибания.

Специфической разновидностью газо-жидкостной хроматографии является капиллярная хроматография, колонка которой представляет собой металлическую трубку с внутренним диаметром 0,3-0,5 мм и длиной 15-30 м. В отдельных случаях колонки с особо высокой разрешающей способностью изготавливают из металлических или нейлоновых капилляров диаметром 0,1 мм и длиной до нескольких тысяч метров. Неподвижная фаза (вакуумная смазка) наносится на внутренние стенки капилляра путем прокачивания ее раствора в летучем растворителе через капилляр и последующего испарения растворителя. Капилляр наматывается на катушку, легко уместяющуюся в термостате хроматографа.

Поскольку масса сорбента (пленка неподвижной фазы) в расчете на единицу длины капиллярной колонки ничтожна, вносимая в нее проба тоже чрезвычайно мала. С другой стороны, колоссальная длина капиллярной колонки обеспечивает высочайшее разрешение. Так, по данным литературы, с помощью капиллярной хроматографии удалось получить хроматограмму «запаха» земляники (свыше 100 пиков), печеного хлеба и др.

Хроматографический процесс проводят при постоянной температуре, значение которой зависит от природы разделяемых веществ. По этой причине хроматографическую колонку помещают в *термостат*, который может давать температуру в несколько сот градусов.

Газ-носитель в колонку поступает из баллона, в котором находится под высоким давлением. С помощью редуктора его понижают, а затем вентилем тонкой регулировки устанавливают требуемую скорость движения газа-носителя, которую контролируют по показанию расходомера. Газ, поступающий в колонку, предварительно очищают и сушат, пропуская его через поглотительные склянки или U-образные трубки, заполненные безводным хлоратом магния, пятиокисью фосфора, хлоридом кальция, силикагелем и т.д.

Непосредственно перед входом газа в колонку стоит *дозатор*, через который пробу вводят в нее «на ходу». Объем пробы обычно отмеривают и вводят с помощью шприца путем прокола иглой резиновой прокладки дозатора подобно тому, как это делают в ЖХВД (см. выше). Если анализируемая проба является жидкой, то при по-

ступлении в колонку она должна стать газообразной. Для этого температуру дозатора делают на 50-100° более высокой, чем колонки. Твердую пробу предварительно растворяют в соответствующем растворителе, после чего этот раствор вводят шприцом через дозатор.

Как и в жидкостной хроматографии с непрерывной регистрацией результатов анализа, на выходе из колонки газового хроматографа стоит **детектор**. Он осуществляет детектирование газа с последующей регистрацией на бумаге данных о составе анализируемой смеси.

Детекторы бывают дифференциального и интегрального типов. Первые выдают на самописец информацию о концентрации вещества на выходе из колонки, вторые – о накопленном количестве вещества, вышедшего на данный момент из колонки. Дифференциальная хроматограмма представляет собой набор пиков, за каждым из которых стоит соответствующий компонент смеси. Интегральная хроматограмма имеет ступенчатый вид (рис. 3.5).

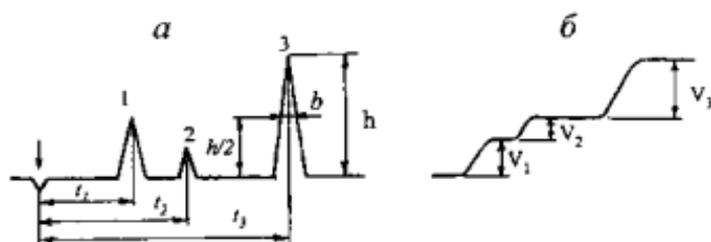


Рис. 3.5. Хроматограммы, полученные с помощью детекторов дифференциального (а) и интегрального (б) типов. Стрелкой указан момент введения пробы в колонку

Преобладающее распространение получили детекторы дифференциального типа, из которых рассмотрим лишь некоторые.

Катарометр. В основе его работы лежит зависимость температуры проволоки, нагреваемой электрическим током, от количества тепла, отводимого от нее выходящим из хроматографической колонки газом. Температура, в свою очередь, определяет величину сопротивления проволоки, которая в качестве одного из плеч включена в мост Уитстона. Конструктивно катарометр включает две ячейки – рабочую и сравнительную, внутри которых находятся сопротивления R_1 и R_2 из тонкой платиновой, вольфрамовой или никелевой проволоки. Через рабочую ячейку проходит газ из хроматографической колонки, через сравнительную – газ-носитель. Проволоки находятся под напряжением 6 или 12 вольт и нагреваются

электрическим током. Сопротивления R_2 и R_3 являются обязательной принадлежностью моста Уитстона (рис. 3.6а). В начальный момент через обе ячейки проходит только газ-носитель.

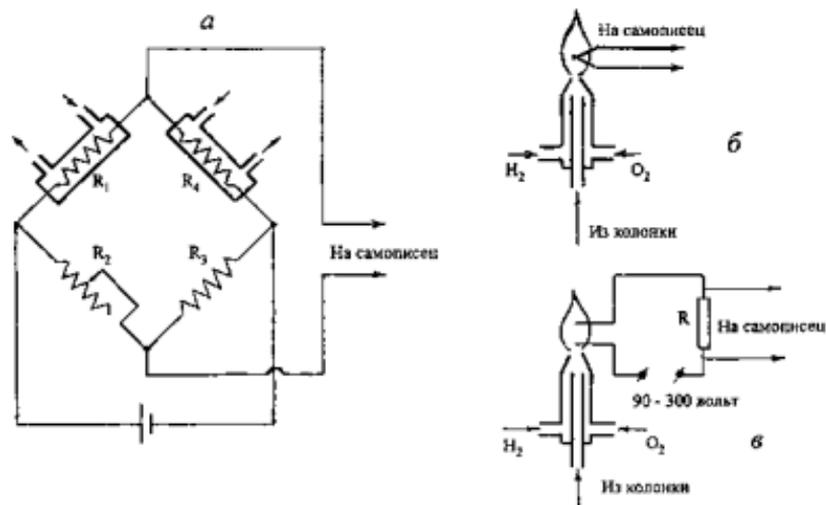


Рис. 3.6. Схема катарометра (а), пламенного (б) и пламенно-ионизационного (в) детекторов

С помощью переменного сопротивления R_2 перо самописца устанавливают на нуль, при этом произведение $R_1 \cdot R_3$ становится равным произведению $R_2 \cdot R_4$ (мост уравновешен). Когда из колонки начинает выходить любой из компонентов смеси, температура проволоки в рабочей ячейке, а с ней и сопротивление R_1 изменяются, что нарушает равновесие моста, а на самописец поступает электрический сигнал, прямо пропорциональный величине изменения температуры проволоки. После прохождения компонента через рабочую ячейку мост вновь приходит в равновесие, а на бумаге самописца остается пик (см. рис. 3.5а).

Пламенный детектор. В горелку детектора подаются водород, воздух (кислород) и газ, выходящий из колонки. Температура пламени зависит от состава газа. Она измеряется с помощью термопары, спай разнородных металлов которой помещен в пламя (рис. 3.6б). Вначале, когда из колонки выходит только газ-носитель, с помощью переменного сопротивления перо самописца устанавливают на нулевую отметку. Разность потенциалов, возникающая на свободных концах термопары, по проводам подается на самописец. При поступлении компонента смеси в горелку температура пламени изменяется; это регистрирует термопара, и на бумаге появляется пик.

Пламенно-ионизационный детектор. В пламени горелки, аналогичной описанной выше, находятся два электрода, к которым приложено электрическое напряжение. Оно вызывает направленное движение ионов в пламени (ионный ток) и возникновение на концах сопротивления R разности потенциалов (рис. 3.6в), которая усиливается и подается на самописец. Появление в пламени компонента смеси изменяет величину ионного тока, и стрелка самописца, первоначально установленная на нуль, рисует на бумаге пик (чувствительность этого датчика достигает 1 нг).

Существуют конструкции детекторов, в которых для ионизации газа, выходящего из колонки, вместо пламени применяются источники радиоактивного излучения. Чувствительность этих датчиков достигает 1 пг.

Интегральный детектор. Один из вариантов интегрального детектора включает в себя поглотитель газа-носителя (например, щелочь, если газ-носитель – двуокись углерода) и устройство, измеряющее и регистрирующее на бумаге объем газа, вышедшего из колонки. На хроматограмме в этом случае будут изображены подъемы (в период выхода очередного компонента) и горизонтальные линии (когда из колонки выходил только газ-носитель).

После краткого рассмотрения элементов газового хроматографа можно представить его принципиальную схему (рис. 3.7).

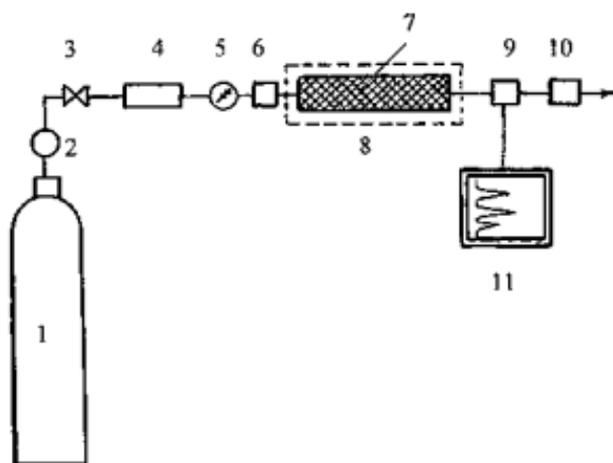


Рис. 3.7. Принципиальная схема газового хроматографа: 1 – газовый баллон; 2 – редуктор; 3 – вентиль тонкой регулировки; 4 – фильтры и осушители; 5 – манометр; 6 – дозатор; 7 – хроматографическая колонка; 8 – термостат; 9 – детектор; 10 – измеритель скорости потока; 11 – самописец

Следует отметить, что наряду с таким «классическим» хроматографом применяют хроматермографы, обладающие повышенной разрешающей способностью. Через колонку, содержащую сорбент (например, активный уголь) пропускают газовую смесь. Перед выходом из колонки наиболее подвижного компонента смеси на колонку с ее верхнего конца начинают медленно надвигать по ходу газа-носителя кольцевую электрическую печь. Ее температурное поле понижает сорбируемость компонентов смеси и выталкивает их к концу колонки, при этом происходит сужение хроматографических зон, что повышает качество анализа.

Анализ хроматограмм. Он включает идентификацию и определение количественного содержания компонентов смеси.

Качественный анализ. Существует несколько методов качественного анализа. Один из них – метод индивидуальных эталонных веществных смесей. Суть его состоит в том, что при одинаковых условиях последовательно производят хроматографию двух смесей – опытной и эталонной (составленной из компонентов, наличие которых предполагается в опытной смеси). Если соответствующие пики опытной и эталонной смесей выйдут из колонки через одинаковые промежутки времени, то можно считать, что качественный состав обеих смесей одинаков. В противном случае готовят новую эталонную смесь.

Второй метод состоит в том, что вначале снимают хроматограмму опытной пробы, а затем в нее добавляют эталонный компонент, наличие которого предполагают в смеси, и вновь снимают хроматограмму. Увеличение высоты одного из пиков свидетельствует о присутствии в смеси предполагаемого компонента.

Третий метод основан на использовании таблиц, предварительно построенных на основании хроматографирования отдельных индивидуальных веществ при определенных условиях. В таблице указывают относительное время удержания для каждого из этих веществ, которое равно отношению времени выхода их из колонки ко времени выхода стандартного соединения (внутренний стандарт). Затем снимают хроматограммы опытной смеси и стандартного соединения, вычисляют для каждого компонента смеси относительное время удержания, сравнивают его с табличными значениями и идентифицируют компоненты.

Количественный анализ. Основан на использовании площади пика, которая, как это легко доказать, прямо пропорциональна количественному содержанию соответствующего компонента смеси. Площадь пика (S) вычисляют как произведение его высоты (h) на ширину (b), которую он имеет на половине высоты (см. рис. 3.5а).

Для определения относительного содержания компонентов смеси используют метод внутренней нормализации. Процентное содержание i -го компонента P_i вычисляют по формуле:

$$P_i = \frac{K_i S_i}{\sum_1^n K_i S_i} \cdot 100\%,$$

где S_i – площадь i -го пика; K_i – коэффициент, определяемый чувствительностью детектора к данному компоненту.

Для определения абсолютного содержания компонентов используют метод абсолютной калибровки. Он состоит в том, что вначале строят калибровочный график зависимости площади пика от количества эталонного i -го компонента, а затем с помощью графика по значению площади i -го пика в анализируемой пробе находят неизвестное содержание этого компонента в пробе.

4.3. Молекулярно-ситовая хроматография

Теоретические основы. Этот вид хроматографии еще называют гель-фильтрацией, гель-проникающей хроматографией, эксклюзионной (эксклюзивной) хроматографией. Неподвижная фаза в молекулярно-ситовой хроматографии представлена жидкостью, находящейся внутри пористых, хорошо смачиваемых гранул, заполняющих колонку. В отличие от жидкостной адсорбционной хроматографии материал гранул по отношению к разделяемым веществам должен обладать минимальными сорбционными свойствами (в идеале – не обладать ими вообще). Если на такую колонку подается растворенная в элюенте смесь молекул различных размеров, то крупные молекулы, неспособные проникнуть внутрь гранул, будут двигаться вдоль колонки с подвижной фазой. Наиболее мелкие молекулы, способные проникнуть даже в самые узкие поры, равномерно распределятся между подвижной и неподвижной фазами. Для промежуточных по размеру молекул, в связи со статистическим распределением диаметра пор, доступной окажется лишь часть объема неподвижной фазы. В результате этого произойдет разделение компонентов смеси по высоте колонки, а в дальнейшем и отдельный выход их из колонки. Первыми выйдут крупные молекулы, за ними – промежуточные по размеру и, наконец – самые мелкие (рис. 3.8).

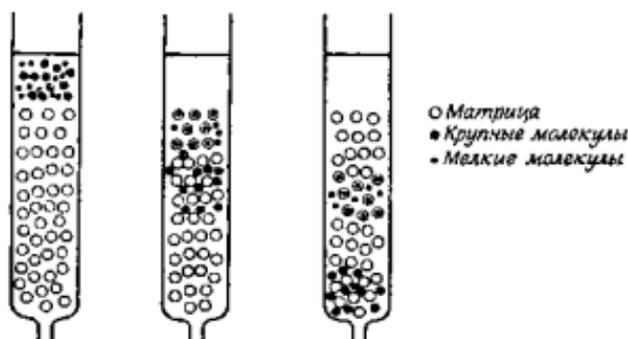


Рис. 3.8. Разделение веществ с помощью молекулярно-ситовой хроматографии [2]

Гранулы, которыми заполняют колонку, представляют собой своего рода молекулярные сита, обычно образованные «сшитыми» между собой крупными молекулами. Промежутки между этими молекулами образуют своеобразный лабиринт, через который в жидкости диффундируют разделяемые молекулы.

При анализе процесса разделения компонентов смеси в молекулярно-ситовой хроматографии используют ряд характерных объемов:

V_t – объем пустой колонки;

V_i – полный внутренний объем всех гранул (без учета твердого материала самих гранул), то есть объем неподвижной фазы; его можно рассчитать из известного сухого веса гранул (a) и величины поглощения воды (W) по формуле $V_i = aW$;

V_s – суммарный объем жидкости внутри гранул всей колонки, доступный для молекул данного размера;

V_R – объем элюента, вышедший из колонки к моменту появления пика хроматографической зоны.

Одним из коэффициентов, характеризующих движение хроматографической зоны вдоль колонки, является коэффициент доступности

$$K_{aV} = (V_R - V_0) / (V_i - V_0).$$

Значение V_i легко вычислить, исходя из геометрических размеров колонки; V_0 находят экспериментально как объем элюента, с которым из колонки выходит высокомолекулярное окрашенное соединение, совершенно не проникающее в частицы геля (например, высокомолекулярный полисахарид – голубой декстран). Значение K_{av} уменьшается с увеличением массы разделяемых молекул.

Особенностью молекулярно-ситовой хроматографии является большой объем V_R (соизмеримый с объемом колонки). Из этого следует, что эффективность разделения компонентов здесь должна быть значительно ниже, чем в других видах хроматографии. Хуже всего разделяются самые крупные молекулы, поэтому для них необходимо использовать крупнопористые матрицы (гранулы). Несмотря на это, число компонентов смеси, которое можно разделить с помощью молекулярно-ситовой хроматографии даже на достаточно длинной колонке (1 м и более), невелико (менее 10).

Молекулярно-ситовую хроматографию применяют для фракционирования молекул и обессоливания растворов; с помощью сухого сефадекса осуществляют концентрирование растворов высокомолекулярных веществ.

Матрицы для хроматографии. Первая работа по разделению смесей с помощью молекулярно-ситовой хроматографии была выполнена с использованием крахмала. Позднее ему на смену пришли более эффективные наполнители колонок. Рассмотрим некоторые из них.

Сефадексы. Изготовлены на основе декстрана. Чем больше сшивок между молекулами декстрана, тем меньше размер пор. Наиболее мелкопористый – сефадекс G-10, самый крупнопористый – G-200. Чем крупнее поры, тем больше объем воды, связанной гранулами при набухании. Номер в маркировке сефадекса означает количество воды в миллилитрах, которое связывают 10 г сухого геля. С увеличением номера сефадекса растет и максимальное значение массы молекул, способных проникать в поры гранулы. Для пептидов и глобулярных белков в ряду от G-10 до G-200 это значение повышается с 700 до 600 000 дальтон (для молекул полисахаридов, как менее компактных, – до 200 000 дальтон). Сефадексы выпускают в виде сухих и сферических гранул с размером 10–40 мкм (мелкозернистые) и 40–120 мкм (обычные), хотя существуют и другие категории, в которых размер гранул доходит до 300 мкм.

Сефакрилы. Изготовлены на основе декстрана, сшитого метиленбис-акриламидом, что придает гранулам жесткость. Это позволяет вести хроматографию на более высоких скоростях. В ряду от сефакрила S-200 до S-1000 увеличивается значение максимальной массы молекул декстрана, способных проникнуть в гель, от 80 до 100 000 дальтон.

Сефарозы. Изготовлены на основе гелей агарозы (из агара красных морских водорослей). Молекулы агара сшиты между собой. Сефароза поставляется в виде суспензии с концентрациями агара в гелях 2, 4 и 6% (соответственно марки – 2В, 4В, 6В). Верхняя граница области фракционирования при этом соответственно снижается с 40 млн. до 4 млн. дальтон.

Биогели. Биогели серии А по своим свойствам аналогичны сефарозе. Концентрация агарозы в геле 6, 8 и 10%, верхняя граница области фракционирования при этом снижается с 5 млн. до 500 тыс. дальтон.

Биогели серии Р изготовлены на основе полиакриламидного геля (ПААГ). Поставляются в сухом виде. Верхняя граница области фракционирования в ряду биогелей от Р-2 до Р-300 увеличивается от 1,8 до 400 тыс. дальтон.

Кроме того, выпускаются матрицы из полистирола, пористые стеклянные гранулы (биоглас), пористый кварц (порасил) и др.

Фракционирование. Разделение смесей, как правило, производят в колонках, которые заполняют набухшими гранулами. Если гранулы поставляются в сухом виде, их тонкой струей засыпают в стакан с жидкостью (но не наоборот!). Время набухания сефадекса при комнатной температуре в жидкости (воде или буфере) с увеличением номера растет от 3 часов до 3 суток. На заполненную гранулами колонку сверху наносят препарат (смесь), объем которой, по возможности, не должен превышать 1-2% от объема колонки. Поскольку разрешающая способность колонки пропорциональна квадратному корню из ее длины, при фракционировании применяют длинные колонки (1-1,5 м и более) с отношением высоты к диаметру 100:1. Перистальтический насос предпочтительнее ставить на выходе из колонки. Оптимальная скорость элюции для белков составляет примерно 2 мл/см²·ч.

Определение молекулярной массы белка. Было установлено, что с увеличением логарифма молекулярной массы ($\log M$) белка значение коэффициента K_{av} линейно убывает в определенном диапазоне M для каждого типа геля. Для приближенной оценки массы

белка можно воспользоваться фирменным графиком зависимости K_{av} от $\log M$ для конкретного геля и с его помощью по эмпирически найденному значению K_{av} определить M

Для более точной оценки строят этот график самостоятельно, используя набор белков известной массы. Поскольку значение K_{av} помимо массы молекулы зависит и от ее конформации, рекомендуют все работы по построению графика и нахождение неизвестной массы белка выполнять с денатурированными белками. Образующиеся при глубокой денатурации пептидные цепи сворачиваются в рыхлые статистические клубки, размер которых зависит только от длины цепи (и, соответственно, от ее массы). При этих условиях зависимость K_{av} от $\log M$ становится более однозначной.

Обессоливание растворов. Обессоливание растворов высокомолекулярных соединений обычно производят с помощью короткой колонки (отношение длины к диаметру 10:1), заполненной сефадексом G-25. Соотношение объемов исходного раствора и колонки принимают равным 1:10 (в препаративных вариантах обессоливания допускается увеличить соотношение до 1:3). Фракции высокомолекулярных соединений элюируются с внешним объемом колонки, поскольку их молекулы неспособны проникать внутрь гранул.

Концентрирование растворов. Один из способов концентрирования растворов высокомолекулярных соединений – использование сухого сефадекса G-25, который добавляют в раствор. Набухающий гель поглощает воду и низкомолекулярные соединения (включая соли), а вещества с большой молекулярной массой остаются в растворе. Спустя 10 мин гель удаляют центрифугированием.

4.4. Ионообменная хроматография

Теоретические основы. Ионообменная хроматография основана на обратимом обмене ионов, содержащихся в растворе, на ионы, входящие в состав ионообменника. Неподвижная фаза представлена ионообменником – гранулами твердого вещества, с поверхностью которых связаны ионогенные группы. В колоночном варианте набухшими гранулами заполняют колонку, в которую вначале вводят разделяемую смесь, а затем подают подвижную фазу (элюент). Как правило, подвижной фазой является водный раствор.

К числу главных ее параметров относятся рН, концентрация и природа растворенных солей, а также различные добавки, в частности, подавляющие неспецифические взаимодействия фракционируемых веществ с материалом матрицы (мочевина, детергенты и др.). Разделяемые вещества должны нести на себе электрический заряд или хотя бы обладать способностью к ионизации. Они могут представлять собой более или менее крупные ионы, цвиттерионы (в целом нейтральные молекулы, несущие равное число положительных и отрицательных зарядов) или амфолиты – крупные молекулы, на которых располагается несколько ионогенных групп, способных ионизироваться и в зависимости от рН элюента создавать то или иное распределение зарядов обоих знаков. Распределение вещества между фазами зависит от силы электростатического взаимодействия ионов или заряженных групп в молекуле вещества с заряженными группами ионообменника. Таким образом, элюент определяет сродство разделяемого вещества к ионообменнику, воздействуя на оба этих участника ионообменного процесса.

Поскольку силы взаимодействия для разных веществ смеси неодинаковы, то и выходить из колонки они будут в разное время.

В ионообменной хроматографии, как и в адсорбционной, можно применять элюентный, фронтальный и вытеснительный способы.

Ионообменники. Имеется большое количество ионообменных материалов минеральной и органической природы. Ионообменники неорганического происхождения представляют собой слабокислые катиониты и слабоосновные аниониты (см. ниже). К ним относятся оксид алюминия, гидроксид циркония, щелочной силикагель, природные минералы (например, глина), фосфат циркония, фосфат кальция. Последний, в частности, применялся в разработанном Тизелиусом варианте хроматографии.

Ионообменники органической природы бывают синтетическими и изготовленными на основе материалов растительного происхождения. В них принято выделять трехмерную матрицу и ионогенные группы. Матрица является носителем ионогенных групп, которые располагаются на ее наружной и внутренней поверхностях. Она должна быть по возможности прочной, химически стойкой и обладать пористостью. От размера пор зависит доступность их ионогенных групп для разделяемых молекул.

Среди материалов синтетических матриц следует назвать полимеры стирола, акриловой и метакриловой кислот. Молекулы полистирола, полиакрилата и метакрилата сшиты между собой дивинилбензолом.

Ионообменники на основе этих материалов по традиции называют ионообменными смолами.

Размер пор ионообменных смол определяется степенью сшитости (процентной концентрацией сополимера дивинилбензола): чем выше его концентрация, тем меньше размер пор. Чаще всего используемые смолы имеют степень сшивания от 4 до 12%.

Материалы растительного происхождения, из которых изготавливают матрицы ионообменников, относятся к полисахаридам. Из них получают модифицированные (волокнутистые и микрогранулированные) целлюлозы («Sephacel»), декстран («Sephadex»), агарозу («Sephарозе»). Диаметр гранул обычно составляет десятки мкм.

Матрица, или решетка, содержит заряженные (ионогенные) группы и подвижные противоионы с зарядом противоположного знака. Эти противоионы могут быть заменены и на другие ионы, содержащиеся во внешней жидкой фазе.

В зависимости от заряда ионогенных групп ионообменники подразделяют на катионообменники (катиониты) и анионообменники (аниониты). Катионообменники заряжены отрицательно и связывают из раствора положительно заряженные ионы (катионы); анионообменники, напротив, заряжены положительно и способны связывать отрицательно заряженные ионы (анионы). Помимо них имеются биполярные ионообменники амфолиты, которые в зависимости от pH среды проявляют свойства катионитов или анионитов.

Ниже приведены названия и химические формулы ряда распространенных ионообменных радикалов.

Сильные катиониты: сульфо – $(-\text{SO}_3^-)$, сульфометил – $(-\text{CH}_2\text{SO}_3^-)$, сульфоэтил – $(-\text{C}_2\text{H}_4\text{SO}_3^-)$, сульфопропил – $(-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-)$, фосфо – $(-\text{PO}_3\text{H})$.

Слабые катиониты: карбокси – $(-\text{COO}^-)$, карбоксиметил – $(-\text{CH}_2\text{COO}^-)$.

Сильные аниониты: триметиламинометил – $(-\text{CH}_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3)$, триэтиламиноэтил – $(-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}(\text{C}_2\text{H}_5)_3)$.

Слабые аниониты: аминоэтил – $(-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3)$, диэтиламиноэтил – $(-\text{C}_2\text{H}_4\overset{+}{\text{N}}\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2)$.

За названием радикала обычно идет название матрицы. Например: КМ-Ц (карбоксиметилцеллюлоза), DEAE-Sephadex (диэтиламиноэтилсефадекс), ТЭАЭ-целлюлоза (триэтиламиноэтилцеллюлоза) и т.д.

Среди отечественных ионообменных смол можно отметить следую-

щие марки: сульфокислотные катиониты от КУ-1 до КУ-4 («катионит универсальный»), фосфорнокислые катиониты КФ-2 и КФ-4, карбоксильные катиониты КБ-3, КБ-5, КМ, КМД, сильноосновные аниониты АВ-15, АВ-16, АВ-17, слабоосновные аниониты АН-9, АН-10 и др. Ионогенные группы в смолу могут быть введены до или после стадий полимеризации. Среди импортных смол дополнительно следует назвать амберлиты (*Amberlite*) и дауэксы (*Dowex*).

Ионообменники характеризуются обменной емкостью. Ее выражают числом миллиграмм-эквивалентов (миллизквивалентов) на 1 г сухого обменника. При загрузке колонки пробой рекомендуется брать ее в количестве менее 5% обменной емкости всего количества смолы (объем препарата не должен превышать 1-5% объема колонки).

Разделение на обменниках обычно проводится в две стадии: сначала соединения, которые требуется разделить, связываются с ионообменником в условиях образования стабильной связи. Затем колонку промывают буфером с другим значением рН или (и) с другой ионной силой, в результате чего компоненты буфера конкурируют со связанными веществами за связывающий центр. В конечном счете разделяемые соединения последовательно выходят из колонки. Для разделения близких по своим хроматографическим свойствам веществ используют изократическую элюцию – раствором неизменного состава. Для разделения веществ, существенно различающихся по хроматографическим свойствам, используют обычно элюцию ступенчатым градиентом, часто за счет изменения концентрации соли в буфере неизменного состава.

Поскольку гранулы ионообменных смол обычно пронизаны порами, в хроматографический процесс определенный вклад вносит ситовой эффект, свойственный молекулярно-ситовой хроматографии. Проявляют себя и такие неионные взаимодействия, как адсорбция, распределение ионов соли между подвижной жидкой фазой элюента вне гранул обменника и неподвижной жидкостью внутри гранул.

Регенерацию ионообменника осуществляют, пропуская через колонку 1 н раствор HCl (в случае катионообменника) или NaOH (в случае анионообменника). Затем колонку промывают дистиллированной водой до полного удаления регенерируемого вещества, после чего колонка готова к употреблению.

Аминокислотные анализаторы. Ионообменная хроматография в биохимии впервые была применена Кохом и его сотрудниками, которые использовали ее для разделения производных аминокислот, а также Муром и Штейном, разделявшим таким методом аминокислоты.

Наибольшее распространение получили аминокислотные анализаторы, в основе которых лежит полностью автоматизированный аппарат для анализа аминокислот, созданный в 1958 году сотрудниками Рокфеллеровского института (США) Штейном и Муром совместно со

Спекманом. Принцип работы аппарата заключается в том, что элюент из емкости 1 с помощью дозирующего насоса 2 прогоняется через хроматографическую колонку 3, на вход которой была предварительно нанесена проба (рис. 3.9).

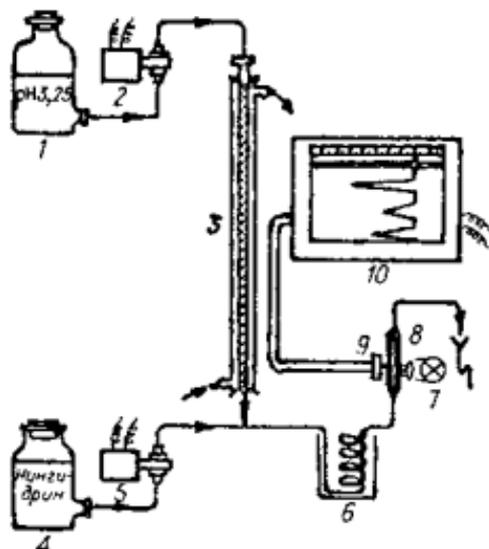


Рис. 3.9. Принципиальная схема автоматического разделения и определения аминокислот [7]

На выходе из колонки к элюату дозатором 5 из емкости 4 непрерывно подкачивается раствор нингидрина в определенном соотношении с элюентом. Смесь элюента и нингидрина по капиллярной трубке направляется в змеевик 6, нагреваемый до 95-98°, а отсюда в проточную кювету 8 и дальше в канализацию. Интенсивность окраски, появившейся в результате химической реакции нингидрина с выходящей из колонки аминокислотой, измеряется фотоколориметрированием с помощью фотоэлемента 9, на который падает свет от источника 7, прошедший через кювету 8. Сигналы с фотоэлемента усиливаются и регистрируются самопишущим потенциометром 10. Площадь под пиками на зарегистрированной хроматограмме подсчитывается оператором и сравнивается с той, которая получается для заранее известных (из калибровочных опытов) количеств конкретных аминокислот. Путем сравнения этих площадей вычисляется абсолютное количество аминокислот в пробе.

В реальных конструкциях аминокислотных анализаторов для разделения аминокислот используются две термостатируемые колонки, запол-

ненные ионообменниками. Одна из них предназначена для разделения кислых и нейтральных аминокислот, другая – только основных. После нанесения пробы (образца) через первую колонку с помощью насоса прокачивают последовательно элюирующие буферные растворы, приготовленные на основе цитрата натрия: 1–0,2 н с рН 3,25; 2–0,2 н с рН 4,25; 3–0,35 н с рН 5,28; через вторую колонку сразу пропускают раствор 3. Фотометр, измеряющий интенсивность окраски, имеет два селеновых фотоэлемента, один из которых работает на длине волны 440 нм, другой – на 570 нм. Первый из них измеряет концентрацию пролина и оксипролина, второй – концентрацию остальных аминокислот.

Одновременно с описанной установкой австралийский исследователь Спекман предложил конструкцию аминокислотного анализатора, в котором вместо проточного фотометрирования использовался своеобразный коллектор фракций, и кривая, регистрируемая самописцем, имела ступенчатую форму.

Аминокислотный анализатор позволяет установить количественное содержание аминокислот в протеинах. Для этого последние подвергают кислотному (6н HCl при 110° в течение 20 ч), щелочному (5 н NaOH при 105° в течение 3-4 ч) или ферментативному (проназа при 40° в течение 24 ч; папаин и др.) гидролизу. Кислотный и щелочной гидролиз проводят в толстостенных стеклянных ампулах, из которых перед запаиванием откачивают воздух. При кислотном гидролизе триптофан полностью разрушается.

Для установления аминокислотной последовательности используются более сложные приборы – секвенаторы (секвенсоры). В них один конец исследуемого полипептида присоединяют к нерастворимому носителю (матрице на основе полистирола и пористого стекла) в хроматографической колонке. Затем проведением ряда этапов обработки и хроматографии отщепляют от свободного конца полипептида по одной аминокислоте и анализируют их. Существуют жидкофазные, твердофазные и газофазные секвенаторы.

Ионообменная хроматография для фракционирования смеси белков используется значительно реже, чем для их очистки. Хроматография таких объектов на ионообменных смолах всегда сопровождается денатурационными явлениями, значительной необратимой сорбцией и в ряде случаев гидролитическими эффектами. Это обусловлено многоточечным связыванием белковой молекулы с ионообменником, вследствие чего снять ее с обменника окажется достаточно трудно или даже невозможно.

4.5. Распределительная хроматография

В распределительной хроматографии для разделения смеси используются различия в распределении ее компонент между двумя несмешивающимися жидкостями, одна из которых удерживается поверхностью твердого носителя, а другая движется вдоль поверхности неподвижной жидкости. В модельном эксперименте различие в распределении конкретного вещества между этими двумя жидкостями можно оценить с помощью относительного показателя, который называют коэффициентом распределения K . Он равен отношению концентрации вещества в подвижной фазе к его концентрации в неподвижной фазе при установившемся равновесии.

Распределительная хроматография была предложена в 1941 г. Мартином и Сингом (Синджем).

Хроматография на колонках. Колонка в распределительной хроматографии заполнена тонко измельченным, обычно инертным веществом – носителем.

Носители, используемые в рассматриваемом типе хроматографии, могут быть пористыми или поверхностно-пористыми. К числу пористых носителей относятся силикагель, диатомиты (например, хемосорб) и пористые стекла, такие как порасил. Они имеют пористую структуру, пронизывающую весь объем частиц, и, соответственно, большую площадь поверхности. Поверхностно-пористые или тонкослойно-пористые насадки (носители) представляют собой частицы с непроницаемой сердцевинкой и тонкой пористой оболочкой. К ним относятся зипакс-носитель с контролируемой поверхностной пористостью (КПП), корасил и поверхностно-травленные зерна. Размер частиц обычно измеряется десятками микрометров, толщина пористого слоя берется приблизительно равной $1/30$ от диаметра частицы.

Неподвижная фаза наносится на поверхность носителя до заполнения колонки или в самой колонке. Как и в газо-жидкостной хроматографии, неподвижная фаза наносится на поверхность носителя обычно методом испарения растворителя. Для этого гранулы носителя суспендируют в растворе неподвижной фазы в летучем растворителе, который затем испаряют. Если неподвижную фазу наносят на поверхность гранул в предварительно заполненной колонке, ее полностью заполняют раствором неподвижной фазы в летучем растворителе, а испарение последнего осуществляют путем пропускания через колонку сухого воздуха или азота.

Наряду с неподвижной фазой, удерживаемой за счет адсорбции,

применяют носители, на поверхности которых неподвижную фазу удерживают химические связи. Так, этерификацией пористого стекла поразил спиртами получают материал, который можно применять как в жидкостной, так и в газовой хроматографии.

Оптимальный диаметр колонки 2-3 мм, хотя в ряде случаев используют колонки с диаметром 10-11 мм. Длина колонки может достигать 1 м и более. Объем образца (пробы) ориентировочно составляет 2% от рабочего объема колонки (носителя). Образец должен быть приготовлен в растворителе, точно соответствующем составу подвижной фазы.

Загрузку колонок производят методом сухой или мокрой упаковки. В последнем случае в нее вводят суспензию гранул носителя.

Выбор подвижной фазы определяется как природой разделяемых веществ, как и типом детектора, регистрирующего выходящий из колонки элюат. Например, если применяется ультрафиолетовый детектор, подвижная фаза должна пропускать УФ-лучи.

Обычно для разделения полярных веществ используют полярные неподвижные фазы и относительно неполярные подвижные фазы. Напротив, неполярные вещества можно разделить значительно более эффективно при использовании неполярных неподвижных и полярных подвижных фаз. Для образования двух несмешивающихся фаз, используемых в распределительной хроматографии, можно приготовить системы из трех-четырех компонентов.

Чтобы достичь полного равновесия между подвижной и неподвижной фазами, а также уменьшить вымывание последней из колонки, перед ней желательно ставить предварительную колонку. Хорошей предварительной колонкой является трубка длиной 50 см с внутренним диаметром 6 мм, содержащая 20% неподвижной фазы на тонко измельченном диатомовом носителе. Ее можно при необходимости часто менять, что позволяет увеличить срок службы хроматографической колонки до нескольких месяцев.

Для лучшего протекания хроматографического процесса и устранения искажения результатов регистрации датчиком из-за пузырьков воздуха рекомендуется подвижную систему перед использованием освобождать от газа (обезгаживать) путем ее вакуумирования или (и) нагревания.

Благодаря созданию механически прочных носителей, способных выдерживать давление до 350 атм и более, в практику была внедрена высокоскоростная распределительная хроматография высокого давления.

Хроматография на бумаге. Еще в 1855 г. немецкий химик К. Рунге применил хроматографию на бумаге для разделения неорганических

ких веществ. Задолго до него Плиний старший сообщил о разделении красителей на папирусе и существовании хроматографического теста на железо с использованием папируса. Тем не менее настоящим методом научного исследования распределительная хроматография стала только в 1944 г. после работ будущих лауреатов Нобелевской премии А. Мартина и Д. Синджа. Хроматографию на бумаге разработали в том же 1944 г. Р. Консден, А. Гордон и А. Мартин. В этой разновидности распределительной хроматографии носителем неподвижной фазы являются лист или полоска бумаги, выполняющие одновременно и роль своеобразной плоской (двухмерной) колонки. Бумага состоит из целлюлозы, волокна которой удерживают прочно связанную воду, поглощенную из воздуха (22% от веса бумаги). Она обычно и выполняет роль неподвижной фазы.

Зачастую подвижная фаза представляет собой смешивающийся с водой органический растворитель (ацетон, бутанол и др.).

Наряду с этой нормально-фазовой хроматографией применяют хроматографию с обращенной фазой. В этом случае хроматографическую бумагу погружают в раствор парафина в петролейном эфире, а затем высушивают ее. После нанесения на пропитанную парафином бумагу образца проводят обычное хроматографическое разделение с помощью водного подвижного растворителя, при этом важную роль в разделении играет гидрофобное взаимодействие компонентов смеси с неподвижной фазой.

В связи с тем, что в отличие от хроматографии в колонке хроматография на бумаге не позволяет собрать элюат, для характеристики подвижности веществ применяют коэффициент задержки R_f , который равен отношению расстояния, пройденного растворенным i -м соединением (x_i), к расстоянию, пройденному фронтом подвижного растворителя (x_r), то есть $R_f = x_i/x_r$. В ряде случаев, например при хроматографии углеводов, используют отношение x_i к расстоянию, пройденному стандартным веществом (x_s), в приведенном случае глюкозой.

В зависимости от того, как ориентировано направление движения подвижного растворителя по отношению к направлению силы тяжести, различают восходящую, нисходящую и горизонтальную хроматографии. Кроме того, хроматография бывает линейной, секторной и круговой (радиальной) (рис. 3.10).

В восходящей хроматографии сила тяжести препятствует перемещению подвижной фазы по капиллярам бумаги, в нисходящей, напротив, способствует перемещению, а при горизонтальной оказывается безразличной, так как направлена под прямым углом к направлению перемещения (действия капиллярных сил).

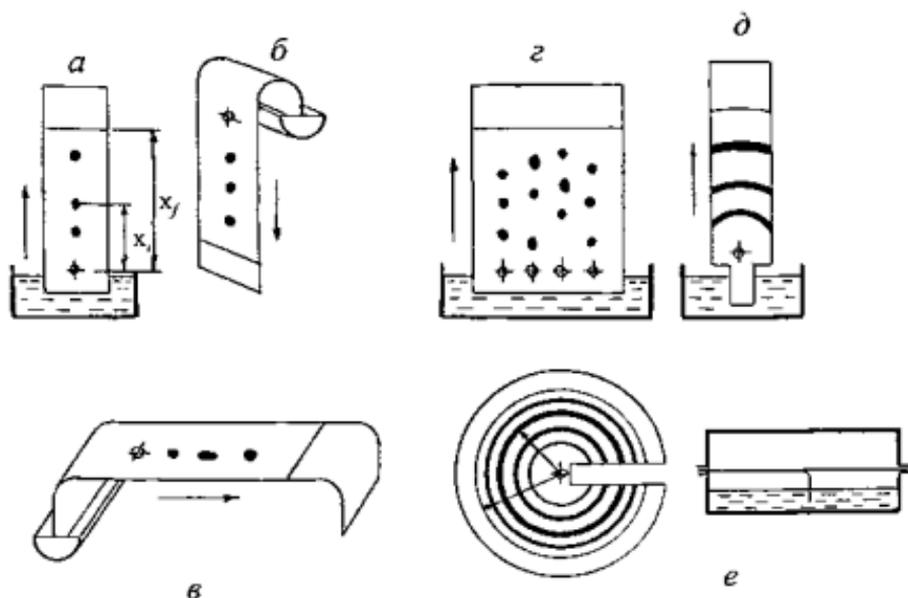


Рис. 3.10. *Различные варианты хроматографии на бумаге: восходящая (а), нисходящая (б), горизонтальная (в), линейная (г), секторная (д) и круговая (е)*

В линейной хроматографии разделяемые компоненты смеси движутся зонами округлой формы. В секторной хроматографии зоны имеют форму дуг (секторов), в круговой – форму колец.

Хроматографию проводят в герметичной камере с теплоизоляцией (двойными стенками) в атмосфере насыщенных паров подвижного растворителя. Теплоизоляция необходима для поддержания постоянной температуры во время хроматографии. Герметичность позволяет создать насыщение паров подвижного растворителя и тем самым исключить их испарение с непрерывно увеличивающейся смоченной поверхности бумаги. Кроме того, не происходит загрязнение атмосферы в помещении вредными веществами и экономится подвижный растворитель.

Для распределительной хроматографии используют специальную бумагу, изготовленную из высокосортного хлопка и содержащую 95-99% целлюлозы. Промышленность выпускает разные сорта хроматографической бумаги, различающиеся плотностью и, соответственно, скоростью движения растворителя. Менее плотная бумага («быстрая») обеспечивает большую скорость движения растворителя, более плот-

ная («медленная») – меньшую скорость. Для хроматографии можно применять плотные сорта фильтровальной бумаги, ватман. Скорость перемещения подвижного растворителя по бумаге зависит также от его вязкости.

Перед хроматографическим анализом на один из концов бумажной полосы с помощью капиллярной трубки наносят каплю смеси, подлежащей разделению на компоненты. Затем этот конец опускают в ванночку с подвижным растворителем, помещенную в хроматографическую камеру с атмосферой, предварительно насыщенной его парами. Одновременно с перемещением подвижного растворителя двигаются и зоны компонентов анализируемой смеси в порядке, определяемом значениями их коэффициентов распределения K (чем он больше, тем быстрее движется компонент). В момент приближения фронта подвижного растворителя к противоположному концу бумаги ее извлекают из камеры, карандашом отмечают положение фронта и высушивают. Если компоненты смеси не имеют окраски, их после просушивания бумаги проявляют, опрыскивая соответствующим реагентом, дающим с ними цветную реакцию (в частности, аминокислоты проявляют нингидрином). Затем линейкой измеряют расстояния, пройденные центрами окрашенных зон от точки нанесения пробы, и вычисляют для каждой из них значение коэффициента R_f .

Подвижный растворитель подбирают таким образом, чтобы значения R_f располагались ориентировочно в диапазоне 0,3-0,8. В качестве примера подвижного растворителя, применяемого для разделения смесей α -аминокислот или углеводов, приведем трехкомпонентный раствор с исходным объемным соотношением *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды 4:1:5. Эту смесь растворителей встряхивают и дают ей расслоиться. В качестве подвижного растворителя используют верхний спиртовой слой. Уксусная кислота применяется для повышения растворимости воды в бутаноле и для предотвращения образования на хроматограмме «хвостов» (вытянутых участков за ядрами движущихся зон компонентов), которые после проявления таюже становятся окрашенными.

Важным вариантом, повышающим возможности метода, является двухмерная хроматография, предложенная Мартином и Синджем. Суть её состоит в том, что после разделения с использованием одного подвижного растворителя процесс повторяют с другим подвижным растворителем под прямым углом к направлению первоначального разделения. При этом если некоторые компоненты с первым растворителем не смогли полностью разойтись между собой и дали одну зону, то появляется возможность «развести» их с помощью второго ра-

творителя. Полученную после окрашивания двухмерную (на плоскости) хроматограмму называют «отпечатком пальцев», а саму двухмерную хроматографию, соответственно, – методом «отпечатка пальцев» (рис. 3.11).

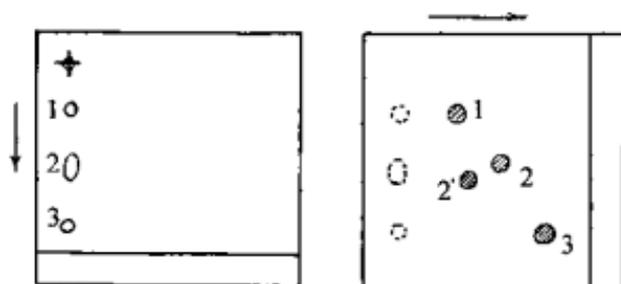


Рис. 3.11. Двухмерная хроматография

Качественный и количественный анализ хроматограмм. Существует несколько способов как качественного, так и количественного анализа.

Для качественного анализа (идентификации компонентов) используют способы специфических цветных реакций, свидетелей и измерения коэффициента R_f . Первый из названных способов пришел в хроматографию из аналитической химии и заключается в окрашивании зон специфическими реагентами, которые дают цветные реакции с идентифицируемыми веществами. Положение невидимых при дневном свете зон перед их окрашиванием в ряде случаев можно выявить, освещая непроявленную хроматограмму УФ-лучами (за счет флуоресценции). Способ свидетелей предполагает хроматографирование пробы одновременно с нанесенными с обеих сторон от нее индивидуальными веществами, наличие которых предполагает в пробе. После проявления хроматограммы устанавливают, против каких зон индивидуальных веществ располагаются зоны анализируемой пробы (рис. 3.12).

Последний способ идентификации заключается в определении для компонентов смеси значений коэффициента R_f и сравнении их с табличными, полученными ранее значениями R_f для набора веществ в таких же условиях хроматографирования.

Количественное определение компонентов смеси осуществляют путем измерения интенсивности окраски зон или элюатов, содержащих красители из этих зон. В первом способе проводят фотометрирование

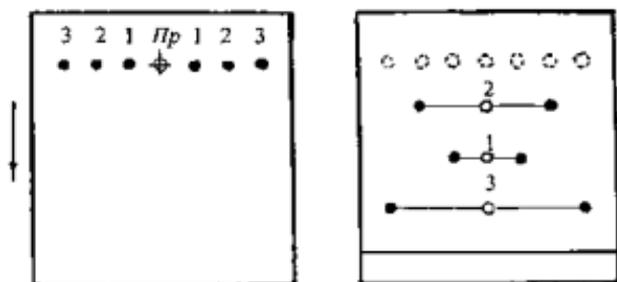


Рис. 3.12. Идентификация компонентов смеси способом свидетелей: Пр – анализируемая проба; 1,2,3 – индивидуальные вещества

светового потока, отраженного от окрашенного пятна (зоны) или прошедшего через него (рис. 3.13). Для того, чтобы придать бумаге некоторую прозрачность, ее пропитывают бесцветным маслянистым веществом. Фотометрирование осуществляют с помощью нерегистрирующего или регистрирующего микрофотометра (денситометра). Светопоглощение пятна прямо пропорционально содержанию в нем окрашенного вещества. Для количественной расшифровки замеров светопоглощения фотометрируют окрашенные пятна с известным содержанием веществ. При способе вымывания (элюции) из хроматограммы вырезают окрашенное пятно, разрезают его на мелкие части, после чего в пробирке извлекают из него определенным объемом соответствующего растворителя краситель. Затем раствор фотометрируют на обычном фотоколориметре и по калибровочному графику (см. ниже) определяют содержание окрашенного вещества.

Если компоненты смеси содержат радиоактивные изотопы, то после получения бумажной хроматограммы ее приводят в контакт со специальной фотопленкой, которую после экспонирования проявляют, а полученный негатив фотометрируют на денситометре. По сравнению с бумагой фотопленка обладает значительно более высокой прозрачностью.

4.6. Осадочная хроматография

На возможность образования осадочных хроматограмм указывал еще М.С. Цвет. В его опытах спирт, поднимаясь по бумаге, обогащался водой и из него выпадал в осадок хлорофилл. Однако использоваться в лабораторной практике этот метод стал лишь с 1948 г. после работ отечественных ученых Е.Н. Гапон, Т.Б. Гапон и И.М. Беленькой.

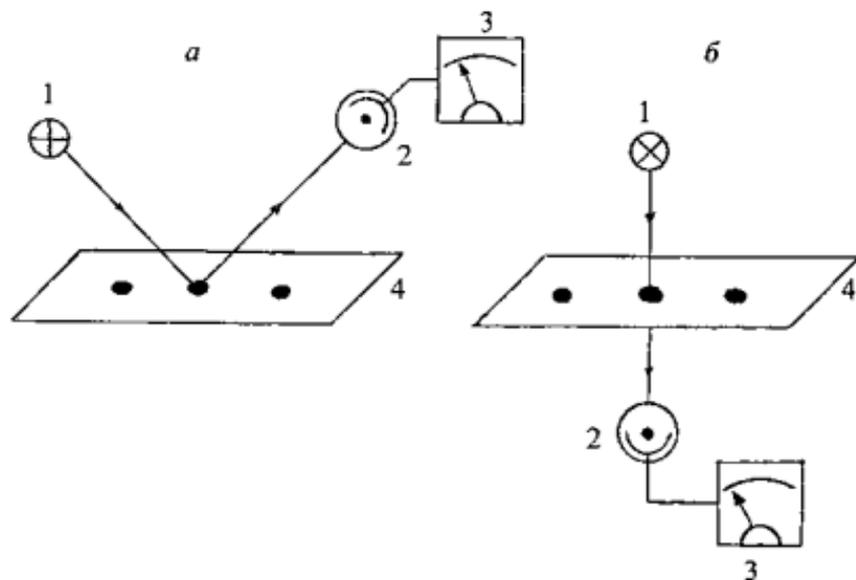


Рис. 3.13. Количественное определение окрашенного вещества способом фотометрирования отраженного (а) и прошедшего через пятно (б) пучка света: 1 – источник света; 2 – фотозлемент; 3 – регистрирующий прибор; 4 – хроматограмма

В осадочной хроматографии используют для разделения веществ различную растворимость осадков. Колонку для осадительной хроматографии заполняют смесью носителя и осадителя. В качестве носителя используют индифферентные к осадителю и хроматографируемому раствору высокодисперсные вещества. Осадителем служат вещества, способные вызывать образование осадков различной растворимости у компонентов анализируемой смеси.

В качестве носителя в хроматографии на колонках используют силикагель, окись алюминия, сульфат бария, крахмал, асбест, кизельгур, песок и др.

В качестве осадителей применяют органические и неорганические жидкие вещества. Выбор осадителя определяется природой разделяемых веществ. Раствором осадителя пропитывают носитель и высушивают его или оставляют влажным. Заполненную колонку в первом случае называют сухой, во втором – влажной.

В колонку вносят хроматографируемую смесь. По мере фильтрации раствора в колонке происходит образование первичной хроматограммы, порядок расположения зон в которой определяется растворимостью осадков: чем меньше растворимость, тем меньший путь пройдет компо-

нент разделяемой смеси. Затем через колонку пропускают чистый растворитель, в котором были растворены компоненты хроматографируемой смеси. Он перемещает компоненты смеси по колонке, вызывает пространственное обособление зон и в конечном счете позволяет отобрать отдельно после выхода из колонки компоненты (элюентный способ).

Наряду с колоночным вариантом существует осадочная хроматография на бумаге, которая играет роль носителя. Бумагу пропитывают соответствующим осадителем, высушивают, наносят на нее каплю анализируемой смеси и после образования первичной хроматограммы подают чистый растворитель. После завершения хроматографического разделения бумагу снова высушивают, проявляют компоненты смеси и осуществляют качественный и количественный анализ.

Осадочная хроматография нашла применение в качественном анализе смесей катионов и анионов и с успехом заменяет классический групповой метод анализа, превосходя его по скорости и чувствительности.

4.7. Аффинная хроматография

Теоретические основы метода. Аффинная хроматография применяется преимущественно не для фракционирования смеси, а для препаративного выделения из нее одного из компонентов в чистом виде. Она основана на обратимом биоспецифическом взаимодействии комплементарных молекул. К такого рода взаимодействиям способны комплементарные пары: субстрат – фермент; конкурентный обратимый ингибитор – фермент; кофактор – фермент; антиген – антитело; рецептор – гормон; нуклеиновая кислота – специфический белок, связывающийся с ней в процессе осуществления своих функций (полимераза, нуклеаза, гистон, регуляторный белок); нуклеиновая кислота (матрица) – продукт ее транскрипции; специальные транспортные белки – специфически связывающиеся с ними малые молекулы (витамины, жирные кислоты и др.). Любая из этих молекул может быть надежно закреплена на матрице в качестве так называемого лиганда, способного извлекать из смеси комплементарное ему соединение. После насыщения колонки (связывания всех лигандов с молекулами выделяемого вещества) из нее промывкой удаляют посторонние примеси, а затем с помощью соответствующего элюента извлекают сорбированное вещество.

По своей сущности аффинная хроматография представляет особую разновидность адсорбционной хроматографии.

Аффинные сорбенты. В качестве матрицы для аффинной хроматографии применяют гранулы из нерастворимого, гидрофильного, химически стабильного, достаточно прочного материала, позволяю-

щего с помощью несложной химической реакции ковалентно связывать лиганды непосредственно или через специальные промежуточные молекулы – спейсеры. Наиболее подходящими для этих целей оказались гели из агарозы, смешанные матрицы из крупнопористого ПААГ, укрепленного сеткой агарозы, поперечно-сшитые декстраны (например, сефароза 4В); применяют также производные целлюлозы, полистирольные смолы, силикагель и др.

Лиганды и спейсеры могут ковалентно связываться с гидроксильными группами полисахаридов и амидными группировками ПААГ. Однако в ряде случаев поверхность матрицы активируют, в результате чего на ней появляются весьма реактивные группы, в относительно мягких условиях связывающие лиганды. Одним из широко распространенных активаторов является бромциан (CNBr). Кроме того, осуществляют активацию глутаральдегидом, имидокарбонатом, трихлортриазинном и др.

Для устранения стерических препятствий присоединению макромолекулярных лигандов к матрице между ними вводят спейсер. Обычно в качестве спейсера используют простейшие линейные молекулы, на концах которых располагаются аминогруппы или карбоксильные группы. С их помощью спейсер присоединяется к матрице и лиганду. Простейшими спейсерами являются диамины типа $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, где $n = 2-6$. В продаже имеются матрицы с уже присоединенными к ним активированными спейсерами, которые легко связываются с лигандами (рис. 3.14).

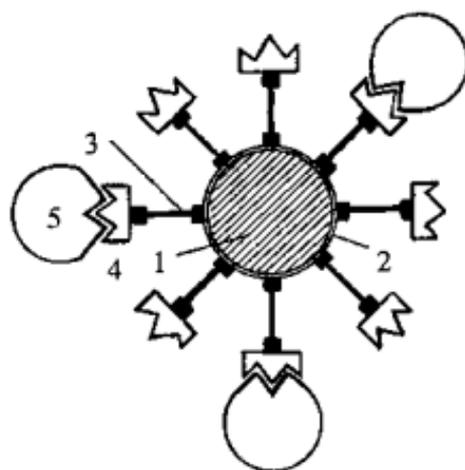


Рис. 3.14. Аффинный сорбент (схема): 1 – матрица; 2 – активированный слой; 3 – спейсер (вставка); 4 – лиганд; 5 – молекула выделяемого вещества

Лиганды, о которых говорилось выше, могут обладать как индивидуальной, так и групповой специфичностью. К числу последних относятся антигены, способные связывать антитела, выработанные к отдельным участкам антигена (антигенным детерминантам). Групповой специфичностью обладает и кофермент А, участвующий во многих ферментативных реакциях. Такого рода лиганды могут быть использованы для фракционирования компонентов смеси, обладающих разной степенью сродства к лиганду.

Промывку колонки после насыщения сорбента выделяемым веществом обычно ведут тем же буфером, в котором это вещество вошло в нее.

За промывкой следует элюция сорбированного вещества, которая может быть специфической (конкурентной) или неспецифической. В первом случае через колонку пропускают раствор либо свободного лиганда (или сходного с ним соединения), либо аналога выделяемого вещества, способного связываться с лигандом сорбента и вытеснять выделяемое вещество. При неспецифической элюции ослабляют прочность связи выделяемого вещества с лигандом. Этого можно достигнуть путем подбора соответствующего значения pH, увеличения ионной силы раствора, введения в него мочевины, повышения температуры и др.

В качестве примера рассмотрим процесс выделения конкретного фермента из смеси белков с помощью аффинной хроматографии. В этом случае в качестве лиганда удобно использовать обратимый конкурентный ингибитор. Вначале в колонку непрерывно подают смесь до тех пор, пока не произойдет «проскок» выделяемого фермента – выход его из колонки, что свидетельствует о ее насыщении. После этого промывают колонку буферным раствором, а затем начинают подавать в нее раствор субстрата, вступающего в конкуренцию за фермент с лигандом-ингибитором. Элюирование раствором субстрата ведут до тех пор, пока из колонки не будет извлечен весь фермент.

Противоположный процесс, когда к матрице на «коротком поводке» (спейсере) присоединяют фермент, широко применяют в биотехнологии. Такой зафиксированный на матрице фермент называют иммобилизованным.

4.8. Тонкослойная хроматография

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) нельзя поставить в один ряд с рассмотренными типами хроматографии, потому что она является особым видом реализации хроматографического процесса – не в колонке или на бумаге, а в тонком слое мелко размельченного сорбента. В тон-

кослойном исполнении можно осуществить любой вид жидкостной хроматографии (адсорбционную, молекулярно-ситовую, ионообменную и др.), все зависит от природы слоя порошка, в котором происходит разделение смеси.

Естественно, как и в хроматографии на бумаге, здесь нет непосредственного выхода элюата, а компоненты смеси оказываются зафиксированными в слое в виде зон.

ТСХ была открыта отечественными исследователями Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер в 1938 г. и применена для разделения фармацевтических препаратов. Сначала она не привлекла внимания исследователей, и лишь спустя 20 лет к ТСХ обратились вновь, а еще через три года она стала универсальным методом в биохимии. Такое быстрое и широкое распространение ТСХ обусловлено рядом ее достоинств: большой чувствительностью, высокой эффективностью разделения, быстротой разделения, простотой оборудования, доступностью реактивов, легкостью элюирования разделяемых веществ, универсальностью обнаружения веществ путем обугливания их серной кислотой, а также возможностью количественного определения с помощью денситометра.

В ТСХ сорбент наносят на стеклянные, металлические или пластмассовые пластинки. Стандартный размер стеклянных пластинок 20x20, 10x20 и 5x20 см, хотя выпускаются более крупные (до 1 м) и более мелкие.

Толщина слоя обычно измеряется десятками долями миллиметра, хотя для препаративных целей применяют слои толщиной до 2 мм. Слои обычно содержат добавки связующего вещества (5-20% гипса или 2-5% крахмала), которые удерживают сорбент на пластинке. Частицы сорбента обычно имеют диаметр от 1 до 40 мкм. Нередко в слой добавляют флуоресцентный индикатор (например, силикат цинка), вводимый для детектирования таких веществ, которые гасят флуоресценцию при просмотривании хроматограммы в УФ-лучах. Существует ряд способов нанесения тонкого слоя на стеклянную пластинку в лабораторных условиях (рис. 3.15).

Часто используют фабричные стеклянные пластинки с закрепленным слоем сорбента, а также силуфольные пластинки, у которых сорбент с флуоресцентным индикатором нанесен на тонкий алюминиевый лист или на картонную подложку, отделенную от сорбента алюминиевой фольгой, которые можно резать ножницами до нужного размера.

Тонкослойную хроматографию осуществляют так же, как это делается в хроматографии на бумаге. Обычно используют восходящую хроматографию. Пробу на пластинку с тонким слоем наносят в

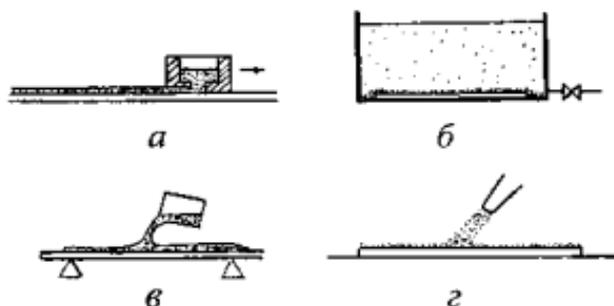


Рис. 3.15. Способы нанесения сорбента на пластинку в ТСХ: а – с помощью аппликатора Шталя; б – погружением в суспензию; в – наливанием; г – опрыскиванием (пудверизацией)

виде пятна, с толстым слоем (препаративная ТСХ) – в виде полос. В препаративной ТСХ масса пробы превышает 50 мкг. Зоны, если они не имеют окраски, выявляют по флуоресценции под ультрахемископом (прибор с источником УФ-лучей) или путем опрыскивания пластинки растворами, которые дают окрашенные продукты реакции с компонентами смеси.

Подвижность компонентов смеси выражают в относительных единицах (с помощью коэффициента R_f или по отношению к пути, пройденному веществом сравнения).

Количественное содержание фракций определяют с помощью денситометра (тонкие слои на стекле в проходящем свете, толстые – в отраженном) или путем элюции окрашенного продукта из порошка пятна, соскобленного и отсосанного с помощью специального устройства в пробирку с растворителем.

ГЛАВА ПЯТАЯ

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Электрохимические методы, из которых нами будут рассмотрены электрофорез, кондуктометрический, потенциометрический и полярографический методы, основаны на связи химических и электрических свойств веществ. Они обладают широкими возможностями при изучении сложных биохимических систем и высоким разрешением. Наибольшее распространение получил электрофорез, который имеет колоссальное число разновидностей, богатый набор самых разнообразных приборов, используемых носителей, а главное, не исчерпал свои возможности и находится в состоянии дальнейшего развития и совершенствования.

5.1. Электрофорез

5.1.1. Теоретические основы электрофореза

Электрофорезом называется движение заряженных частиц в жидкости под действием электрического поля. Впервые это явление наблюдал отечественный ученый Ф.Ф. Реус, опубликовавший результаты своих исследований в 1809 г. Как метод исследования электрофорез стали применять лишь в 20-х годах прошлого столетия. Широкое применение он получил в биологии и медицине с 50-х годов, когда вслед за разработкой совершенной аппаратуры для фронтального электрофореза появился метод зонального электрофореза. Как и в хроматографии, были разработаны многочисленные разновидности электрофореза, которые позволяют разделять сложные смеси веществ, осуществлять их качественный и количественный анализ, определять молекулярную массу разделяемых белков и нуклеиновых кислот.

С помощью электрофореза могут быть выделены частицы, которые обладают электрическим зарядом. К их числу относятся находящиеся в форме ионов малые молекулы и макромолекулы, а также клеточные органеллы, клетки, вирусы, которые несут на своей поверхности электрический заряд.

Для предварительной оценки влияния на скорость движения заряженных частиц основных факторов, сказывающихся при электрофоретическом разделении веществ, рассмотрим простейшую схему, в которой на частицу действуют только две силы: электрическая ($F_{эл}$) и трения ($F_{мп}$). Сферическая частица с радиусом r , несущая положительный заряд (Q), находится в растворе между электродами, к которым приложено постоянное напряжение U (рис. 3.16).

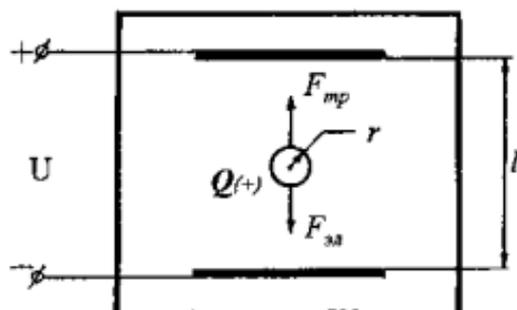


Рис. 3.16. Основные силы, действующие на заряженную частицу при электрофорезе

Последнее создает электрическое поле с напряженностью $E = U/l$ (В/см), где l – расстояние между электродами.

Электрическая сила $F_{эл} = QE$, сила трения $F_{тр} = wv$, где w – коэффициент трения, v – скорость движения частицы, которая равна произведению uE . Величина u , называемая электрофоретической подвижностью, равна скорости движения частицы в поле с напряженностью $E = 1$ В/см. С учетом сказанного, $F_{тр} = wuE$. Поскольку силы ($F_{эл}$) и ($F_{тр}$) можно считать взаимно уравновешенными ($F_{эл} = F_{тр}$), то $QE = wuE$, откуда $u = Q/w$. Для сферической частицы, в соответствии с законом Стокса, $w = 6\pi\eta r$, где η – коэффициент вязкости среды. Отсюда, электрофоретическая подвижность сферической частицы

$$u = Q / 6\pi\eta r .$$

Таким образом, электрофоретическая подвижность частицы прямо пропорциональна величине заряда и обратно пропорциональна ее линейному размеру (радиусу r), вязкости среды, в которой движется частица, а также зависит от формы частицы (для сферы – через выражение 6π).

Поскольку с помощью электрофореза в подавляющем числе случаев разделяют молекулы, то речь идет об их заряде, размере и форме. Величина заряда ионизированной молекулы (иона) кратна заряду электрона (знак может быть положительным или отрицательным). Масса молекулы изменяется в широком диапазоне, а форма может быть глобулярной (округлой), фибриллярной (нитевидной) или занимать промежуточное положение между этими крайними состояниями, принимая самую замысловатую конфигурацию.

Макромолекулы, в частности основной объект электрофореза в биохимии – белки, представляют собой сложные амфотерные полиэлектролиты, несущие одновременно множество положительно и отрицательно заряженных групп. В зависимости от концентрации водородных ионов в окружающей их среде (рН раствора) в молекуле белка могут преобладать положительные или отрицательные заряды, сообщая ей соответственно положительный или отрицательный знак. Аналогичным образом и молекулы аминокислот, будучи амфолитами, в зависимости от рН раствора могут оказаться заряженными положительно (в кислой среде) или отрицательно (в щелочной среде). При определенных значениях рН как макромолекулы, так и аминокислоты могут в це-

лом оказаться электронейтральными, не способными перемещаться в электрическом поле.

Из сказанного выше следует, что, изменяя величину заряда, конформацию и жесткость макромолекул с помощью рН, сопротивление среды их движению, а также используя ряд иных приемов, можно электрофоретическим путем разделить практически любые смеси веществ. Однако этому мешает ряд факторов, влияние которых необходимо учитывать и по возможности ослаблять. Поскольку электрофорез представляет собой направленное движение носителей зарядов, то есть электрический ток, то происходит нагрев среды, в которой ведется разделение смеси. Это нежелательным образом может сказаться на компонентах смеси, вызвать испарение раствора, тепловую конвекцию, которая искажает картину распределения зон. Для ослабления последствий нагрева среды ее охлаждают. Диффузия молекул ведет к размыванию границ разделяемых веществ. Этот процесс усиливается благодаря тому, что их молекулы несут электрический заряд одного знака и отталкиваются друг от друга. Ее влияние можно уменьшить путем использования твердых поддерживающих сред, сокращения продолжительности электрофореза. При значениях рН в районе изоэлектрической точки (ИЭТ) взаимное отталкивание молекул может смениться притяжением, что ведет к их агрегации и выпадению в осадок. В этих вариантах электрофореза желательно использовать минимальные навески пробы. Некоторые поддерживающие среды (носители) обладают способностью сорбировать на своей поверхности компоненты смеси, что опять же искажает картину распределения зон, вызывает образование «хвостов», подобных встречаемым в хроматографии. Для уменьшения влияния адсорбции необходимо использовать носители со слабо выраженными адсорбционными свойствами. Порою наблюдается и химическое взаимодействие разделяемых веществ со средой, например белков, обладающих амилолитической активностью, с крахмальным гелем. В ряде случаев необходимо учитывать электроосмос (эндосмос). Он обусловлен собственным зарядом поверхности носителя. В частности, отрицательно заряженным остаткам серной кислоты, неподвижно связанным с полимерными нитями агарозы, в водной фазе соответствуют положительные протоионы, которые под действием электрического поля мигрируют в направлении катода. Их место занимают катионы, поступающие из анодного буфера. Возникает дополнительный ток сильно гидратированных катионов, которые увлекают за собой всю массу жидкости, находящуюся внутри геля, и вместе с ней – растворенные в водной фазе геля макромолекулы. Поскольку в большинстве случаев электрофорезом в агарозе разделяют отрицательно заряженные макромолекулы, мигрирующие к аноду, а эндосмос направлен к

катоду, то происходит замедление движения макромолекул. Оно довольно значительно в средах с высоким содержанием отрицательно заряженных групп (например, в агаровом геле) и менее выражено при электрофорезе в средах с небольшим содержанием этих групп (например, в крахмале).

5.1.2. Фронтальный электрофорез

Эту разновидность электрофореза еще называют электрофорезом с подвижной (или движущейся) границей. Конструкция прибора, описанного в 1937 г. Тизелиусом, включает разъемную U-образную измерительную ячейку, состоящую из трех секций, сосуды для электродов, сами электроды и оптическое устройство для наблюдения за электрофорезом и фотографической регистрации границ движущихся веществ (рис. 3.17).

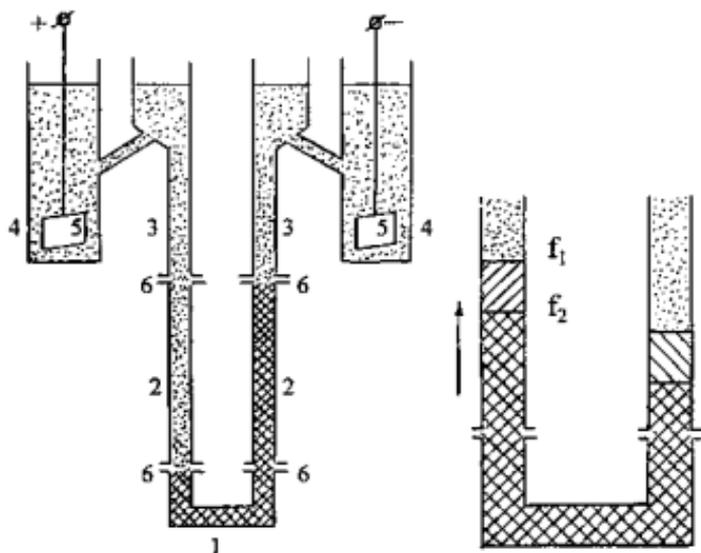


Рис. 3.17. Схема аппарата для фронтального электрофореза: 1, 2, 3 – соответственно нижняя, средняя и верхняя секции измерительной ячейки; 4 – сосуды для электродов; 5 – электроды; 6 – шлифованные плоскости, вдоль которых сдвигают секции при заполнении их исследуемым и буферным растворами. Справа изображена картина движения компонентов смеси при электрофорезе (f_1 и f_2 – фронты 1-го и 2-го компонентов)

Перед электрофорезом нижнюю секцию сдвигают в сторону и заполняют исследуемым раствором; среднюю секцию сдвигают в противоположную сторону и одну из половин (правую) заполняют исследуемым раствором, а другую (левую) – буферным раствором; обе половины верхней секции и сосуды для электродов заполняют буферным раствором. После этого нижнюю и среднюю секции возвращают в исходное (как на рисунке) положение, на электроды подают постоянное напряжение и через определенные промежутки времени осуществляют регистрацию положения движущихся границ на фотопленку.

Измерительные ячейки обычно имеют прямоугольное сечение с глубиной 25 мм (иногда 15–20 мм), шириной – 2–3 мм (ячейки из органического стекла – до 0,4 мм). Такая форма позволяет эффективно охлаждать жидкость в ячейке и тем самым уменьшать тепловую конвекцию. За движением границ компонентов наблюдают с помощью устройств, основанных на использовании различий участков жидкости в показателе преломления, – рефракционных или интерференционных – вследствие их универсальности. Луч света проходит через большую толщину жидкости (глубину ячейки).

При фронтальном электрофорезе не происходит полное пространственное разделение компонентов смеси, в чистом виде можно получить лишь часть самой подвижной фракции (между f_1 и f_2 на 3.17) и часть самой малоподвижной (в арьергарде). Поэтому наблюдают за передвижением фронтов компонентов смеси, отчего этот электрофорез получил название «фронтальный». Основным достоинством фронтального электрофореза, которое преимущественно и определяет область его применения, является возможность определять истинную электрофоретическую подвижность несущих заряд макромолекул (белков, нуклеиновых кислот), слабая диффузия которых приводит к сравнительно небольшому размыванию границ даже при длительных опытах. Для малых ионов фронтальный электрофорез непригоден, прежде всего из-за высокой их скорости диффузии. Кроме того, фронтальный электрофорез позволяет точно определить изозлектрическую точку белка. Электрофоретические свойства очень чувствительны к изменениям размеров, формы, числа заряженных групп макромолекулы. Так, Л. Полинг с сотр. обнаружил различие в положении ИЭТ нормального гемоглобина человека и гемоглобина больных серповидно-клеточной анемией ($\Delta pI = 0,22$), которое вызвано заменой одной кислой аминокислоты в белковой молекуле на нейтральную (глутаминовой кислоты на валин). Аналогичным путем можно количественно изучать диссоциацию белков и ассоциацию с другими

компонентами смеси, определять однородность индивидуального белка. Для препаративного разделения белков и для анализа смесей низкомолекулярных веществ фронтальный электрофорез не применяется. Эти задачи с успехом решаются с помощью зонального электрофореза.

5.1.3. Зональный электрофорез

Зональный электрофорез позволяет получать в полностью разделенном виде компоненты смесей, состоящих как из макромолекул, так и из малых молекул. При таком электрофорезе компоненты движутся отдельными участками (зонами), за что Тизелиус назвал его «зональным». Другое название «зонального» электрофореза – «электрофорез на поддерживающей среде» или «электрофорез на носителе». Поддерживающая среда делает жидкость, в которой происходит разделение смеси, устойчивой к тепловой конвекции, небольшим вибрациям и т. д. Стабилизация зон при электрофорезе может быть достигнута с помощью градиента плотности жидкости, использования пористой поддерживающей среды или геля.

Электрофорез в градиенте плотности. Развитие этого метода началось в конце 50-х годов прошлого века и связано в основном с именами Колина и Свенсона. Электрофорез проводится в вертикальной трубке (колонке), которая предварительно заполнена буферным раствором с плотностью, возрастающей в направлении к низу трубки (рис. 3.18). Это достигается добавлением какого-либо недиссоциирующего вещества (чаще всего сахарозы) с переменной концентрацией. Градиент плотности может быть создан с помощью устройства, аналогичного тому, которое применяют при центрифугировании в градиенте плотности (см. выше).

Колонка охлаждается с помощью водяной рубашки. Столб жидкости в колонке удерживают на нужном уровне с помощью уравнивающей трубки с раствором, которая соединяется с колонкой резиновой трубкой и при необходимости может быть поднята или опущена. Постоянное напряжение подают к электродам, опущенным в сосуды с буферным раствором, которые, в свою очередь, соединены с содержимым колонки и уравнивающей трубки мостиками из хлопчатобумажной или стеклянной ваты. Пробу разбавляют раствором сахарозы с соответствующей плотностью, которая позволяет ей (пробе) оставаться в верхней части колонки. С момента подачи напряжения на электроды начинается процесс электрофоретического разделения смеси, после заверше-

ния которого из колонки извлекают ее компоненты. Это можно сделать разными способами, например с помощью тонкой трубки – сифона через верхнюю часть колонки или путем раскалывания содержимого колонки через тонкий кончик ее нижней части после перевода крана в положение (10), изображенное на рис. 3.18.

Механизм стабилизирующего действия градиента плотности состоит в том, что для перемещения слоя жидкости вверх или вниз требуется совершение работы соответственно против силы тяжести или выталкивающей силы. Кроме того, концентрированный раствор сахарозы обладает повышенной вязкостью, которая тоже затрудняет тепловую конвекцию, в той или иной мере проявляющуюся, несмотря на охлаждение колонки.

Изоэлектрическое фокусирование. Оригинальный способ электрофоретического разделения веществ с амфотерными свойствами

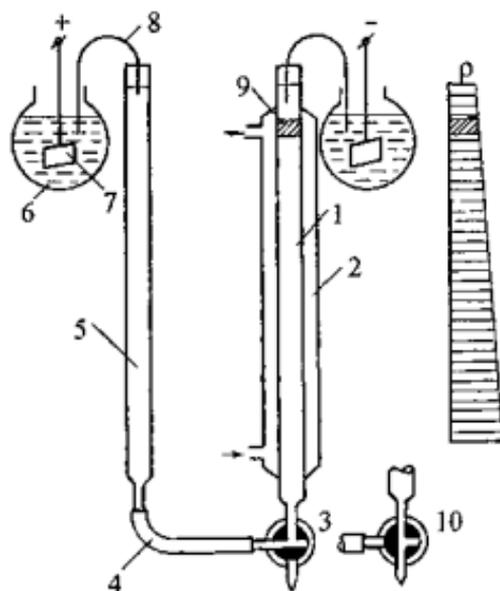


Рис. 3.18. Схема прибора для электрофореза в градиенте плотности: 1 – колонка для разделения смеси; 2 – охлаждающая рубашка; 3 – кран; 4 – резиновая трубка; 5 – трубка с уравнивающим раствором; 6 – сосуд для электрода с буфером; 7 – электрод; 8 – электрический мостик; 9 – пробирка; 10 – положение крана при опорожнении после завершения электрофореза

предложил Колин, дополнивший градиент плотности раствора сахарозы в колонке градиентом pH. Следует отметить, что попытки применить этот способ были еще в 1912 г. (Икеда и Суцзуки) и в 1929 г. (Уильямс и Уотерман). Колин получил «искусственный» градиент pH, наслаивая друг на друга буферные растворы с разными значениями pH. Позднее для стабилизации градиента pH он применил градиент плотности сахарозы. Основываясь на этих предварительных данных, Свенсон определил условия получения устойчивых «естественных» градиентов pH с помощью электрического тока. В конечном счете Вестерберг и Свенсон испытали набор синтетических амфолитов-носителей (алифатических аминокислот), с помощью которых им удалось разделить белки, различающиеся по изоэлектрическим точкам лишь на 0,02 единицы pH.

Сущность этого метода, обычно называемого изоэлектрическим фокусированием (ИЭФ), заключается в следующем. Вертикальную стеклянную колонку заполняют смесью низкомолекулярных амфолитов-носителей, индивидуальные изоэлектрические точки (ИЭТ) которых имеют значения, перекрывающие предварительно выбранную область pH. Амфолиты обычно суспендируют в растворе сахарозы. Верхний конец колонки (анод) соединяют с сосудом, содержащим сильно-кислый раствор, а нижний (катод) – с сосудом, содержащим сильно-щелочной раствор. Эти растворы начинают диффундировать в колонку навстречу друг другу, и через некоторое время по ее длине устанавливается градиент pH с крайними значениями, соответствующими pH кислого и щелочного растворов. После этого к верхнему и нижнему концам колонки прикладывают постоянное электрическое напряжение, которое вызывает миграцию амфолитов до тех участков колонки, где их суммарный заряд равен нулю, после чего миграция прекращается, а исходный градиент pH стабилизируется. Затем в верхнюю часть колонки вводят пробу, компоненты которой начинают двигаться по колонке, а по достижении участка, где pH равен их ИЭТ, останавливаются. После завершения разделения смеси электрическое напряжение отключают. Возможность конвекции в колонке устраняют либо помещением в нее гранулированного сефадекса, либо полимеризацией в этой жидкости сетки ПААГ, либо, наконец, образованием в жидкости градиента плотности раствора сахарозы.

Достоинством метода является быстрота разделения и узость образующихся зон. Однако последнее свойство является и недостатком, так как концентрация компонента в зоне может стать слишком большой и произойдет выпадение осадка. Эта опасность особенно велика вблизи ИЭТ, поэтому рекомендуется разделять только не-

большие количества вещества. Колин считает свой метод особенно удобным для разделения крупных частиц (бактерий, вирусов и т.д.).

Наряду с совершенствованием аппаратного оформления ИЭФ расширился ассортимент амфолитов, выпускаемых под различными фирменными названиями: амфолины («LKB»), фармалиты («Pharmacia»), сервалиты («Serva»), биолиты («Bio-Rad»). Все они представляют собой наборы искусственно синтезированных цвиттерионов, щелочными группами которых являются замещенные амины, а кислыми – остатки карбоксилов (амфолины, фармалиты) или сульфокислот (сервалиты, биолиты).

Электрофорез в пористой поддерживающей среде. Надежным способом поддержания гравитационной стабильности и ослабления негативных последствий тепловой конвекции является проведение электрофореза в пористом носителе – порошке целлюлозы, крахмала, силикагеля, стекла, а также на бумаге или мембране из ацетата целлюлозы.

Колоночный вариант конструктивно сходен с рассмотренным выше электрофорезом, в градиенте плотности (см. рис. 3.18), в котором колонка для разделения смеси заполнена набухшими в буферном растворе гранулами пористого материала (например, целлюлозы или крахмала). Исследуемый раствор вводят в колонку сверху и продавливают его на нужную глубину новыми порциями буферного раствора, а затем на электроды подают постоянное напряжение. После завершения электрофореза зоны элюируют потоком растворителя, подаваемого сверху насосом или под гидростатическим напором. Выходящую из колонки жидкость собирают в пробирки путем раскапывания вручную или с помощью автоматического коллектора фракций.

Достоинством колоночного варианта электрофореза с использованием гранул крахмала и, особенно, целлюлозы является возможность разделения значительных количеств белков, пептидов, аминокислот и других веществ при относительной простоте устройства. С однажды заполненной колонкой можно работать в течение длительного времени, а извлечение фракций не представляет трудностей и может быть легко автоматизировано.

Помимо колоночного варианта, смеси веществ можно разделять и с помощью электрофореза в крахмальном блоке, введенного в лабораторную практику в 1952 г. Кункелем и Слэтером. Крахмальной пастой, осевшей из его суспензии, заполняют плоскую коробочку из водоталкивающей бумаги, органического стекла или другого диэлектри-

ческого материала. Для подвода напряжения от электродных сосудов в крахмал на концах блока закладывают полоски фильтровальной бумаги. Поверхность крахмала выравнивают, удаляя избыток жидкости фильтровальной бумагой, и прикрывают поверхность полиэтиленовой пленкой или оргстеклом, чтобы предотвратить испарение. Раствор образца объемом до нескольких миллилитров смешивают с сухим крахмалом и полученной пастой заполняют щель, которую предварительно вырезают поперек блока с таким расчетом, чтобы она не доходила до его краев. Электродные сосуды обычно делают из оргстекла, разделяя их на две части, связанные мостиком из полоски бумаги. В одну часть помещают электрод, другую связывают с блоком. После окончания электрофореза блок открывают и определяют положение зон. Если они невидимы, к поверхности блока прижимают полоску фильтровальной бумаги. Когда бумага пропитается, ее сушат и проявляют зоны как при электрофорезе или хроматографии на бумаге. Затем соответствующие зонам части блока вырезают и элюируют небольшим количеством жидкости, растирая крахмал и осаждая его центрифугированием. Блок во время электрофореза можно устанавливать как горизонтально, так и вертикально.

Помимо порошкового материала капиллярными свойствами обладает листовая материал из целлюлозы (бумага) и ее производного (пористой мембраны из ацетата целлюлозы).

Электрофорез на бумаге возник в конце 40-х – начале 50-х годов прошлого века и получил широкое распространение в силу своей простоты и дешевизны. Он развивался параллельно с хроматографией на бумаге, успешно дополняя ее при исследовании низкомолекулярных веществ, пептидов и белков. В настоящее время значение его снизилось в связи с использованием других средств, более подходящих для зонального электрофореза.

Для электрофореза используют фильтровальную или хроматографическую бумагу. Перед началом разделения ее погружают в буферный раствор, слегка промокают чистыми листами фильтровальной бумаги, а затем помещают в прибор для электрофореза. Он содержит два электродных сосуда, устройства для поддержания полосок или листов бумаги в определенном (горизонтальном, вертикальном) положении и крышки, позволяющей сохранять внутри прибора атмосферу насыщенных паров (рис. 3.19). В качестве электродов обычно применяют платиновую проволоку. Катод можно сделать из какого-либо другого металла. Можно использовать и угольные электроды, помещенные в целлофановые трубки с целью предотвратить загрязнение буфера частичками угля. Для отделения продуктов электро-

лиза, образующихся у электродов, от бумаги электродные сосуды делают двухкамерными (с перегородкой).

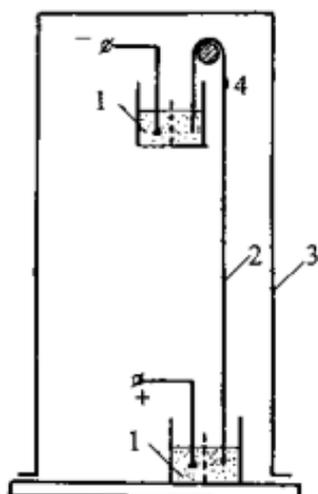


Рис. 3.19. *Схема прибора для вертикального электрофореза на бумаге: 1 – электродные сосуды; 2 – бумага; 3 – крышка; 4 – нанесенная на бумагу пробка*

Пробу наносят капиллярной пипеткой с помощью специального аппликатора на стартовой линии поперек бумажной полоски, отступая от каждого ее края на несколько миллиметров. После нанесения пробы на электроды подают постоянное напряжение. Для наблюдения за ходом электрофореза на бумагу наносят пятно окрашенного стандартного вещества. После окончания разделения бумагу быстро высушивают ($105-110^{\circ}$, 20-25 мин), а затем подвергают качественному и количественному анализу подобно тому, как это делается при хроматографии на бумаге.

Для ускоренного разделения (10-60 мин) низкомолекулярных веществ, обладающих значительной диффузией, применяют высоковольтный электрофорез с градиентом до 200 В/см. В связи с большим количеством выделяемого тепла бумагу помещают, например, между двумя охлаждающими металлическими пластинами, отделенными от нее полиэтиленовой пленкой.

Электрофорез на бумаге также применяют для непрерывного (препаративного) разделения значительных по объему смесей молекул, фракционирования клеток различных типов, клеточных органелл и фрагментов мембран. С этой целью верхнюю часть бумажного листа

погружают в кювету с буферным раствором, который под действием капиллярных сил и гравитации движется вниз. Образец, растворенный или суспендированный в буфере, с помощью фитиля подается сверху на бумагу и, опускаясь по ней, попадает в электрическое поле, под действием которого разделяется на составляющие компоненты. Последние собирают в пробирки, расположенные в нижней части камеры (рис. 3.20).

Наряду с положительными свойствами бумага как носитель имеет и недостатки, самым значительным из которых является ее высокая сорбирующая способность, вызывающая существенные количественные потери быстро идущих фракций и создание ими фона. Другим недостатком бумаги является ее непрозрачность, затрудняющая проведение денситометрии. Этих недостатков лишены мембраны из ацетата целлюлозы: они имеют значительно меньшую адсорбционную емкость для белков, прозрачны, что позволяет исследовать чрезвычайно малые количества веществ и затрачивать на электрофорез меньше времени.

Наряду с тонкослойной хроматографией существует и тонкослойный электрофорез (ТСЭ), который осуществляют в тонких слоях окиси кремния, кизельгура, окиси алюминия или целлюлозы, нанесенных на стеклянные пластинки.

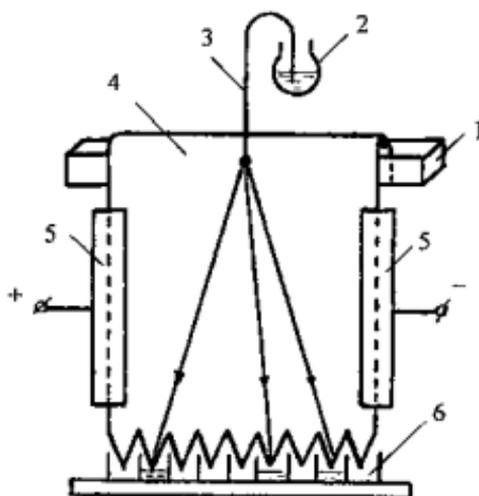


Рис. 3.20. Схема аппарата для препаративного проточного электрофореза на бумаге: 1 – кювета с буферным раствором; 2 – разделяемая смесь; 3 – фитиль; 4 – лист бумаги; 5 – подвод электрического напряжения; 6 – пробирки

Для разделения сверхмалых проб разработаны микромодификации электрофореза на целлюлозных нитях, узких полосках из ацетата целлюлозы, которые позволяют анализировать содержимое десятков клеток или даже единичной клетки.

Электрофорез в гелях. Гели обладают свойством молекулярного сита, и на процесс разделения биополимеров в них дополнительное влияние оказывают поры, по которым под действием электрического поля вынуждены проходить корпускулы. Размеры пор геля могут быть сравнимы с размерами макромолекул, благодаря чему улучшается разделение смесей. К числу пригодных для электрофореза следует назвать крахмальный, агаровый, агарозный и полиакриламидный гели.

Электрофорез в крахмальном геле. Крахмальный гель был первой средой, обладающей свойством молекулярного сита, которую использовали для улучшения разделения при электрофорезе. Крахмал представляет собой нерастворимый в воде полисахарид. Гель готовят путем нагревания и охлаждения смеси частично гидролизованного крахмала с соответствующим буфером. Для электрофореза наиболее пригоден картофельный крахмал, хотя можно использовать и рисовый. Пористость крахмального геля в отличие от полиакриламидного варьирует в довольно небольших пределах. Размер пор в геле определяется концентрацией крахмала и степенью его гидролиза. Крупнопористые крахмальные гели получают при весовой концентрации крахмала в буферном растворе менее 2%, а мелкопористые – при 8-15%. Выдержать точный размер пор, образующихся при этом, не представляется возможным. Расстояние m , пройденное белком при одних и тех же условиях электрофореза, линейно зависит от обратной величины концентрации s крахмала:

$$m = a + b/s,$$

где a и b – константы.

Размеры пор в условиях электрофореза оказались больше, чем вычисленные на основании измерения скорости диффузии белков. Полагают, что сеть из полисахаридных цепей, образующая матрикс геля, не является жесткой и изгибается, когда молекулы белков движутся через нее в электрическом поле. Эта особенность внутренней структуры крахмального геля делает его превосходной антиконвекционной средой. В крахмале содержится некоторое количество отрицательно заряженных боковых цепей, придающих гелю слабые ионообменные свойства.

Гель обычно наносят на прямоугольные пластины из оргстекла, которые могут располагаться как горизонтально (горизонтальный электрофорез), так и вертикально (вертикальный электрофорез). Последний вариант (рис. 3.21) более сложен в конструктивном исполнении, но дает лучшее разделение. Для предотвращения сползания геля его помещают в рамку между двумя пластинами, имеющими в верхней и нижней частях выступы.

Образцы, подлежащие разделению, помещают в углубления (лунки), которые образуются при застывании геля со вставленными в него временно специальными вкладышами, удаляемыми после его застывания. После завершения электрофореза гель обрабатывают красителем. В частности, для белка используют амидовый черный 10 В или нигрозин. Затем гель отмывают от красителя кислым раствором, при этом краситель, связанный с белком, остается вместе с ним в геле. Для количественного фотометрирования окрашенных зон разработаны различные способы просветления фона.

Электрофорез в агаровом и агарозном гелях. Агар для электрофореза выделяют из клеточных мембран различных водорослей. Точная структура агара неизвестна; он содержит по крайней мере два полисахарида – агарозу и агаропектин, которые можно достаточно просто отделить друг от друга. В агаре содержится около 6% сульфата. Отрицательно заряженные сульфатные, а также карбоксильные группы, будучи фиксированными на неподвижных нитях геля, вызывают ток воды, направленный к катоду (электроосмос). Кроме того, они образуют комплексы с липопротеидами низкой плотности и некоторыми основными белками, что ведет к растягиванию и даже задержке их зон. Этот недостаток устраняют, используя вместо агара агарозу, поскольку сульфатные группы связаны преимущественно с агаропектином, а чистая агароза содержит лишь 0,04% этих групп. Подвижность макромолекул зависит от концентрации агара; так, подвижность молекул РНК

$$U = U_0 (1 - K\sqrt{c}),$$

где U_0 – подвижность в свободной среде, c – концентрация агара; K – коэффициент.

При низких концентрациях геля поры достаточно велики, однако при повышении концентрации их размер быстро (а затем с замедлением) убывает (рис. 3.22).

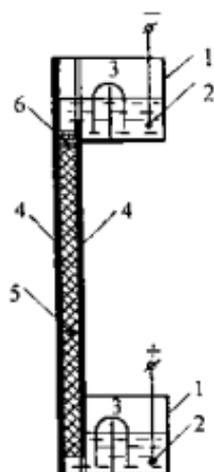


Рис. 3.21. Схема прибора для вертикального электрофореза в геле: 1 – сосуды с буферами; 2 – электроды; 3 – фильтр; 4 – пластины рамки; 5 – гель; 6 – образец

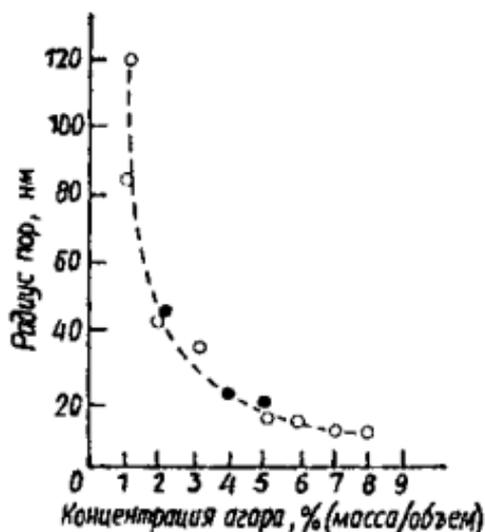


Рис. 3.22. Изменение эффективного радиуса пор в зависимости от концентрации агарового геля (цит. по [16]): о – радиусы, рассчитанные на основании опытов с гемоглобином; • - радиусы, рассчитанные из результатов опытов с вирусом южной мозаики фасоли

Достоинствами агарового геля являются механическая прочность, возможность изменять размер пор в широком диапазоне, а также превращение геля после высушивания в прозрачную пленку, что позволяет фотометрировать электрофореграммы и хранить не повреждая.

В целом аппараты для электрофореза в агаровом и агарозном гелях, а также сама процедура разделения смесей имеют сходство с электрофорезом в крахмальных гелях.

Электрофорез в полиакриламидном геле. В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ, или ПАГ) является одним из наиболее широко распространенных в биохимии. ПААГ получают путем сополимеризации акриламида и бис-акриламида, который образует поперечные сшивки между линейными отрезками полиакриламида (рис. 3.23).

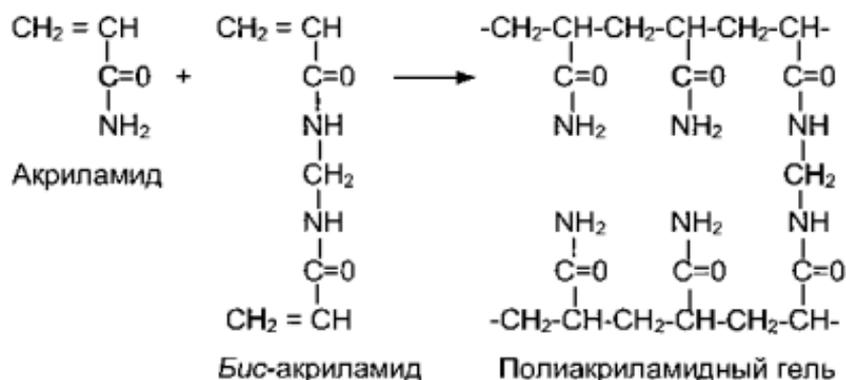


Рис. 3.23. Реакция сополимеризации акриламида с бис-акриламидом

Сополимеризацию осуществляют химическим или фотохимическим путем. Часто применяют в качестве химических катализаторов персульфат аммония и тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД); персульфат аммония неустоек в водном растворе, поэтому было предложено заменить его персульфатом калия. Сополимеризация требует наличия свободных радикалов мономера, которые образуются при основном катализе под действием свободных радикалов кислорода, выделяемых персульфатом. Поскольку для реакции необходимо свободное основание, сополимеризация не идет при низких значениях pH. Молекулярный кислород замедляет или вовсе предотвращает сополимеризацию, поэтому его необходимо удалять вакуумированием.

Фотополимеризацию акриламида осуществляют путем освещения

ультрафиолетовым светом в присутствии рибофлавина и ТЕМЭД. В отличие от химической сополимеризации фотохимическая реакция требует наличия в среде следов молекулярного кислорода (около 1% в газовой смеси). При освещении водного раствора рибофлавина он присоединяет водород и восстанавливается до лейкорибофлавина, который легко окисляется растворенным в воде кислородом, образуя перекись водорода. При разложении последней образуются свободные радикалы OH^{\cdot} , инициирующие цепную реакцию полимеризации акриламида.

ТЕМЭД как при химической, так и при фотохимической полимеризации выполняет функцию катализатора. Нередко его заменяют на 3-диметиламинопропионитрил (ДМАПН), который более эффективен.

Для характеристики ПААГ используют следующие показатели:

T – процентное содержание обоих мономеров (акриламида и *бис*-акриламида);

C – процентное содержание *бис*-акриламида от общего содержания мономеров.

Они вычисляются по формулам:

$$T = ((a+b)/m) \cdot 100\%,$$

$$C = (b/(a+b)) \cdot 100\%,$$

где a – количество акриламида (г); b – количество *бис*-акриламида (г); m – объем буфера (мл).

Величина T практически варьирует в пределах 3-30%, а C , как правило, составляет 1-5%, что соответствует отношению акриламид/ *бис*-акриламид в пределах от 99:1 до 19:1. В некоторых случаях значение C увеличивают до 20% и более.

Величина пор ПААГ определяется как общим содержанием акриламида, так и концентрацией *бис*-акриламида. Зависимость между этими величинами и массой разделяемых молекул сложная и неоднозначная. В качестве примера в табл. 3.1 представлены ориентировочные данные по связи концентрации ПААГ с массой разделяемых молекул (цит. по [16]):

Зависимость массы разделяемых молекул
от концентрации ПААГ

Концентрация геля Т, %	Концентрация бис-акриламида С, %	Пределы разделения, дальтоны
15 – 20	0,2	$1 \cdot 10^4$ - $4 \cdot 10^4$
10 – 15	0,3	$4 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$
5 – 10	3 – 2	$1 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^5$
5	5	$3 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$
2 - 5	6	Выше $5 \cdot 10^5$

ПААГ нашел широкое применение в лабораторной практике благодаря ряду присущих ему достоинств, среди которых можно назвать:

- термостабильность;
- прозрачность;
- механическую прочность;
- сравнительную химическую инертность;
- возможность приготовления геля в широком диапазоне размера пор;

возможность более строго выдерживать постоянство состава геля, так как он, в отличие от крахмала и агары, является средой синтетической; отсюда – лучшая сопоставимость результатов анализа.

В отдельных случаях, например при исследовании полимеров с очень высокой молекулярной массой (нуклеиновых кислот, нуклеопротеидных частиц), используют смешанные полиакриламидно-агарозные гели. При этом агароза лишь улучшает механические свойства разбавленного ПААГ и не влияет существенно на свойственный ему эффект молекулярного сита.

Электрофорез проводят как в пластинах ПААГ, так и в колонках (трубках). Приборы для электрофореза в пластинах имеют типичную конструкцию (см., например, рис. 3.21). Один из вариантов прибора для электрофореза в колонках схематически представлен на рис. 3.24. Он состоит из двух емкостей для буферного раствора, соединенных между собой колонками с ПААГ, которые расположены по окружности вокруг электродов, погруженных в емкости с буфером.

Интересной разновидностью электрофореза в ПААГ является диск-электрофорез, предложенный в 1964 г. Орнштейном (Ornstein) и Девисом (Davis). Название электрофореза произошло от двух английс-

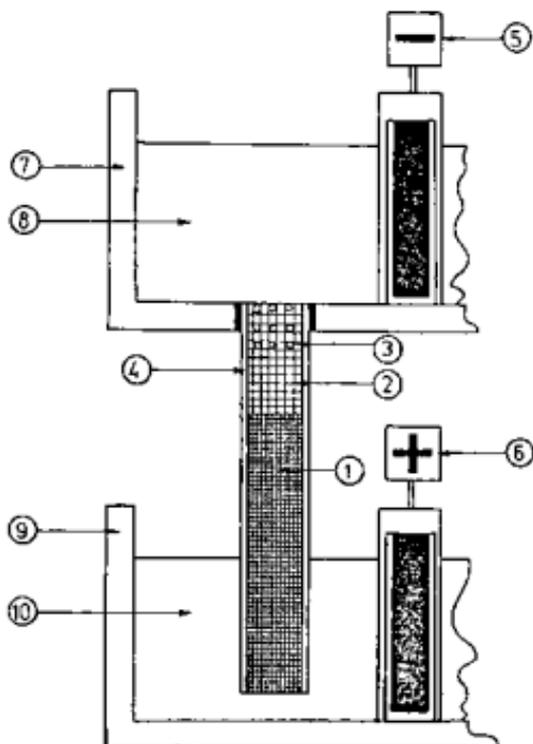


Рис. 3.24. *Схема прибора для электрофореза в ПААГ: 1 – мелкопористый гель; 2 – концентрирующий (крупнопористый гель); 3 – смесь пробы с гелем; 4 – стеклянная трубка (колонка); 5 и 6 – электроды; 7 и 9 – емкости для буфера; 8 и 10 – электродные буферы. На схеме представлен случай диск-электрофореза*

ких слов – discontinuous (неллпрерывный, прерывистый, ступенчатый) и discoid (дислообразный). По случайному совпадению при стандартных условиях проведения опыта разделенные зоны ионов имеют форму дисков. Принцип метода заключается в последовательном электрофорезе смеси сначала в геле с малой концентрацией акриламида (крупнопористый гель), затем в мелкопористом геле. Оба геля соединены друг с другом, причем буферная система крупнопористого геля содержит медленно мигрирующие ионы, а мелкопористый гель и электродные емкости – буфер с быстро мигрирующими ионами. На границе крупнопористого и мелкопористого гелей происходит скачкообразное изменение значения pH, молярности буферов, концентрации геля и гра-

диента напряжения. Все это вызывает «сжатие», концентрирование компонентов пробы, взятой в небольшом количестве и в значительном разведении. Сформированные в виде узких дисков компоненты смеси продолжают перемещаться в мелкопористом геле, удаляясь друг от друга. Отсутствие взаимного перекрытия узких зон является важным достоинством диск-электрофореза, способствующим повышению разрешающей способности метода.

Электрофорез проводят в следующей последовательности. Заполняют большую часть объема трубок раствором акриламида и *бис*-акриламида и осуществляют их химическую сополимеризацию, в результате которой образуется мелкопористый ПААГ. Затем последовательно наслаивают на него мономеры и осуществляют фотополимеризацию, дающую крупнопористый гель и крупнопористый гель в смеси с биопробой. Снаряженные нумерованные трубки через уплотнения закрепляют в дне верхней буферной емкости, которую заполняют буфером с добавленным в него раствором лидирующего (двигающегося в электрическом поле впереди разделяемых компонентов смеси) красителя. В щелочных и нейтральных буферах используют отрицательно заряженные красители, в частности бромфеноловый синий. Для электрофореза в кислой среде используют положительно заряженные красители (метилловый зеленый, пиронин). Заполняют буфером нижнюю буферную емкость и подают на электроды постоянное напряжение. После того, как полоска лидирующего красителя приблизится к нижнему концу трубок, электрофорез прекращают, их извлекают из прибора, с помощью иглы шприца, заполненного водой, столбики ПААГ перемещают из трубок в пробирки, нумерованные теми же числами, что и трубки. Обрезают гелевые столбики по зоне лидирующего красителя и на 30 мин заливают 10%-ным раствором ТХУ (если разделяют белки), которая останавливает диффузию молекул пробы. Затем гель ополаскивают дистиллированной водой и погружают в раствор красителя, например, амидового черного 10 В. После окрашивания краситель сливают и осуществляют отмывку электрофореграмм, обычно с помощью 7%-ного раствора уксусной кислоты, который заменяют до тех пор, пока он не прекратит окрашиваться и участки геля между зонами не станут прозрачными. После этого следует для каждой зоны найти значение коэффициента R_f , равное отношению расстояния, пройденного зоной (от начала мелкопористого геля до середины зоны), к расстоянию, пройденному лидирующим красителем (до нижнего обреза геля). Для этого можно использовать предложенное автором несложное устройство, изготовленное из счетной (логарифмической линейки), которое позволяет точно измерять расстояния, пройденные в геле зонами [35]. Затем осуще-

ставляют денситометрирование электрофореграммы с целью оценки количественного содержания компонентов смеси.

Помимо простой отмывки геля от красителя путем пассивной диффузии последнего применяют ускоренную отмывку (повышая температуру раствора или применяя электрофоретическое удаление красителя). Раствор, используемый для отмывки геля от красителя, после пропускания через слой активированного угля становится бесцветным и может быть повторно (многократно) применен по назначению.

Высокими возможностями для разделения смесей обладает электрофорез в градиенте размера пор ПААГ (в градиенте концентрации геля). В градиенте размера пор скорость перемещения макромолекул определяется преимущественно величиной их заряда в области низкой концентрации геля и их размером в области высокой концентрации, где в максимальной мере проявляется эффект молекулярного сита. Достоинство этой разновидности электрофореза заключается в том, что он подобно диск-электрофорезу приводит к концентрированию компонентов разделяемой пробы, так как в замыкающей части каждой отдельной зоны электрофоретическая подвижность выше, чем в районе ее переднего фронта. Благодаря этому в ходе разделения полосы суживаются, а к концу электрофореза становятся очень тонкими. Для получения воспроизводимых результатов электрофорез следует проводить до тех пор, пока все компоненты смеси не перестанут двигаться.

Для получения ПААГ с градиентом размера пор используют различные устройства, одна из конструкций которых состоит из двух камер с переменным по высоте поперечным сечением (рис. 3.25). В одну из них наливают раствор с высокой концентрацией акриламида, в другую – с низкой. Выходя из камер, растворы смешиваются и подаются в зазор между пластинами прибора или в сосуд с помещенными в него трубками для электрофореза. Вначале из устройства для получения градиента вытекает раствор с низкой концентрацией мономера, которая постепенно будет повышаться. После завершения полимеризации получают ПААГ с уменьшающимся с верха трубки (или пластины) к низу размером пор.

Сверху на гель наслаивают пробу и осуществляют электрофорез.

При разделении белков в ПААГ применяют также градиент значений pH, который создают в колонках или пластинках. Обычно акриламид подвергается фотополимеризации вместе с амфолином. Для получения градиента один электрод помещают в кислый буфер, а другой – в щелочной. Изозлектрическое фокусирование (ИЭФ) в ПААГ обладает чрезвычайно высокой разрешающей способностью.

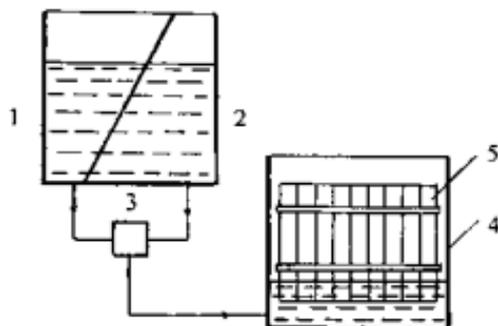


Рис. 3.25. *Схема устройства для получения ПААГ с градиентом размера пор: 1 – камера с низкой концентрацией мономера; 2 – камера с высокой концентрацией мономера; 3 – смеситель; 4 – стакан; 5 – связка трубок для электрофореза*

Еще большее разрешение дает двухмерный электрофорез, который часто проводят в ПААГ. Суть его состоит в том, что вначале осуществляют электрофорез в одном направлении, после чего вырезают полоску геля с зонами компонентов смеси, накладывают ее на стартовую линию пластины геля и выполняют электрофорез по второму направлению. Если условия проведения электрофореза по первому и второму направлениям различаются, то следует ожидать, что неразошедшие зоны при одних условиях будут разделяться при других условиях. К числу параметров, которыми могут отличаться условия разделения по обоим направлениям, относятся концентрация геля, значение pH, наличие или отсутствие градиентов pH, размер пор, содержание в ПААГ додецилсульфата натрия и др. С помощью двухмерного электрофореза можно получить отдельно число зон, измеряемое сотнями и даже тысячами.

ПААГ (а также иные носители) используют при проведении изотахофореза. Суть его состоит в том, что путем соответствующего подбора электролитов создаются условия, когда компоненты разделяемой смеси перемещаются в порядке, определяемом значениями их электрофоретических подвижностей, но с одинаковой скоростью. Отсюда и название – изотахофорез, то есть движение с одинаковой (изо) скоростью (тахо). Чтобы пространственно отделить зоны друг от друга, к биопробе добавляют амфолин (или иные ионы). Изотахофореграммы: белковых смесей очень похожи на картины изоэлектрофокуси-

рования. Преимущество же изотахофореза заключается в том, что в отличие от изоэлектрического фокусирования он не приводит к осаждению белков (в их изоэлектрических точках).

Электрофорез в ПААГ используют не только для разделения белковых смесей, но и для определения молекулярной массы их компонентов. Перед электрофорезом белки обрабатывают додецилсульфатом натрия (ДСН) и 2-меркаптоэтанолом, что приводит к разрушению водородных, гидрофильных и дисульфидных связей, следствием чего является полное растворение даже сравнительно плохо растворимых белков. ДСН как анионный детергент устраняет возможность взаимодействия между гелем и исследуемой смесью, а также нивелирует общий заряд молекулы. Установлено, что различные белки связывают практически одинаковые количества ДСН на единицу массы (1,39-1,42 г ДСН на 1 г белка), поэтому заряд ДСН-белкового комплекса будет прямо пропорционален массе белковой молекулы. Поскольку скорость движения заряженной частицы в электрическом поле прямо пропорциональна величине ее заряда, то применительно к ДСН-белковому комплексу появляется возможность через его электрофоретическую подвижность определить массу входящей в комплекс белковой молекулы. Для ПААГ с постоянной концентрацией связь между коэффициентом R_f и логарифмом молекулярной массы выражается в форме прямой линии.

ПААГ готовят на фосфатном буфере, содержащем 0,1% ДСН. Стандартными для определения молекулярной массы белков разделяемой смеси служат белки с известной молекулярной массой. Для определения молекулярной массы применяют также электрофорез в ПААГ с градиентом размера пор.

Разрешающую способность электрофореза повышает сочетание его с хроматографией и иммунодиффузией, которое привело к созданию комбинированных методов – электрофореза-хроматографии и иммуноэлектрофореза.

5.1.4. Электрофорез-хроматография

Поскольку факторы, определяющие разделение смесей при электрофорезе и хроматографии по разному действуют на движение ее компонентов, то подобно двумерной хроматографии или двумерному электрофорезу в методе электрофореза-хроматографии неразошедшиеся при хроматографии компоненты могут дать отдельные зоны при последующем электрофорезе и наоборот. Электрофорез и хроматография могут осуществляться в любой последовательности или одновременно (рис. 3.26).

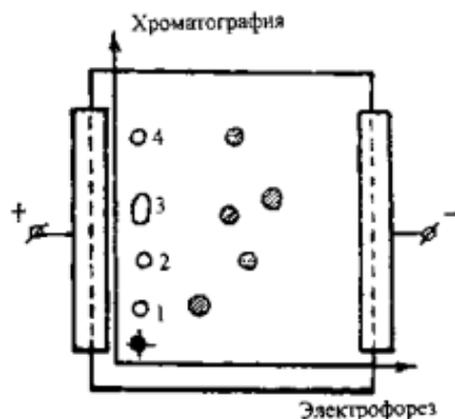


Рис. 3.26. *Схема разделения смеси (обозначена черным кружком) с помощью электрофореза-хроматографии. Пронумерованы зоны, полученные после хроматографии; заштрихованы зоны, полученные после завершения электрофореза*

Белки можно разделять на стеклянной пластине с нанесенным на нее слоем набухшего сефадекса. Для разделения аминокислот путем сочетания хроматографии и высоковольтного электрофореза в качестве носителя применяют бумагу. Во всех этих случаях получают двухмерное разделение, при котором зоны компонентов смеси располагаются не на одной линии, а на плоскости. За такое специфическое расположение зон на электрохроматограмме электрофорез-хроматографию называют методом «отпечатков пальцев». Электрохроматограмму, полученную при разделении пептидов, называют пептидной картой.

5.1.5. Иммуноэлектрофорез

Классический вариант иммуноэлектрофореза предложили в 1953 г. Грабар и Уильямс. Он может быть реализован с использованием различных носителей; часто для этой цели используют агарозу, в которой вследствие ее достаточно высокой прозрачности легко выявляются линии преципитации. Для электрофореза обычно используют отмытые фотопластинки размером 9x12 см², которые устанавливают на горизонтальном столике и заливают 1%-ным раствором агара в электродном буфере. После застывания геля в нем вырезают лунку, в которую вводят пробу, смешанную с расплавленной агарозой. Толщина геля – 2-4 мм, диаметр лунки – тоже 2-4 мм. Затем осуществляют электрофо-

рез, после завершения которого на расстоянии 5-10 мм вдоль трека белков глазным скальпелем вырезают канавки шириной 2-3 мм и заполняют их предварительно полученной антисывороткой (содержащей антитела, специфические по отношению к анализируемым антигенам – белкам пробы).

Процесс двойной диффузии (движение антигенов и антител навстречу друг другу в геле агарозы) может продолжаться до 3 суток во влажной камере. Для предотвращения размножения микроорганизмов в гель необходимо добавлять мертиолят (до 0,01%) или вносить кристаллики фенола во влажную камеру.

При контакте антигенов со своими антителами в процессе двойной диффузии происходит иммунопреципитация, а образующиеся комплексы антиген-антитело (преципитаты) практически теряют свою подвижность. В результате получают иммуноэлектрофореграмму, представляющую собой набор дугообразных зон (дуг), расположенных напротив зон компонентов, образовавшихся после электрофореза пробы (рис. 3.27).

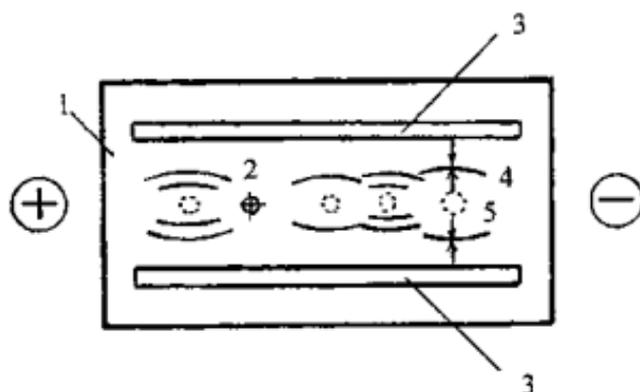


Рис. 3.27. *Схема иммуноэлектрофореза по Грабару и Уильямсу: 1 – пластина геля; 2 – проба; 3 – канавки с одинаковой антисывороткой (две – для надежности расшифровки); 4 – дуги преципитации; 5 – зоны компонентов пробы (сразу после электрофореза, до иммунодиффузии). Стрелками указано направление диффузии антител и антигенов*

Компоненты,двигающиеся единой зоной при электрофорезе, в процессе диффузии в геле пространственно разделяются и дают свои дуги. Благодаря иммуноэлектрофорезу, в частности, удалось идентифицировать в сыворотке крови человека свыше 40 отдельных белков.

С помощью иммуноэлектрофореза можно разделять и выявлять смеси биомолекул растительного, животного и микробного происхождения. Антитела являются своего рода специфическими реагентами, позволяющими отдельно идентифицировать очень близкие в химическом отношении вещества, обнаружить интересующее вещество в сложной смеси. Для этого до проведения иммуноэлектрофореза необходимо иммунизировать лабораторное животное (обычно кролик) индивидуальным веществом, если его желают обнаружить в пробе, или пробой, если требуется выявить все ее компоненты.

В первом случае в конечном счете из крови животного получают моновалентную сыворотку, во втором – поливалентную, которые для отличия от сыворотки неиммунизированного животного называют антисыворотками (АС). На рис. 3.27 представлен последний вариант, когда с помощью поливалентной АС выявляют все компоненты пробы.

Для того, чтобы на полученной иммуноэлектрофореграмме обнаружить дугу, принадлежащую конкретному веществу, необходимо для этого вещества получить моновалентную АС и заполнить ей вторую канавку (первую заполняют по-прежнему поливалентной АС). Тогда на стороне, обращенной к моновалентной АС, образуется лишь одна дуга, симметричная искомой зоне в системе дуг, образованной поливалентной АС. Возможен и другой способ выявления искомого вещества на иммуноэлектрофореграмме, своего рода метод свидетеля. На одной стартовой линии делают две лунки, в одну из которых вводят смесь веществ, а в другую – индивидуальное вещество, которое хотя и обнаружить в анализируемой пробе. После электрофореза между треками веществ (вдоль направления разделения) прорезают канавку и заполняют ее поливалентной АС. Если в пробе есть данное индивидуальное вещество, то на стороне канавки, обращенной к нему, образуется дуга преципитации, против которой среди дуг пробы будет находиться симметрично расположенная дуга такого же вещества-компонента. Таким же образом можно идентифицировать и остальные зоны (дуги).

Для количественного определения компонентов смеси в рассматриваемом варианте иммуноэлектрофореза необходимо отмыть гелевую пластину от непрореагировавших веществ, окрасить соответствующим красителем дуги, удалить из геля не связанный с ними краситель, после чего профотометрировать по всей поверхности каждую дугу. На основании результатов фотометрирования можно рассчитать количественное (относительное или абсолютное) содержание компонентов.

Для количественного определения антигена Лорелл в 1966 г. предложил электроиммунный метод анализа, который за специфическую форму зон преципитации называют ракетным иммуноэлектрофорезом. Суть его состоит в том, что электрофорез белка-антигена, введенного в лунку, осуществляют в пластине агарозы, содержащей его АС. Под действием электрического поля белок мигрирует в геле. Миграция продолжается до тех пор, пока весь белок не свяжется со своими антителами, образуя преципитат. По расстоянию, пройденному передним фронтом белка (высоте «ракеты»), или площади под пиком судят о количестве белка-антигена. Количественное (абсолютное) содержание белка устанавливают с помощью стандартов с известной концентрацией, введенных в свои лунки на пластине агара (рис. 3.28).

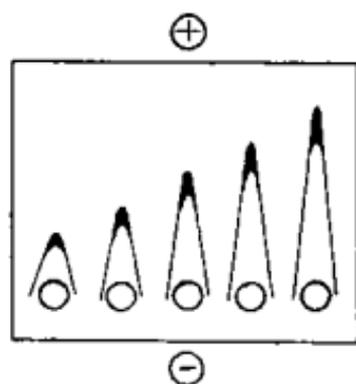


Рис. 3.28. Зоны преципитации («ракеты Лорелла»), полученные для растворов стандартного белка с возрастающей (слева направо) концентрацией

Для количественного определения белков в их смеси и ускорения процесса разделения компонентов смеси применяют перекрестный иммуноэлектрофорез (метод Кларка и Фримена, 1967 г.). В его основе лежит ракетный иммуноэлектрофорез. Разделение пробы осуществляют в следующем порядке. Сначала смесь белков-антигенов разделяют с помощью обычного электрофореза в геле. Затем осуществляют миграцию в электрическом поле (по сути, двухмерный электрофорез) во втором, перпендикулярном первому направлении. Миграция идет в геле агарозы, смешанной с поливалентной АС по отношению к компонентам разделяемой смеси. Каждый белок-антиген мигрирует независимо от других и образует зоны преципитации, подобные «ракетам Лорелла», но более широкие у основания и напоминающие хро-

матографические пики. Трансформация дуг преципитации в пики обусловлена более высокой скоростью миграции в электрическом поле по сравнению с пассивной диффузией в варианте Грабера и Уильямса. Расширение же пиков у основания связано с тем, что миграция начинается не из резко очерченной лунки, а из более или менее размытой белковой зоны. Следующая примечательная особенность перекрестного иммуоэлектрофореза состоит в том, что два белка, не разделившиеся при первоначальном электрофорезе и оказавшиеся в одной зоне, при миграции в электрическом поле через поры геля с АС легко обнаруживаются в виде двух пиков, наложенных друг на друга, но не совпадающих по высоте и по форме.

Наибольшую сложность в иммуоэлектрофорезе, по-видимому, представляет техника получения антисыворотки, связанная с выполнением процедур иммунизации животного и последующего отбора крови у них. Для овладения техникой иммунизации необходима стажировка в иммунохимической лаборатории под руководством работника, имеющего опыт таких операций.

5.1.6. Некоторые особенности электрофореза белков

Хотя в целом любая корпускула, несущая электрический заряд, способна к перемещению в электрическом поле, конкретные группы соединений предъявляют свои требования к условиям разделения с помощью электрофореза.

Наиболее часто электрофорез используют для исследования белков. В целом, с повышением сложности электрофореза его разрешающая способность растет в направлении от электрофореза на бумаге к электрофорезу в гелях с градиентами значений рН и размера пор, иммуоэлектрофорезу.

Поскольку белки представляют собой цвиттерионы, суммарный заряд их молекул зависит от значения рН буфера. Однако определяющим при электрофорезе является не сам заряд, а степень различия зарядов компонентов смеси, определяющая различие в скоростях движения белков и качество их разделения. Поэтому помимо свойств носителя существенным является выбор оптимального значения рН.

Немаловажен и состав буфера, который обеспечивает это значение рН, а также его (буфера) молярность. От концентрации ионов и их электрофоретической подвижности зависит электрическое сопротивление буфера, пропитывающего гель, и, соответственно, напряженность электрического поля на его участках, в большой мере определяющая скорость движения разделяемых белков. Эта особенность с успехом используется в ступенчатом электрофорезе для «сжа-

тия» пробы, последующее разделение которой происходит при постоянном значении напряженности.

После завершения электрофореза стоит задача выявления разделившихся зон, для решения которой обычно используются красители. Их выбор также зависит от специфических особенностей разделяемых белков.

Конкретные примеры, взятые из практики электрофореза белков, подтверждают сказанное выше относительно учета условий их разделения.

Белки сыворотки крови – классический объект электрофореза – разделяют при pH 8,5 в вероналовом буфере или в трис-глициновом буфере с pH 8,9 в геле. Липопротеины плазмы крови разделяют путем электрофореза на ацетате целлюлозы, в агарозном и полиакриламидном гелях.

Гемоглобины разделяют на ацетат-целлюлозной мембране в буферной системе трис-борная кислота-ЭДТА с pH 8,4 или в цитратном буфере.

Белки спинномозговой жидкости разделяют на ацетате целлюлозы, в агаровом или агарозном геле в условиях, сходных с электрофорезом белков плазмы крови.

Рибосомные белки разделяют в ПААГ, при этом разделяющий гель содержит 0,12 М калий-ацетатный буфер с pH 4,5, а концентрирующий гель – 0,06 М калий-ацетатный буфер с pH 6,8.

Белки мембран разделяют в ПААГ с ДСН после предварительной инкубации мембран с протеолитическими ферментами и выделения белков.

Ферменты разделяют с использованием множества различных систем буферных растворов, гелей и ацетата целлюлозы. Чтобы предотвратить денатурацию белков, нельзя использовать буферы с чрезмерно высокими или низкими значениями pH, а при исследовании термолабильных ферментов необходимо тщательно охлаждать систему.

Приведенные примеры – это лишь отдельные варианты, предлагаемые различными авторами.

Идентификация сложных белков. Многие белки являются сложными и в своем составе содержат небелковую часть (простетическую группу) углеводной, липидной, нуклеиново-кислотной и иной природы. Принадлежность сложного белка к той или иной категории устанавливают путем окраски его зоны на электрофореграмме специфическим реактивом, реагирующим с простетической группой. Для выявления как простых (не содержащих простетическую группу), так и сложных белков используют кислые красители, содержащие сульфо-

новые группы, взаимодействующие с основными группами белка. К таким универсальным красителям на белки относятся: бромфеноловый синий, амидовый черный 10В, кумасси голубой, азокармин, лиссамин зеленый, нигрозин, понцеан красный, кислый фуксин и др.

Для обнаружения гликопротеидов и мукополисахаридов предложены такие методы, как окраска толуидиновым синим, коллоидным железом, алциановым голубым и др. Наибольшее распространение получил метод выявления гликопротеидов с помощью реакции с йодной кислотой и альдегидным реактивом Шиффа.

Липопротеиды выявляют с помощью неполярных красителей: суданового черного В, масляного красного О, жирного красного 7В, масляного голубого, флуоресцирующего красителя протопорфирина XI и др.

Разработаны методы специфического окрашивания и других сложных белков.

Идентификация ферментов. Многие белки являются ферментами, которые после грамотно проведенного электрофореза сохраняют свою каталитическую активность. Преимущество способов обнаружения ферментов, основанных на их активности, состоит в их высокой специфичности и чувствительности, поскольку эти способы выявляют не ничтожное количество фермента, а на порядки большее количество образованного им продукта.

В связи с тем, что с целью сохранения ферментативной активности электрофореграмму не фиксируют (например, погружением геля в раствор ТХУ), а ферменты продолжают диффундировать из своей зоны, их локализацию необходимо проводить как можно быстрее после прекращения электрофореза.

Обнаружение ферментов можно производить двумя способами: а) последовательным вырезанием небольших участков геля, элюированием из них белков и определением в элюате ферментативной активности обычными «пробирочными» методами; б) проведением ферментативной реакции непосредственно на электрофореграмме. Последний способ более предпочтителен. Фермент должен специфически катализировать реакцию, с помощью которой его выявляют, а продукты реакции должны быть нерастворимыми (или малорастворимыми), чтобы своей диффузией не исказить местоположение фермента.

Методы локализации ферментов непосредственно на электрофореграмме можно разделить на несколько типов:

1. В результате ферментативного превращения субстрата образуется визуально наблюдаемый продукт (окрашенный, в виде пузырьков газа и др.). Например, в месте локализации каталазы на геле, опущенном в раствор перекиси водорода, образуются пузырьки кислорода.

2. Неокрашенный продукт ферментативной реакции переводят в окрашенное соединение химическим путем. Например, для обнаружения фосфатаз в качестве субстрата используют фосфат нафтола в растворе, содержащем соли диазония. При инкубировании геля с этим раствором образуется бесцветный нафтол (продукт ферментативной реакции), который реагирует с солью диазония и образует окрашенное соединение (азокраситель).

3. Метод включения в гель субстрата. Например, для выявления амилазы перед полимеризацией акриламида к нему добавляли растворимый крахмал. После электрофореза гель инкубировали 5 мин при 37° в 0,1 М ацетатном буфере (pH 6,0) и окрашивали 0,1%-ным раствором йода в йодистом калии, содержащем уксусную кислоту. В тех местах, где находилась амилаза, появлялись бесцветные полосы на фиолетовом фоне.

4. Метод индикаторного геля. Его часто применяют при электрофорезе на полосках ацетата целлюлозы. Электрофорез проводят обычным способом, а затем на электрофореграмму осторожно, следя за тем, чтобы обе поверхности полностью соприкасались, накладывают индикаторный гель, содержащий субстрат, соответствующий буфер и кофакторы. Электрофореграмму с индикаторным гелем инкубируют во влажной камере, после чего последний окрашивают для обнаружения продукта ферментативной реакции. Так, в частности, можно выявить локализацию амилазы.

5. В некоторых случаях неокрашенный продукт реакции, катализируемой исследуемым ферментом, превращают в окрашенное соединение, используя какой-либо вспомогательный фермент. Так, в частности, определяют локализацию некоторых трансфераз.

В заключение следует отметить, что среди инструментальных методов только хроматография и электрофорез в процессе анализа пробы осуществляют ее фракционирование, то есть разделение на составляющие компоненты, которые при необходимости могут быть подвергнуты дальнейшему всестороннему исследованию.

5.2. Кондуктометрический метод анализа

5.2.1. Теоретические основы кондуктометрического анализа

Кондуктометрическим методом анализа называется метод, основанный на измерении электропроводности растворов.

Водные растворы электролитов обладают электропроводностью, то есть способностью проводить электрический ток. Их называют проводниками второго рода, поскольку, в отличие от металлов (проводников первого рода), носителями зарядов в электролитах являются не электроны, а ионы – корпускулы, по массе превосходящие электрон на три порядка и более. Этим обстоятельством, а также тем, что движение ионов совершается в жидкой среде, оказывающей большое гидродинамическое сопротивление, объясняются низкие значения их электрофоретической подвижности u (которая, напомним, равна скорости при напряженности 1 В/см). Так, подвижность при 25° составляет: для H^+ 36,2; K^+ 7,6; Na^+ - 3,9; NH^+ - 7,6; OH^- - 20,5; Br^- - 8,1; NO_3^- - 7,4 мкм/с.

Если к двум платиновым электродам, помещенным в раствор электролита (рис. 3.29), приложить напряжение U , то через раствор потечет ток, сила которого в соответствии с законом Ома

$$i = U / r,$$

где r – сопротивление жидкого проводника длиной l и площадью поперечного сечения S .

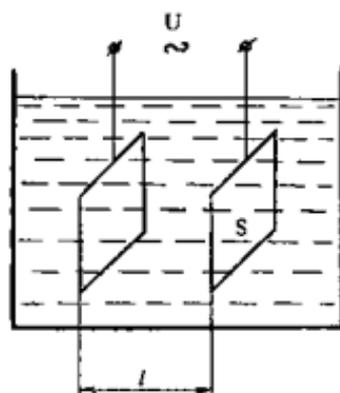


Рис. 3.29. Схема электролитической ячейки в кондуктометрическом методе

С другой стороны, сопротивление

$$r = \rho \frac{l}{S},$$

где ρ - удельное сопротивление (Ом·см).

Электропроводность электролита

$$w = \frac{1}{r} = \frac{1}{\rho} \cdot \frac{S}{l} = \chi \frac{S}{l},$$

где χ - удельная электропроводность (Ом⁻¹см⁻¹).

Электропроводность раствора прямо пропорциональна концентрации ионов, величине их заряда, подвижности, а также отношению S/l , которое является постоянным для электролитической ячейки.

Поскольку в электролите заряды переносят как положительные (катионы), так и отрицательные (анионы) ионы, то электропроводность определяется всей их совокупностью.

Электропроводность электролита зависит от температуры: она увеличивается приблизительно на 2% при повышении температуры на 1°. Поэтому при точных измерениях необходимо строго поддерживать температуру на постоянном уровне или вносить поправку на ее изменение.

Если в растворе имеется один электролит с концентрацией C , то его электропроводность

$$w = \chi \frac{S}{l} = k \frac{SCu}{l},$$

откуда $\chi = kCu$ (k - коэффициент пропорциональности). Поскольку при постоянной температуре электрофоретическая подвижность тоже постоянная, то удельная электропроводность определяется только концентрацией ионов и зависит от нее линейно.

Поэтому по замеренному значению удельной электропроводности (χ) или электропроводности (w) можно определить и концентрацию ионов в растворе электролита (но не самого электролита). Зависимость от концентрации электролита сложная и объясняется с позиции классической теории электролитической диссоциации Аррениуса, согласно которой:

- 1) электролиты в растворах распадаются на ионы (диссоциируют);
- 2) диссоциация является неполной, при этом молекулы и ионы на-

ходятся в термодинамическом равновесии и к ним применим закон действующих масс, выраженный через концентрации;

3) наличие ионов в растворе предопределяет его электропроводность.

Для оценки полноты диссоциации Аррениус ввел понятие «степень диссоциации»:

$$\alpha = \frac{\text{число диссоциированных молекул } (C)}{\text{общее число растворенных молекул } (C_0)}$$

Степень диссоциации с увеличением исходной концентрации молекул непрерывно понижается. Поскольку χ линейно растет с увеличением C , которая, с одной стороны, увеличивается с повышением C_0 ($C = \alpha C_0$), а с другой – убывает, так как α уменьшается с увеличением C_0 , то график зависимости χ от C_0 представляет собой кривую с максимумом (рис. 3.30). Слева от максимального значения χ диссоциация преобладает над редиссоциацией (образованием из ионов электронейтральных молекул), справа, наоборот, редиссоциация преобладает над диссоциацией.

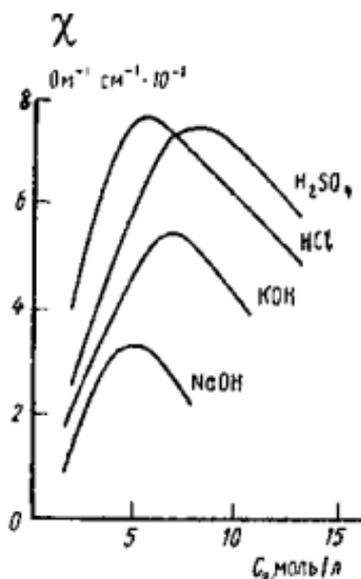


Рис. 3.30. Зависимость удельной электропроводности водных растворов некоторых электролитов от их концентрации [28]

Нахождение концентрации электролита на основании замеренного значения χ по графику $\chi(C_0)$ называется прямым кондуктометрическим анализом. Несмотря на свою простоту, он не нашел широкого распространения в лабораторной практике. Это связано с тем, что электропроводность электролита определяется суммой электропроводностей всех ионов. Поэтому даже малейшие примеси могут значительно изменить электропроводность и исказить результат. Этот метод применяется на производствах, в случае если не требуется высокая точность (например, в солемерах). В лабораторной практике используют кондуктометрическое титрование.

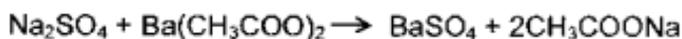
5.2.2. Кондуктометрическое титрование

Сущность метода титрования заключается в том, что количественное содержание вещества в пробе определяют расчетным путем по объему раствора с известной концентрацией, пошедшего на химическую реакцию, завершившуюся полным израсходованием этого вещества. В классическом варианте титрования момент завершения реакции устанавливают с помощью специально подобранного индикатора, который изменяет свою окраску при достижении титруемым раствором определенного значения pH, соответствующего концу реакции. Такой вариант требует подбора для каждой реакции своего индикатора, достаточно субъективен при оценке степени выраженности окраски и непригоден, если реагирующие растворы (или продукт их реакции) сами имеют окраску.

Кондуктометрическое титрование позволяет точно и объективно на графике (кривой титрования) найти точку эквивалентности, то есть установить объем титрующего раствора, пошедшего на полное израсходование исследуемого вещества, путем измерения электропроводности раствора, независимо от того, имеет ли раствор окраску или нет.

В процессе титрования происходит изменение качественного и количественного состава титруемого раствора, поскольку в него добавляют титрующий раствор. В результате химической реакции исходные вещества расходуются, а вместо них образуются новые. К тому же при титровании изменяется объем раствора, а с ним и концентрация растворенных веществ, от которой зависит его электропроводность. Чтобы уменьшить влияние разбавления на электропроводность, титрующий раствор, как правило, берут на порядок более концентрированным, чем титруемый. Кроме того, для определения концентрации веществ кондуктометрическим титрованием используют реакции нейтра-

лизации, образования малорастворимых осадков и реакции комплексообразования. Все это несколько облегчает анализ получаемых результатов и позволяет предсказать существование как минимум трех типов кривых титрования. Если в результате химической реакции происходит замена более подвижного иона менее подвижным, вначале происходит снижение электропроводности, которое после достижения точки эквивалентности сменяется повышением вследствие введения в раствор избытка ионов высококонцентрированного титрующего раствора. Например, в процессе титрования раствора сульфата натрия раствором ацетата бария



на смену подвижному SO_4^{2-} , который уходит в осадок, приходит мало подвижный ион CH_3COO^- (концентрация иона Na^+ остается неизменной), поэтому до точки эквивалентности происходит снижение электропроводности (рис. 3.31а). Если при титровании происходит замена ионов с близкими значениями подвижности, участок графика до точки эквивалентности будет практически горизонтальным (рис. 3.31б), а если менее подвижный ион заменяется на более подвижный, то как до точки эквивалентности, так и после нее будет происходить повышение электропроводности, но после точки эквивалентности оно будет более быстрым, поэтому в точке эквивалентности оно будет более быстрым, поэтому в точке эквивалентности появится излом графика (рис. 3.31в).

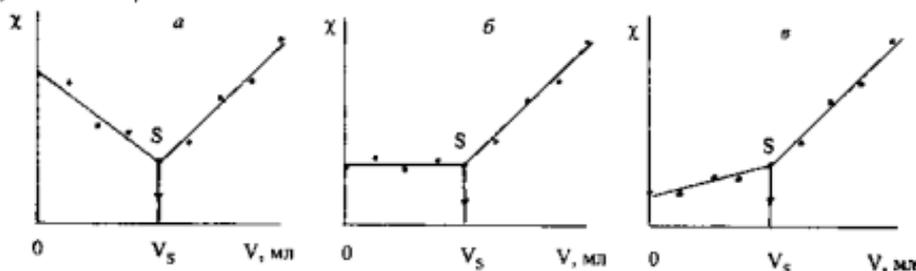


Рис. 3.31. *Различные типы кривых кондуктометрического титрования: S – точка эквивалентности; V_S – объем титрующего раствора, израсходованного на титрование исследуемого вещества*

Возможны и другие варианты кривых кондуктометрического титрования: в частности, при титровании слабой кислоты слабым основанием (или наоборот) электропроводность вначале растет, а после достижения точки эквивалентности остается практически на постоянном уровне, поскольку слабое основание (или кислота) мало изменяет общую электропроводность раствора. Это проявляется, например, в

титровании смеси двух кислот (сильной – соляной и слабой – уксусной) слабым основанием (раствором аммиака). В данном случае кривая титрования будет иметь два излома: первому соответствует завершение титрования соляной кислоты, второму – уксусной кислоты, после чего электропроводность раствора при дополнительном поступлении раствора аммиака практически не изменяется (рис. 3.32).

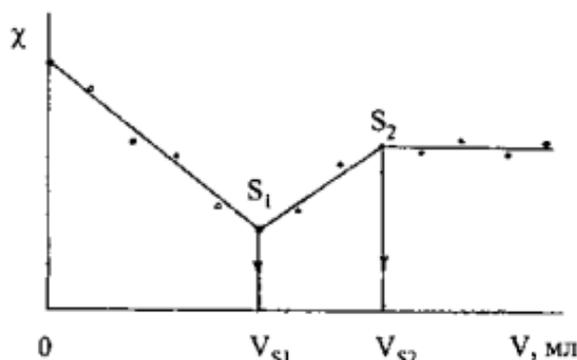


Рис. 3.32. Кривая кондуктометрического титрования смеси HCl и CH_3COOH раствором NH_4OH

5.2.3. Аппаратура кондуктометрического метода

Прибор для классического варианта кондуктометрического анализа (рис. 3.33) состоит из электролитической ячейки (1), устройства для измерения электропроводности (сопротивления) титруемого раствора (2), бюретки (3) и магнитной мешалки (4).

При кондуктометрическом анализе в электролитическую ячейку (химический стакан) наливают определенный объем титруемого раствора, погружают в него платиновые электроды и осуществляют определение исходного сопротивления раствора. Так как площадь электродов и расстояние между ними сохраняются неизменными, ограничиваются нахождением не удельной электропроводности χ , а общей – w_x , которую вычисляют после измерения сопротивления между

электродами R_x по формуле $w_x = 1/R_x$. Сопротивление R_x измеряют с помощью мостовой схемы (мост Уитстона). Одним из плеч моста является сопротивление испытуемого раствора (R_x), другое представлено постоянным сопротивлением (R_1), а два остальных

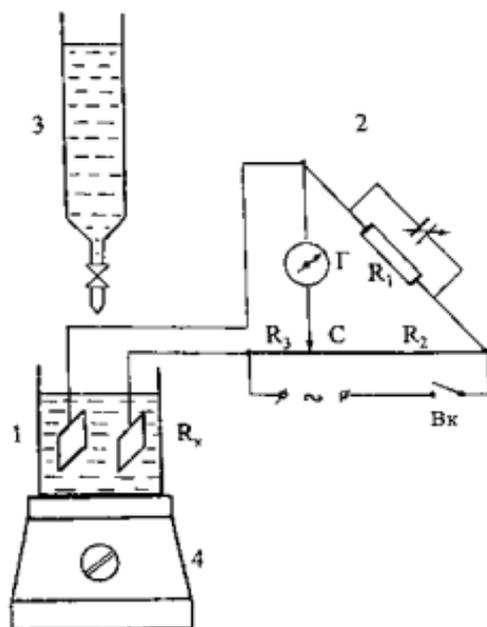


Рис. 3.33. Принципиальная схема прибора для кондуктометрического титрования (объяснения в тексте)

(R_2 и R_3) – переменными сопротивлениями, которые в приборе Кольрауша выполнены в виде реостата: подвижный контакт (С) скользит по поверхности калиброванной проволоки определенной длины. К двум точкам моста подают переменное напряжение (обычно с частотой 50 или 1000 Гц), а две другие точки соединены с нуль-гальванометром (Г), стрелка которого в выключенном состоянии стоит в середине шкалы (на нуль). После включения схемы в работу (с помощью тумблера Вк) скользящий контакт перемещают в такое положение, при котором стрелка гальванометра встанет на нуль. Этому случаю соответствует соотношение сопротивлений

$$R_x / R_1 = R_3 / R_2, \text{ откуда}$$

$$R_x = R_1 (R_3 / R_2), \text{ а } w_x = 1 / R_x.$$

Поскольку сопротивление R_1 – постоянное, то при измерениях сопротивления раствора важно только отношение сопротивлений R_3 / R_2 . Затем с помощью бюретки порциями добавляют в стакан титрующий раствор и после перемешивания магнитной мешалкой каждый раз определяют новые значения w_x , по которым на миллиметровой

бумаге строят график. Точка эквивалентности (S) находится в месте пересечения двух ветвей графика, которые проводят через точки на бумаге, причем для каждой ветви должно быть отложено не менее 4-5 точек. Против точки S на оси V находят объем V_s , пошедший на титрование, после чего рассчитывают количество исследуемого вещества в титруемой пробе.

Для нахождения V_s необязательно рассчитывать значения w_x , можно просто строить график в осях V - R_1/R_2 и также находить точку пересечения линий (но уже не прямых, а кривых).

Следует отметить, что в современном приборе для кондуктометрического анализа вместо калиброванной проволоки используют специальный реохордный мост, который дает более точные замеры сопротивлений. Переменный ток практически устраняет поляризацию платиновых электродов, искажающую результаты измерений, а платина в качестве материала для электродов выбрана из-за ее химической инертности.

5.2.4. Высокочастотное титрование

В описанном классическом варианте кондуктометрического титрования металлические электроды погружены в раствор электролита, и в случае приложения к ним напряжения возникает непосредственный контакт носителей заряда в жидкости (ионов) и в металле (электронов), который обеспечивает непрерывное прохождение электрического тока по цепи.

Проводимость электролита обусловлена перемещением ионов и называется активной. В случае с высокочастотным титрованием электролитическую ячейку (стакан с электролитом) помещают между металлическими пластинами, к которым прикладывают напряжение с частотой в десятки мегагерц (МГц). Поскольку стекло является диэлектриком, непосредственный контакт носителей зарядов в проводниках первого (пластинах) и второго рода (электролите) отсутствует. Однако в электролите создается градиент напряжения, который вызывает перемещение ионов – активную проводимость. Наряду с ней происходит поляризация атомов в молекулах электролита (поляризация смещения) и упорядоченное расположение молекул (поляризация ориентации), которые создают так называемую реактивную проводимость. Полная проводимость электролита равна сумме активной и реактивной проводимостей. Соотношение между ними изменяется с повышением частоты приложенного к пластинам напряжения в пользу реактивной проводимости.

Высокочастотное титрование осуществляют на установке (рис. 3.34), имеющей принципиальное сходство с описанной выше. Также в стакан с титруемым раствором (пробой) порциями подают титрующий раствор при непрерывно работающей мешалке. На пластины, которые вместе с электролитической ячейкой (стаканом с раствором) представляют конденсатор, от генератора высокой частоты подают высокочастотное напряжение. Сила тока в электрической цепи зависит от проводимости ячейки, а значения обеих составляющих полной проводимости при титровании раствора изменяются.

Для нахождения точки эквивалентности на листе бумаги строят график зависимости силы тока, проходящего через ячейку, от объема добавленного в нее титрующего раствора. В точке эквивалентности происходит излом кривых.

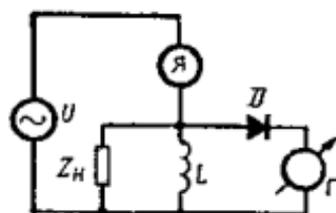


Рис. 3.34. Схема установки для высокочастотного титрования: U – высокочастотный генератор; Y – ячейка с анализируемым раствором; Z_n – сопротивление нагрузки; L – дроссель; D – детектор; G – гальванометр

Кривые высокочастотного титрования могут иметь сложный вид в зависимости от величины удельной электропроводности, диэлектрической проницаемости и частоты применяемого тока. На рис. 3.35 приведен один из примеров кривых высокочастотного титрования.

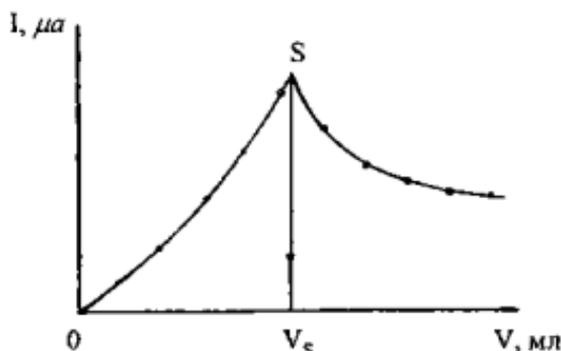


Рис. 3.35. Кривая высокочастотного титрования

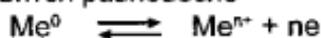
Возможен вариант, когда ячейку с анализируемым раствором помещают внутрь индукционной катушки, также подключаемой к высокочастотному генератору.

Высокочастотное титрование имеет определенные преимущества перед классическим вариантом кондуктометрического титрования. Это – отсутствие контакта металлических электродов с исследуемым раствором, исключаящее нежелательное влияние их на раствор (поляризация, каталитическое действие) и необходимость использовать дорогостоящую платину. Кроме того, титрование можно проводить и в неводных средах, у которых отсутствует активная проводимость.

5.3. Потенциометрический метод анализа

5.3.1. Теоретические основы потенциометрического метода анализа

Потенциометрический метод анализа основан на изменении величины потенциала электрода в зависимости от физических и физико-химических процессов в исследуемых растворах. Если металлическую пластину (электрод) опустить в раствор, содержащий ионы этого же металла, то между электродом и раствором через некоторое время установится равновесие



и возникнет равновесный электрический потенциал

$$E_r = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln [\text{Me}^{n+}],$$

где E_0 – потенциал электрода в растворе с концентрацией ионов, равной единице (нормальный потенциал);

$[\text{Me}^{n+}]$ – концентрация ионов металла;

R – газовая постоянная;

T – абсолютная температура;

F – число Фарадея;

n – заряд ионов металла.

Принимая температуру равной 25°C (298°K) и вводя в приведенное выше уравнение Нернста коэффициент (множитель) для перевода натуральных логарифмов в более привычные десятичные ($k=2,3026$), получим

$$E_x = E_0 + \frac{0,058}{n} \lg [\text{Me}^{n+}].$$

Уравнение Нернста свидетельствует о том, что значение равновесного потенциала прямо пропорционально температуре и логарифму концентрации ионов металла. Напрямую значение этого потенциала измерить невозможно, поэтому используют косвенный метод, который основан на сравнении значения потенциала одного электрода со значением потенциала другого электрода. Два электрода, погруженные в соответствующие растворы, в совокупности образуют гальванический элемент, ЭДС которого равна алгебраической сумме потенциалов каждого из электродов по отдельности. Один из электродов подключают к одной клемме гальванометра, второй – к другой, сам же гальванометр осуществит алгебраическое суммирование потенциалов этих электродов, хотя абсолютные значения их потенциалов остаются неизвестными. Чтобы внести некоторую определенность в этом вопросе, условились измерять потенциалы электродов по отношению к потенциалу одного электрода – нормального водородного электрода. Его потенциал условно принят за нуль. Нормальный водородный электрод представляет собой платиновую пластинку, покрытую платиновой чернью, насыщенной водородом при нормальном атмосферном давлении. Пластинка погружена в раствор с активностью водородных ионов, равной 1 г-эквиваленту. Потенциал электрода, погруженного в раствор соответствующей соли с активностью ионов в 1 г-экв (в разбавленных растворах она практически равна концентрации ионов), измеренный относительно водородного электрода, называют нормальным электродным потенциалом (E_0). Если электрод изготовлен из металла, стоящего в ряду активностей до водорода (например, медь, ртуть, серебро и др.), то его заряд E_0 положительный, а если из стоящего после водорода (например, алюминий, марганец, цинк, хром, свинец и др.) – заряд E_0 отрицательный.

Поскольку водородный электрод создать в повседневной практике сложно, вместо него используют более простой неполяризуемый электрод, потенциал которого не изменяется в процессе титрования. Его называют электродом сравнения, или стандартным электродом. По отношению к нему измеряют потенциал другого электрода, который реагирует на изменение концентрации определенного иона. Его

называют индикаторным электродом. С помощью этого электрода (в паре с электродом сравнения) можно решить ряд практически важных задач.

5.3.2. Применение потенциометрического метода

В лабораторной практике потенциометрический метод применяется обычно для решения следующих задач:

- определения концентрации ионов в растворе;
- определения точки эквивалентности при титровании;
- изучения хода химических реакций.

Определение концентрации ионов. Величина потенциала индикаторного электрода, опущенного в исследуемый раствор, однозначно связана с концентрацией ионов в последнем. Зависимость эта, в соответствии с уравнением Нернста, логарифмическая и на графике,

построенном в полулогарифмических осях $E_x = f(\lg [Me^{n+}])$, представляет прямую линию. Построив калибровочный график для конкретного иона, можно с его помощью определять неизвестную концентрацию этого иона в исследуемом растворе на основании замеренного значения потенциала индикаторного электрода.

Очень часто в лабораторной практике приходится находить концентрацию ионов водорода, которую обычно выражают в виде значения отрицательного десятичного логарифма молярной концентрации ионов водорода, обозначаемого символом pH (введен Сёренсеном), после которого указывают само численное значение. Поскольку значение pH уже само выражено в логарифмической форме, то зависимость E_x от pH линейная, а шкала прибора, по которой читают значение pH, равномерная. Обычно приборы, с помощью которых измеряют потенциал электрода, помимо шкалы, указывающей потенциал в милливольтгах, имеют одну, а чаще всего несколько шкал для значений pH. Поэтому такие приборы – потенциометры – обычно называют pH-метрами.

Потенциометрическое титрование. Осуществляется так же, как и в классическом варианте титрования, с той лишь разницей, что о его завершении судят не по изменению окраски цветного индикатора, а по изменению потенциала индикаторного электрода, который вместе с электродом сравнения опущен в сосуд с титруемым раствором. Последний непрерывно перемешивается с помощью магнитной мешалки. После каждой добавленной порции титрующего раствора по шкале милливольт или pH регистрируют положение стрелки показывающего

прибора (или число, высвечиваемое цифровым индикатором). Поскольку титрование – это химическая реакция, то в процессе ее протекания изменяется концентрация регистрируемого иона, а с ней и потенциал индикаторного электрода. Обычно в районе точки эквивалентности происходит резкое изменение потенциала E (и pH). При титровании раствором кислоты значение pH снижается, при титровании раствором щелочи – повышается (рис. 3.36).

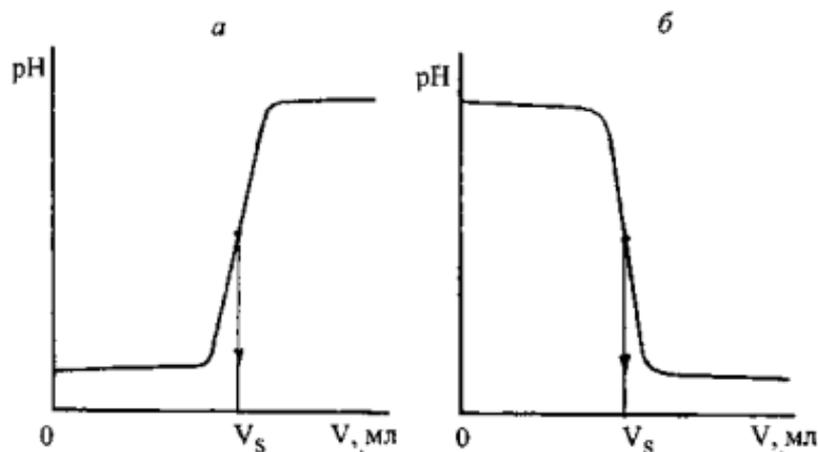
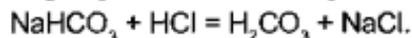
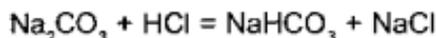


Рис. 3.36. Кривые потенциметрического титрования раствора HCl раствором NaOH (а) и раствора NaOH раствором HCl (б)

При титровании многоосновных и слабодиссоциирующих кислот и оснований, а также солей многоосновных кислот на кривой потенциметрического титрования можно выявить две и более точки эквивалентности. Например, при титровании раствора карбоната натрия раствором соляной кислоты протекают следующие реакции:



Первая точка эквивалентности (S_1) соответствует образованию NaHCO_3 , вторая (S_2) – образованию H_2CO_3 (рис. 3.37).

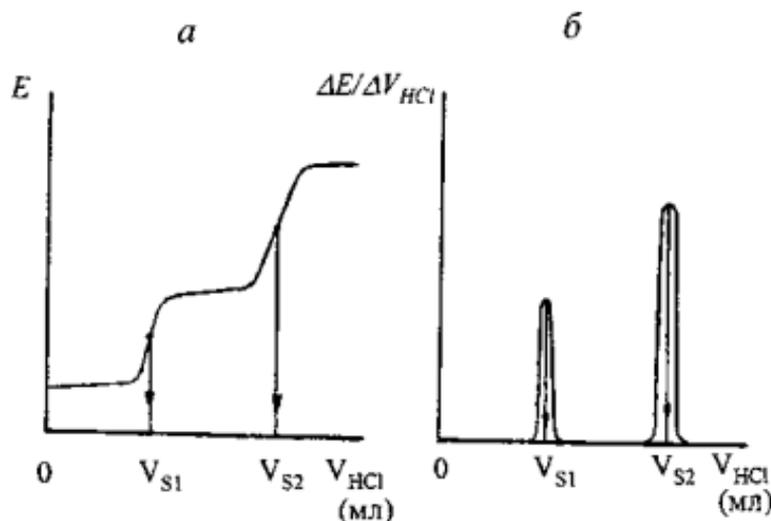


Рис. 3.37. Кривые потенциометрического титрования раствора Na_2CO_3 раствором HCl : а – E от V_{HCl} ; б – $\Delta E/\Delta V_{HCl}$ от V_{HCl} .

Многие биологически активные молекулы, а также ряд их синтетических аналогов содержат способные к ионизации группы. В молекулах нуклеиновых кислот такими группами являются кислотные фосфатные группы главной цепи, кислотные и основные группы пуриновых и пиримидиновых остатков.

В белковых молекулах (полиамфолитах) способны ионизоваться концевые карбоксильные и аминные группы полипептидных цепей и боковые группы ряда аминокислот, входящих в состав белков. Карбоксильные группы белков гораздо слабее кислотных (фосфатных) групп нуклеиновых кислот. Еще более слабыми кислотными группировками являются сульфгидрильные группы и фенольные в тирозине. К сильноосновным группам относится гуанидиновая группировка в аргинине. Средней степенью основности обладают различные аминогруппы. Имидазольная группировка гистидина занимает близкое к нейтральному положение. Титрование полиэлектролитов, к которым относятся нуклеиновые кислоты, полипептиды и белки, можно проводить двояким способом. При непрерывном титровании измеряется сдвиг pH в одном и том же растворе при добавлении в него кислоты или щелочи. При втором способе pH измеряют в серии растворов полиэлектролита, к которым заранее было добавлено разное количество кислоты и щелочи.

Титрование раствора белка обычно осуществляют в двух отдельных объемах, добавляя порциями в один из них раствор кислоты, а в другой – раствор щелочи с известной (одинаковой для кислоты и щелочи) концентрацией. Обе серии данных откладывают в единых осях и строят кривую титрования раствора белка. Параллельно теми же стандартными растворами кислоты и щелочи аналогичным образом титруют чистый растворитель и строят для него кривую титрования. Окончательный график титрования белка строят по разности объемов стандартного раствора, пошедшего на титрование раствора белка и растворителя при фиксированных значениях pH. Эта разность позволяет рассчитать количество протонов (H^+), связанных с белком (при титровании кислотой) или освободившихся из него (при титровании щелочью), а при известном значении молекулярной массы белка – связанных с одной его молекулой. На графике титрования белка, в отличие от рис. 3.36 и 3.37, значения pH откладывают на оси абсцисс, а число ионов H^+ - на оси ординат, при этом за начало отсчета (нулевую точку) этой оси нередко принимают количество H^+ , связанных с молекулой белка в изоионной точке, когда ее суммарный заряд равен нулю.

По кривой потенциометрического титрования нельзя однозначно установить, какие конкретно группы титруются в той или иной области кривой. Для того, чтобы получить ответ на этот вопрос, описанное потенциометрическое титрование белков дополняют другими методами (формольное титрование, добавление в титруемый раствор органических растворителей и др.).

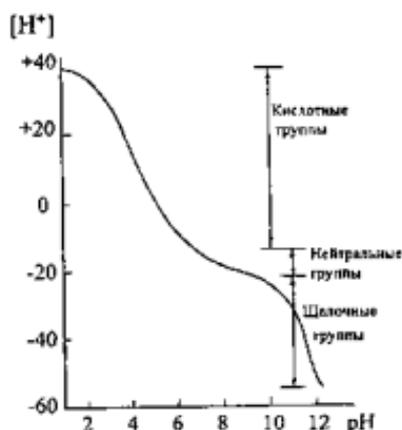


Рис. 3.38. Кривая титрования белка (β -лактоглобулина): $[H^+]$ – число ионов водорода, связанных с молекулой белка (отсчет ведется от числа ионов, связанных с молекулой в изоионной точке)

На основании анализа кривой потенциометрического титрования можно рассчитать количество кислых, основных и близких к нейтральным групп в его молекуле. Кривая потенциометрического титрования для каждого белка имеет свою форму, но тем не менее обычно в ней различают три S-образные части (рис. 3.38): две области довольно большой крутизны и область меньшего наклона между ними. Кислотная часть кривой (сверху) соответствует титрованию карбоксильных групп; щелочная ветвь (снизу) отвечает титрованию ϵ -аминогрупп, фенольных гидроксильных и сульфгидрильных групп. Часть кривой в области нейтральных pH обусловлена наличием имидазольных групп гистидина и концевых α -аминогрупп.

Потенциометрическое титрование широко используется в биохимии для феноменологического описания свойств белков, определения природы и числа ионогенных групп в молекуле, выявления и оценки степени блокировки групп в структуре белка, изучения конформационных переходов в белковых молекулах. Техника выполнения и анализ результатов этого непростого метода детально описаны в специальной литературе.

Изучение хода реакций. Химические реакции, подобно титрованию, ведут к изменению концентраций веществ в реакционном объеме. В случае реакции, протекающей в замкнутом объеме, происходит понижение концентрации исходных веществ и повышение – продуктов реакции. Для того, чтобы расшифровать динамику изменения потенциала индикаторного электрода, опущенного в реакционную смесь, необходимо предварительно установить, какую долю в замеренное значение потенциала электрода вносит каждый участник реакции.

Достаточно просто с помощью потенциометрического метода можно установить момент окончания химической реакции, которому соответствует прекращение изменения значения потенциала электрода.

5.3.3. Аппаратура для потенциометрического анализа

Установка для потенциометрического анализа состоит из электродной пары и регистрирующего или показывающего прибора (потенциометра). Электродная пара включает индикаторный электрод и электрод сравнения. В качестве индикаторного электрода используются стеклянный, хингидронный, сурьмяный, платиновый и другие электроды. Большое распространение при измерении pH раствора и при потенциометрическом титровании (в том числе белков) получили стеклянные электроды.

Стекланный электрод (рис. 3.39а) представляет собой стеклянную трубку (1) с погружаемой в раствор рабочей частью, имеющей форму шарика (2) с толщиной стенки 0,06–0,10 мм, изготовленного из специального сорта стекла (содержит большое количество лития или натрия). Внутренний объем электрода заполнен 0,1 М раствором HCl (5), в котором находится серебряная проволока (3), покрытая снаружи тонким слоем AgCl (4).

Потенциал стеклянного электрода, погруженного в раствор, складывается из трех составляющих. Две из них (потенциал электрода Ag/AgCl в 0,1 н HCl и потенциал асимметрии, возникающий на стекле шарика, опущенного в раствор с такой же концентрацией H⁺, что и внутри электрода) постоянны, а третья – потенциал стеклянной стенки шарика – зависит от концентрации H⁺ в исследуемом растворе. Различие концентраций ионов водорода с двух сторон стеклянной стенки шарика ведет к возникновению разности потенциалов между ними, которая, в свою очередь, вызывает появление слабого электрического тока через стенку. Не исключено, что стекло шарика обладает полупроводниковой проводимостью, которая обеспечивается перемещением свободных электронов и дырок (положительно заряженных частиц, в частности протонов H⁺). Этот ток через электролит (раствор HCl внутри электрода) достигает серебряной проволоки, а от нее поступает на одну из клемм потенциометра. Величина тока прямо пропорциональна разности потенциалов и обуславливающей ее разности концентраций H⁺ с обеих сторон стенки шарика. Поскольку концентрация H⁺ внутри электрода постоянна, разность потенциалов и сила тока зависят только от концентрации H⁺ в исследуемом растворе.

В качестве электрода сравнения используются каломельный, серноокислый ртутный, хлорсеребряный и другие. Большое распространение получил хлорсеребряный электрод (рис. 3.39б), который выполнен в виде стеклянной трубки (1), оканчивающейся в рабочей части тонким отверстием, в которое вставлен асбестовый фитиль (4). Внутренний объем электрода через специальное отверстие заполняют насыщенным раствором KCl (5). Отверстие закрывается пробкой (6). В раствор хлорида калия, как и в индикаторном электроде, погружена серебряная проволока (2), покрытая слоем AgCl (3).

Потенциал, поступающий с хлорсеребряного электрода на вторую клемму потенциометра, не зависит от концентрации ионов водорода в исследуемом растворе.

В каломельном электроде контакт насыщенного раствора KCl с исследуемым раствором осуществляется через гелевый агаровый мостик. Аналогично хлорсеребряному электроду с раствором хлорида

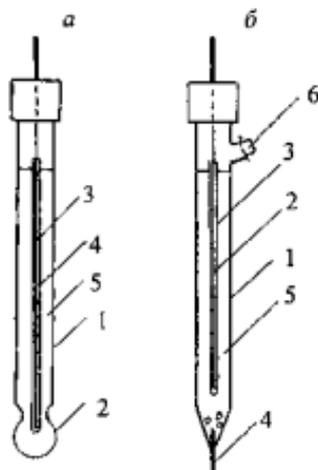


Рис. 3.39. Схема строения стеклянного (а) и хлорсеребряного (б) электродов. Объяснения – в тексте

калия контактирует каломель (Hg_2Cl_2), покрывающая слой ртути, с которой потенциал поступает на потенциометр.

Индикаторный электрод и электрод сравнения, электрически связанные между собой через исследуемый раствор, образуют гальванический элемент, электродвижущую силу (ЭДС) которого замеряет потенциометр.

В связи с тем, что тонкая стенка шарика стеклянного электрода обладает высоким электрическим сопротивлением, сила тока, порождаемая электродным потенциалом, ничтожна и не может обеспечить точный замер потенциала непосредственно с помощью обычного (не высокоточного) стрелочного прибора. Поэтому разность потенциалов, подаваемая на измерительный прибор от электродной пары, предварительно многократно усиливается с помощью электронной схемы рН-метра.

Обычно рН-метр имеет переключатель диапазонов рН, который повышает точность измерения рН. Для этого вначале измеряют рН с помощью грубой шкалы, охватывающей весь диапазон рН, а затем устанавливают переключатель на узкий диапазон, в котором находится измеряемое значение рН.

Поскольку значение рН зависит от температуры, влияние последней компенсируют вручную (ручку температурной компенсации устанавливают на температуру исследуемого раствора) или автоматически. В последнем случае вместе с электродной парой в раствор погружают

специальное проволочное сопротивление, значение которого изменяется с температурой. Оно подключено к рН-метру и с помощью его электронной схемы автоматически осуществляет температурную компенсацию.

Периодически показания рН-метра проверяют по растворам с известными значениями рН. Их готовят путем растворения в определенном объеме воды навесок различных веществ из специального набора «рН-титр». В случае несоответствия показаний прибора значениям рН этих растворов рН-метр настраивают с помощью специальных сопротивлений настройки.

рН-метр обычно имеет выходы для подключения показывающего прибора более высокого класса точности и самописца (для регистрации процесса).

Промышленность выпускает лабораторные приборы для автоматического потенциометрического титрования, снабженные автоматической пипеткой.

Наряду с универсальными рН-метрами имеются и специализированные приборы, например, с узким диапазоном измерения, позволяющим очень точно регистрировать значение рН крови в малом объеме.

Современная элементная база дала возможность создать миниатюрные рН-метры с высокой точностью измерения и цифровой индикацией результатов.

5.4. Полярографический метод анализа

5.4.1. Теоретические основы полярографического анализа

Кондуктометрический и потенциометрический методы практически не связаны с электролитическим переносом вещества благодаря использованию в первом из них переменного тока, а во втором вследствие высокого сопротивления индикаторного электрода и высокоомной системы измерения потенциала (или использования компенсационного способа его регистрации). Изменение концентрации ионов здесь носит обратимый характер и происходит только в приэлектродном (непосредственно прилегающем к поверхности электрода) слое, не захватывая всего объема раствора.

В полярографическом анализе имеет место постоянный электрический ток, прохождение которого через исследуемый раствор сопровождается электролизом (протеканием окислительно-восстановительного процесса). Оно обусловлено нарушением (сдвигом) равновесия в концентрации ионов между раствором и поверхностью элек-

трода под действием приложенного извне напряжения. Сам же процесс изменения значения равновесного электродного потенциала при прохождении через электрод постоянного электрического тока называется поляризацией электрода. Этот процесс зависит от различных факторов, в том числе и от состава раствора, в котором находится электрод.

Полярографическим методом, или просто полярографией («записью процесса поляризации»), называют электрохимический метод анализа, основанный на зависимости характера поляризации рабочего электрода от состава раствора, в котором он находится. Как и в потенциометрическом анализе, в испытуемый раствор погружают два электрода: поляризующийся (рабочий) микроэлектрод (аналог индикаторного электрода) и электрод сравнения. На них подают непрерывно возрастающее постоянное напряжение и регистрируют его значение вместе со значением соответствующей ему силы тока. На основании этих данных строят график зависимости силы тока (i) от напряжения (U), который называют полярограммой.

В отличие от вольтамперной зависимости у проводников первого рода (металлов), которая в соответствии с законом Ома носит прямолинейный характер, вольтамперная характеристика (полярограмма) проводников второго рода (растворов) оказывается более сложной. Это объясняется особенностями протекания электродного процесса, который состоит, по крайней мере, из трех стадий. Первая из них – доставка корпускул из общего объема раствора к поверхности электрода. Она осуществляется преимущественно диффузионным путем, поскольку электростатическое действие заряда электрода почти полностью экранируется приэлектродным слоем противоионов. Поскольку подошедшие к электроду корпускулы подвергаются электрохимическому превращению (окислению или восстановлению), вокруг него создается градиент концентрации вещества, который и является движущей силой диффузионного процесса. Слой раствора, в котором существует градиент концентрации, называют диффузионным слоем. Скорость диффузии (v) прямо пропорциональна разности концентраций диффундирующих корпускул в общей массе раствора (C_0) и в приэлектродном слое (C):

$$v = K(C_0 - C),$$

где K – коэффициент пропорциональности.

Во второй стадии происходит собственно электрохимический про-

цесс. На катоде корпускулы получают электроны, благодаря чему осуществляется их электровосстановление. На аноде, напротив, они отдают электроду свои электроны и окисляются. Третья стадия связана с образованием новой фазы – конечного продукта электрохимической реакции, который может быть газообразным или твердым веществом. Например, если к катоду подходит ион водорода (протон), то, получив от электрода электрон, он превращается в атомарный водород, который будучи высокоактивным радикалом соединяется с другим таким же атомом и образует молекулу водорода. Совокупность молекул водорода формирует газовый пузырек, который некоторое время удерживается на электроде, уменьшая его активную, контактирующую с раствором поверхность. Сходным образом на поверхности электрода образуются и твердые продукты реакции.

Лимитирующей стадией электродного процесса, определяющей максимальное значение электрического тока (в расчете на единицу поверхности электрода), является скорость диффузии, поэтому оно называется предельным диффузионным током. Из приведенного выше уравнения следует, что предельная сила тока прямо пропорциональна максимальной скорости диффузии, которая определяется концентрацией (C_0) корпускул – участниц электрохимического процесса – в общей массе раствора. С увеличением напряжения, приложенного к электродам, увеличивается сила тока, при этом происходит обеднение корпускулами приэлектродного слоя (уменьшается концентрация C). При определенном значении напряжения концентрация (C) становится практически равной нулю (подошедшие к электроду молекулы сразу же испытывают электрохимическое превращение), а сила тока – максимальной (предельной). Само же это значение напряжения, как показали расчеты и подтвердили эксперименты, практически не зависит от концентрации исследуемого вещества, а определяется его химической природой, свойствами электрода и так называемым фоном (сопутствующими веществами, находящимися в растворе вместе с исследуемым веществом).

Следует отметить, что в начальный момент увеличения напряжения (U) от нулевого значения сила тока (i) почти не возрастает (некоторое увеличение ее обусловлено конденсаторным эффектом – электростатической зарядкой электрода) и лишь после преодоления «сопротивления» экранирующего противоионного слоя электрода начинает быстро расти с повышением напряжения (U) до определенного значения.

Если в растворе имеется несколько веществ, способных к участию

в электрохимической реакции на электроде, то после достижения предельного диффузионного тока первого вещества при дальнейшем повышении напряжения может появиться новый подъем силы тока (новая полуволна), обусловленный разрядкой на электроде другого вещества с более высоким потенциалом разряда.

Все сказанное выше позволяет представить качественное изображение поляризационной кривой (полярограммы) (рис. 3.40).

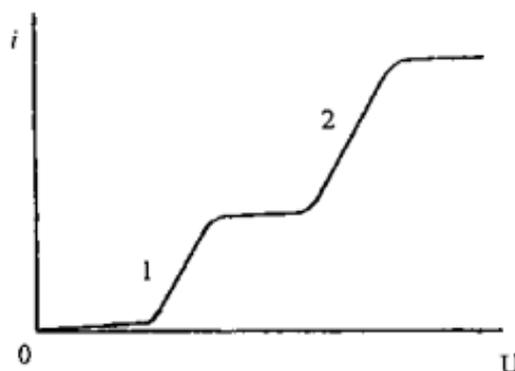


Рис. 3.40. Полярограмма: 1 и 2 – полуволны разрядки первого и второго веществ

5.4.2. Аппаратура полярографического анализа

Полярографический метод анализа был предложен в 1922 г. чехословацким ученым Ярославом Гейровским. Им же был создан и первый прибор для полярографического анализа – полярограф. Он представляет собой сосуд с находящимися в нем электродами: рабочим микроэлектродом и электродом сравнения, к которым от источника постоянного тока через реостат во время работы подается электрическое напряжение. В сосуд с электродами (электролитическую ячейку) вводят испытуемый раствор и при ручном снятии полярограммы подают на электроды повышающееся с определенным шагом напряжение, которое вместе с соответствующим ему значением силы тока записывают в рабочую тетрадь (на основании показаний гальванометра и вольтметра). По этим данным затем в масштабе строят полярограмму.

В качестве рабочего электрода обычно используют ртутный капельный микроэлектрод, предложенный Я. Гейровским, или платиновый, а

в качестве электрода сравнения – каломельный электрод или придонную ртуть (налитую на дно электролитической ячейки). Сущность работы ртутного капельного микроэлектрода состоит в том, что продукты, образующиеся на поверхности ртути при анализе, удаляются вместе с каплей при ее падении на дно электролитической ячейки, и в контакте с исследуемым раствором находится постоянно образующаяся чистая поверхность. Капля образуется на конце толстостенного стеклянного капилляра с внутренним диаметром 0,03–0,05 мм, к которому по гибкой соединительной трубке из стеклянного или пластмассового сосуда подводится ртуть. Частоту падения капель (ориентировочно 10–20 капель в минуту) регулируют, изменяя высоту расположения сосуда по отношению к капилляру. Загрязненная ртуть, которая собирается на дне электролитической ячейки, затем подвергается химической очистке от продуктов реакции.

Наряду с ртутным капельным электродом используется твердый электрод, выполненный из платины. При работе он тоже загрязняется продуктами реакции, поэтому после снятия полярограммы необходимо очищать его поверхность. Нередко платиновый электрод делают вращающимся, при этом происходит самоочищение его поверхности набегающим потоком раствора. Вращение электрода обеспечивает электропривод.

В качестве второго, неполяризуемого электрода можно использовать ртуть, налитую на дно электролитической ячейки, в которую впаян платиновый проводник, контактирующий со ртутью. Однако большим постоянством по сравнению с придонной ртутью обладает каломельный электрод (анод), соединяющийся с исследуемым раствором агаровым мостиком (электролитическим ключом).

На рис. 3.41 представлена принципиальная схема полярографа, с помощью которого полярограмму снимают вручную. Снятию полярограммы мешает присутствие в исследуемой пробе растворенного кислорода, который удаляют, пропуская через нее инертный газ (азот, двуокись углерода) или химическим путем.

Процесс регистрации полярограммы легко может быть автоматизирован, что осуществил уже в 1925 г. сам автор метода – Я. Гейровский. В этом полярографе с помощью привода одновременно автоматически перемещались скользящий контакт реостата и фотобумага, по поверхности которой под прямым углом к ее перемещению двигался луч света от зеркального гальванометра. В результате на бумаге фотографическим путем регистрировалась полярограмма.

В современных автоматических полярографах регистрация полярограммы осуществляется пером на бумаге, причем наряду с интеграль-

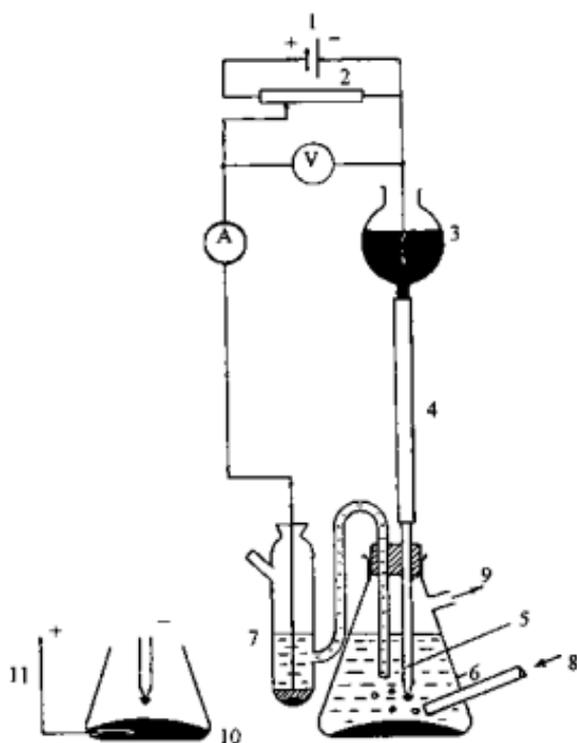


Рис. 3.41. Принципиальная схема полярографа: 1 – источник постоянного напряжения; 2 – реостат; 3 – сосуд с ртутью; 4 – гибкая соединительная трубка; 5 – капилляр; 6 – сосуд с исследуемым раствором; 7 – каломельный электрод; 8,9 – трубки для подвода и отвода инертного газа; 10 – использование придонной ртути в качестве электрода сравнения; 11 – платиновый проводник

ной может быть изображена и дифференциальная полярограмма (см. ниже).

5.4.3. Расшифровка полярограмм

Полярограмма несет информацию о химической природе вещества, участвующего в электрохимической реакции, и его концентрации в исследуемом растворе. Первую задачу – идентификацию вещества – решают путем нахождения так называемого потенциала полуволны ($E_{1/2}$). На полярограмме (рис. 3.42) он соответствует точке кривой, находящейся на половине высоты волны (h). Было показано, что если восстановленная на катоде (ртутном капельном микроэлектроде) фор-

ма вещества не поступает в ртутную каплю, образуя амальгаму (сплав ртути с другим металлом), то потенциал полуволны есть не что иное, как нормальный окислительно-восстановительный потенциал данной системы, который зависит только от природы определенного вещества и не зависит от его концентрации.

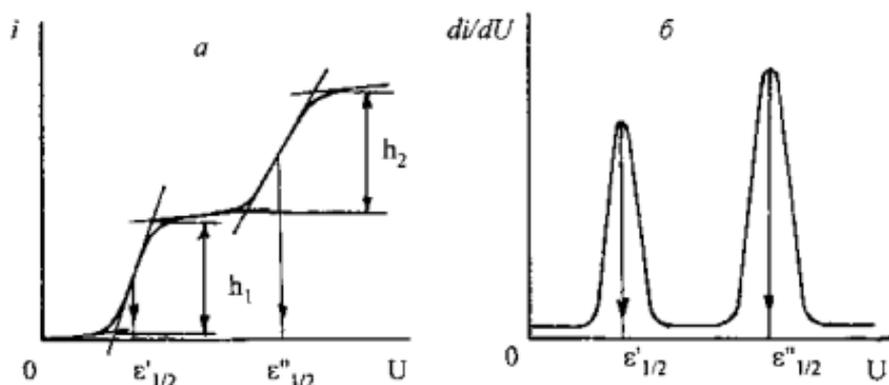


Рис. 3.42. Интегральная (а) и дифференциальная (б) полярограммы

Если же разрядившиеся ионы металла растворяются в ртути, образуя амальгаму, то потенциал полуволны соответствует нормальному потенциалу амальгамного электрода. Для ионов многих веществ потенциалы полуволны определены. В случае отсутствия таких данных для исследуемых веществ необходимо их определить путем полярографического анализа чистых образцов предполагаемых веществ и составить таблицу, на данные которой можно ориентироваться после получения полярограммы исследуемого раствора (в тех же условиях, включая температуру, которая также влияет на полярограмму).

Если в растворе имеется несколько компонентов, дающих свои волны, то как идентификацию, так и определения количественного содержания этих веществ осуществляют независимо, по соответствующей волне.

Высота волны линейно зависит от концентрации (C_0) соответствующего вещества в растворе, и задача определения количественного содержания его заключается в нахождении масштаба – количественного соотношения между концентрацией вещества и высотой волны.

Чтобы его установить, необходимо приготовить серию стандартных растворов исследуемого вещества (с известными концентрациями), снять для них полярограммы, найти по ним значения высоты волны и построить калибровочный график в осях $h-C_0$ (иногда его называют градуировочным), с помощью которого затем можно будет определить на оси абсцисс неизвестную концентрацию исследуемого вещества по найденной для него высоте волны. Этот подход называют методом калибровочных кривых. Поскольку график имеет вид прямой, нахождение концентрации можно осуществлять расчетным путем по уравнению этого графика. Существуют и другие количественные методы (стандартных растворов, добавок).

Если полярограмма получена в дифференциальном виде (в осях $\frac{di}{dU} - U$), то на месте волн интегральной полярограммы на ней будут находиться симметричные пики (так как сама волна симметрична относительно точки, соответствующей величине $E_{1/2}$), вершины которых располагаются против значений $E_{1/2}$ определяемых веществ. Высота же пика, подобно высоте волны, является количественной характеристикой содержания вещества.

5.4.4. Осциллографическая полярография

В классическом варианте полярографии скорость изменения напряжения, прикладываемого к электродам, составляет 0,1-0,005 В/с, что позволяет регистрировать полярограмму с помощью обычного чернильнопишущего самописца.

Для того, чтобы качественно снять полярограмму вещества в условиях быстротекущего процесса, нужна высокая скорость изменения потенциала (от полувольта до десятков и даже сотен вольт в секунду). Регистрация такой полярограммы возможна только с помощью осциллографа, поэтому высокоскоростную полярографию называют осциллографической.

В этом виде полярографии на электроды и пластины, отклоняющие электронный луч вдоль горизонтальной оси (U) катодной трубки, синхронно подается пилообразное напряжение, а на пластины, отклоняющие луч в вертикальном направлении, – напряжение, прямо пропорциональное силе тока (i). В осциллографической полярографии

применяется электронно-лучевая трубка с длительным послесвечением, благодаря чему за время жизни одной ртутной капли удается получить и сфотографировать на один кадр серию полярограмм, соответствующих концентрациям вещества в последовательные моменты времени, разделенные малыми промежутками. Количественная обработка этих полярограмм позволяет изучать кинетику быстропротекающих процессов.

Сама осциллографическая полярограмма (осциллополярограмма) несколько отличается от классической (низкоскоростной). Перед выходом тока на плато насыщения появляется пик, вершина которого находится (практически) против потенциала полуволны (рис. 3.43).

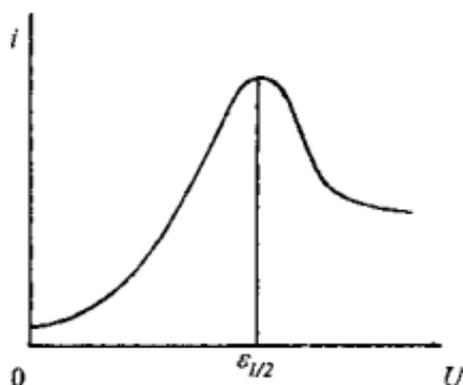


Рис. 3.43. Осциллографическая полярограмма

Высота волны до пика зависит от концентрации вещества и используется для его количественного определения.

Важным достоинством осциллографической полярографии является высокая чувствительность по току при измерении малых концентраций вещества.

5.4.5. Применение полярографического анализа

Полярографический метод анализа обладает большими возможностями при исследовании как неорганических, так и органических соединений, включая макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты). В последнем случае широко используется адсорбционная полярография, связанная с влиянием на электродный процесс веществ, не разряжающихся на электроде. Она основана на поверхностно-активных свойствах этих веществ, адсорбции их на поверхности электрода и подав-

лении полярографических максимумов, которые чаще всего возникают при восстановлении неорганических ионов и по форме напоминают пик осциллографической полярограммы (рис. 3.43).

С помощью полярографического метода можно производить анализ не только в водных, но и в неводных средах, поскольку большое число органических соединений плохо растворимо или вообще нерастворимо в воде.

Подобно кондуктометрическому и потенциометрическому методам полярографию используют при титровании для выявления точки эквивалентности, в которой высота волны (h) титруемого раствора становится равной нулю.

Так как при анализе используются микроэлектроды с очень малой поверхностью, то сила тока, протекающего через исследуемый раствор в электролитической ячейке, тоже невелика и практически не изменяет концентрацию вещества в растворе. Это позволяет в одной и той же пробе производить большое число определений, что необходимо делать, в частности, при исследовании кинетики быстропротекающих процессов с помощью осциллографической полярографии.

Полярографический метод обладает высокой чувствительностью, позволяя обнаруживать вещества в концентрациях до 10^{-6} моль/л и ниже. Поэтому с его помощью осуществляют количественное определение микроэлементов, гормонов, витаминов, лекарственных веществ и других соединений после предварительной подготовки проб к анализу.

Поскольку разные вещества имеют свои значения потенциалов полуволны, а само совместное нахождение этих веществ в одном растворе не препятствует выявлению их потенциалов полуволн, является возможность производить количественный анализ смесей без выделения из них отдельных компонентов.

Электрическая форма информации, получаемой с помощью полярографии, облегчает ввод ее в ЭВМ для дальнейшего качественного и количественного анализа.

Однако все богатые возможности полярографии могут быть реализованы лишь при глубоком знании процессов, протекающих на электроде, без чего невозможна грамотная интерпретация полученных результатов. Для этого требуется значительный опыт в использовании полярографического метода применительно к конкретным группам исследуемых соединений.

ГЛАВА ШЕСТАЯ

ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Оптические методы анализа основаны на зависимости параметров оптического излучения от свойств среды, в которой оно распространяется.

Оптическое излучение является частным случаем электромагнитного излучения (ЭМИ). Оно условно занимает диапазон длин волн от 1 нм до 1 мм. Со стороны коротких волн к нему примыкает рентгеновское излучение (X-лучи), которое, в свою очередь, граничит с еще более коротковолновым гамма-излучением с длиной волны, измеряемой единицами и долями ангстрема, имеющим ядерное происхождение. Со стороны длинных волн к оптическому излучению примыкает (и частично вторгается в него) радиочастотный диапазон с широкой областью длин волн.

В свою очередь, внутри оптического диапазона выделяют сравнительно узкий интервал частот, воспринимаемых человеческим глазом (380-760 нм) и именуемый видимым светом с границами субъективного восприятия соответственно от фиолетового до красного света.

К видимому свету со стороны длинных волн примыкает инфракрасное излучение (ИК-излучение), а со стороны коротких – ультрафиолетовое излучение (УФ-излучение). Последнее подразделяют на ближнее (400-200 нм) и дальнее (вакуумное) УФ-излучение (200-10 нм).

Следует сразу же отметить, что в связи с определенной условностью деления электромагнитных колебаний на диапазоны границы последних у разных авторов могут несколько различаться.

ЭМИ представляет собой особую форму крайне динамичного состояния материи, которая, несмотря на обилие математических моделей, всесторонне описывающих ее природу и поведение, по многим свойствам с трудом и большой долей условности воспринимается на уровне обыденного сознания биолога, использующего в своей практике оптические методы анализа. К числу параметров ЭМИ, для которых удалось установить количественную связь со свойствами среды его распространения, относятся: скорость (через рефракцию), частота (или длина волны), интенсивность (мощность) потока, угол поворота плоскости поляризации и ряд других. Из многообразия оптических методов анализа нами будут рассмотрены: абсорбционный, нефелометрический, турбидиметрический, люминесцентный, рефрактометрический и поляриметрический методы.

6.1. Абсорбционный спектральный анализ

6.1.1. Теоретические основы метода. Механизм поглощения света

Абсорбционный спектральный анализ (абсорбционная спектроскопия) основан на измерении ослабления светового потока, обусловленного избирательным поглощением света определенным веществом. Этот метод включает ряд разновидностей. Если измерения ведутся в видимой области спектра, говорят о колориметрическом анализе. В случае использования монохроматического потока (света с определенной длиной волны) метод называют спектрофотометрическим, а при использовании не строго монохроматического (полихроматического) света (некоторого диапазона длин волн) – фотометрическим.

Сущность абсорбционной спектроскопии заключается в том, что конкретная корпускула (атом, молекула, ион) поглощают свет с определенным набором длин волн. Как поглощение, так и испускание света базируются на постулатах Бора, согласно которым корпускулы могут находиться, не изменяя своей энергии (не излучая и не поглощая ее) только в определенных стационарных состояниях. Поглощая энергию, корпускула скачкообразно переходит с энергетического уровня E_1 на более высокий E_2 . Энергия кванта, соответствующая этому переходу, $h\nu = \Delta E = E_2 - E_1$, откуда $\nu = (E_2 - E_1)/h$, где h – постоянная Планка, ν – частота колебания света.

Поскольку для каждой корпускулы энергетические уровни имеют фиксированные значения, то и поглощаемые ими при таких переходах частоты ν (а с ними и длины волн $\lambda = c/\nu$, c – скорость света в среде) будут дискретными.

Механизм поглощения энергии может быть разным. В ультрафиолетовом и видимом диапазонах поглощение света обусловлено переходом электронов наружных оболочек атомов с одного энергетического уровня на другой. В инфракрасной области оно связано с возбуждением колебательных и вращательных состояний молекул.

Молекулярные спектры сильно отличаются от атомных. Атомные спектры как излучения, так и поглощения состоят из сравнительно редко расставленных линий. Молекулярные спектры формируются многочисленными разрешенными переходами электронов, колеблющихся атомов в пределах молекулы и вращающихся молекул как целых корпускул. В них весьма большое число отдельных линий образуют характерные скопления, в каждом из которых линии у одного края распо-

лагаются настолько тесно, что при наблюдении в прибор со средней разрешающей способностью они сливаются. Поэтому все скопление приобретает вид полосы – резкой с одного края и размытой с другого. Отсюда и название спектров молекул – полосатые. Полосы собираются в группы. Такая картина имеет место, когда поглощающие молекулы находятся в газообразном состоянии или при очень низких температурах. При абсорбционном анализе чаще всего имеют дело с конденсированным состоянием вещества: растворами, жидкими смесями и иногда твердыми материалами, находящимися при комнатной температуре. Электронно-колебательные и колебательно-вращательные спектры поглощения молекул в конденсированном состоянии вещества более диффузны, чем в парах, и поэтому их частоты поглощения взаимно перекрываются. Расширению полос в спектре способствует применение полярных растворителей, в частности воды. Это ведет к тому, что колебательная структура становится неразличимой, и электронная полоса поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра выглядит как плавная кривая, по форме приближающаяся к гауссовой кривой распределения, описываемой уравнением

$$D_{\lambda} = D_{\max} e^{-[(\lambda - \lambda_{\max})/w]^2},$$

где D_{λ} – оптическая плотность (поглощение света) при длине волны λ ; λ_{\max} – длина волны, при которой имеет место максимальное значение оптической плотности D_{\max} ; w – полуширина полосы поглощения (на уровне $D = D_{\max} / e$; e – основание натурального логарифма).

При возвращении возбужденной молекулы на более низкий уровень ранее поглощенная ей энергия, как правило, передается другим молекулам, которые успевают тысячи раз столкнуться с ней (частота столкновений молекул в растворе в среднем равна 10^{12} в секунду) за время нахождения в возбужденном состоянии (1-10 нс), и превращается в тепло. Исключение составляет фотолюминесценция, при которой часть поглощенной энергии высвечивается молекулой в виде более длинноволнового излучения.

Молекулы не являются системами с жестко заданными расстояниями между атомами и углами между связями. В действительности в молекулах непрерывно происходят колебания атомов, сопровождающиеся при физиологических температурах изменением длин связей ориентировочно на $\pm 0,05$ ангстрем и угла между связями – на $\pm 5^{\circ}$. Энергия такого рода связей может принимать не какие угодно значения, а

лишь строго определенные (квантованные). Различия между соседними колебательными энергетическими уровнями соответствуют энергиям ЭМИ в инфракрасной области спектра. Поэтому молекулы обладают способностью поглощать ИК-излучение соответствующей частоты (резонансный механизм), переходя при этом в возбужденное колебательное состояние. Для двухатомной молекулы волновое число (число длин волн на 1 см) ИК-излучения, поглощение которого переводит молекулу в ближайшее возбужденное состояние,

$$\bar{\nu} = [k(m_1 + m_2) / m_1 m_2]^{0.5} / 2\pi c,$$

где k – силовая постоянная, характеризующая сопротивление связи возмущающему воздействию; m_1 и m_2 – массы атомов; c – скорость света.

Из приведенного уравнения следует, что частота колебаний возрастает с увеличением прочности связи и уменьшением массы атомов. Прочность связи зависит от кратности связи. Так, одинарные, двойные и тройные связи имеют силовые постоянные k , соответственно равные $(4-6) \cdot 10^2$, $(8-12) \cdot 10^2$ и $(12-18) \cdot 10^2$ Н/м, которые соотносятся между собой как 1:2:3. Поэтому частоты продольных колебаний для групп $C \equiv N$, $C = N$ и $C - N$ будут соответственно равны приблизительно 2250, 1650 и 1050 cm^{-1} .

Поглощение излучения и возбуждение колебательного уровня происходят в результате взаимодействия осциллирующего электрического вектора ИК-излучения и осциллирующего дипольного момента. Нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды обладают 3п-6 колебательными степенями свободы (п- число атомов в молекуле). Благодаря этому такие молекулы обладают столь огромным числом собственных частот колебаний (при которых происходит резонансное поглощение ИК-излучения), что точная интерпретация их ИК-спектров практически невозможна. Задача расшифровки ИК-спектров (и, соответственно, структуры молекулы) существенно облегчается благодаря тому, что одни и те же функциональные группы поглощают излучение в специфических областях ИК-спектра независимо от того, входят ли они в состав малых или больших молекул. Например, переход амид I, обусловленный в основном продольными колебаниями карбонильной группы, расположенной по соседству с амидной группой, приводит к интенсивному поглощению при волновом числе $\bar{\nu} = 1650 cm^{-1}$. Набор таких характерных для каждой молекулы волновых чисел представляет своего рода ее «отпечаток пальцев». В целом же зависимость вероятности поглощения света от его длины вол-

ны называется спектром поглощения, который индивидуален для каждого химического соединения.

Кроме рассмотренных продольных (валентных) колебаний, при которых происходит главным образом изменение длин связей, а углы между связями изменяются мало, существуют так называемые деформационные колебания, при которых, напротив, изменяются в основном углы между связями, а длины связей остаются практически неизменными (рис. 3.44).

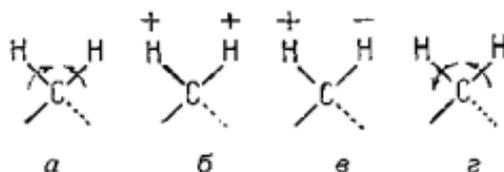


Рис. 3.44. Виды деформационных колебаний: а) ножничное, б) веревочное, в) крутильное, г) маятниковое; + и – обозначены колебания в направлении, перпендикулярном плоскости бумаги [30]

Для возникновения деформационных колебаний требуется меньше энергии, чем для валентных колебаний той же связи, поэтому деформационным колебаниям соответствуют полосы поглощения при более низких частотах.

Помимо колебательных движений молекула совершает и вращательные движения, тоже квантованные, которым соответствует вращательный спектр с низкими частотами и, соответственно, с небольшими энергиями квантов. Вращательное и колебательное движения связаны между собой через такие параметры, как центробежная сила (при вращении молекулы она изменяет межатомные расстояния) и момент инерции молекулы (он изменяется при колебательных движениях атомов). С учетом квантового характера вращательных и колебательных движений получается сложный колебательно-вращательный спектр.

Обычно колебания молекулы бывают в большей или меньшей степени ангармоничны (негармоничны). Для ангармоничного осциллятора наряду с переходами между соседними уровнями возможны и другие, с удвоенными, утроенными и т.д. частотами колебаний. Интенсивность этих колебаний (обертонов) значительно меньше интенсивности основного тона. Так, интенсивность первого обертона составляет 1-10% от

интенсивности основного тона. Интенсивность последующих обертонов резко убывает, а 3-й и 4-й обертоны для многих молекул наблюдать обычно не удается.

Наряду с частотой колебаний очень важным параметром ИК-спектров является интенсивность полос поглощения. Интенсивность полосы поглощения равна сумме интенсивностей поглощения линий, входящих в состав полосы. Интенсивность ИК-поглощения, по-видимому, тем больше, чем сильнее изменяется дипольный момент связи (произведение заряда диполя на расстояние между зарядами) в процессе колебаний. При валентном колебании происходит смещение центров тяжести отрицательного и положительного зарядов, что ведет к изменению дипольного момента.

Закономерности поглощения света. Количественные закономерности поглощения света веществом первоначально были установлены для окрашенных растворов (колориметрический анализ), в которых поглощение обусловлено электронными переходами в хромофорах (частях молекулы, возбуждаемых посредством поглощения света в видимой и ближней УФ-области). В целом эти закономерности оказались справедливыми и для ИК-области, занимающей диапазон от 2 до 50 мкм ($5000-200 \text{ см}^{-1}$). Условно принимают диапазон $3700-600 \text{ см}^{-1}$ за среднюю ИК-область, справа и слева от которой лежат соответственно ближняя ($\nu > 3700 \text{ см}^{-1}$) и дальняя ($\nu < 600 \text{ см}^{-1}$) ИК-области.

Немецкий ученый И.Г. Ламберт и французский ученый П. Бугер доказали, что слои данного вещества одинаковой толщины при прочих равных условиях поглощают одну и ту же часть падающего на них светового потока. Позднее немецкий ученый А. Бер установил, что поглощение света прямо пропорционально концентрации вещества.

Количественно степень поглощения света веществом оценивают с помощью различных показателей. Один из них, называемый прозрачностью (или пропусканием) раствора (T), равен отношению интенсивности света, прошедшего через раствор (I), к интенсивности падающего света (I_0) (рис. 3.45).

Нередко прозрачность выражают в процентах:

$$T = (I / I_0) \cdot 100\%.$$

Величина, обратная прозрачности, называется непрозрачностью, или поглощением раствора I_0 / I , а десятичный логарифм непрозрачности – оптической плотностью (D), или экстинкцией (E).

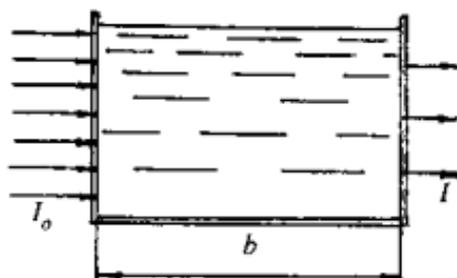


Рис. 3.45. Поглощение света раствором (ослаблением света кюветой пренебрегаем)

С учетом сказанного можно в аналитической форме записать закон Ламберта-Бугера-Бера, который называют также основным законом колориметрии:

$$D = \lg(I_0 / I) = \epsilon b C,$$

где ϵ - коэффициент поглощения (погашения); b - толщина слоя светопоглощающего вещества; C - концентрация вещества. Вербальная формула этого закона проста: оптическая плотность раствора при прочих равных условиях прямо пропорциональна концентрации вещества и толщине поглощающего слоя; прочие равные условия в уравнении представлены коэффициентом ϵ , значение которого зависит прежде всего от химической природы поглощающего вещества и длины волны поглощаемого света, то есть от параметров, непосредственно связанных с молекулярным механизмом поглощения света. Обычно концентрацию выражают числом грамм-молей в 1 литре, а толщину – в сантиметрах. Оптическая плотность одномолярного раствора с толщиной кюветы 1 см численно равна значению молярного коэффициента поглощения, которое обычно получают расчетным путем после замера оптической плотности разбавленных растворов. Размерность молярного коэффициента поглощения – $M^{-1}cm^{-1}$. Он является мерой чувствительности колориметрического метода: чем больше значение молярного коэффициента поглощения, тем выше чувствительность колориметрического определения показателей, связанных с оптической плотностью (например, концентрации раствора). Единице оптической плотности соответствует десятикратное ослабление исходной интенсивности светового потока. В количественном плане чисто формально она напоминает водородный показатель pH, единице которого соответствует десятикратное изменение исходной концентрации ионов водорода.

В реальных условиях анализа порою наблюдаются отклонения от линейной зависимости оптической плотности от концентрации раствора, особенно при высоких значениях последней (рис. 3.46).

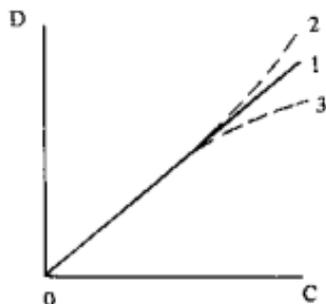


Рис. 3.46. Отклонения от закона Ламберта-Бугера-Бера (1): положительное (2) и отрицательное (3)

Это связано с тем, что закон отражает только физическую сторону колориметрических определений и не учитывает влияние химических процессов, которые могут протекать в растворах. Молекулы окрашенных веществ при разбавлении или при действии посторонних веществ могут разрушаться с образованием бесцветных или иначе окрашенных веществ, подвергаться диссоциации, гидролизу, а при повышении концентрации, напротив, образовывать ассоциаты, размеры которых достаточно велики, чтобы вызывать рассеяние падающего светового потока. Особенно резко это явление проявляется у некоторых веществ, образующих в узком диапазоне концентраций мицеллы из многих десятков молекул (на 1 ассоциат). Мицеллы часто образуются из молекул, один конец которых имеет высокое сродство к растворителю, а другой — низкое (додецилсульфат натрия, заряженные липиды: ионизированные жирные кислоты, фосфолипиды).

Нередко неокрашенное вещество переводят в окрашенное комплексное соединение. В этом случае отклонение от прямолинейной зависимости может быть вызвано малой прочностью комплексного соединения или недостаточной концентрацией реактива, дающего окрашенный продукт (этот реактив необходимо брать в избытке, причем избыточность должна быть одинаковой в сравниваемых растворах).

На окраску раствора существенное влияние оказывает кислотность раствора, а также природа растворителя, который должен удовлетворять следующим требованиям: прозрачность в исследуемой области, достаточная растворяющая способность, устойчивость к излучению (особенно в УФ-области спектра), отсутствие реакций с исследуемым веществом и др.

К инструментальным причинам отклонения от закона Ламберта-Бугера-Бера прежде всего относится широкий спектральный диапазон используемого света, когда наряду с поглощаемым монохроматическим излучением, применительно к которому выведен рассматриваемый закон, присутствует так называемый паразитный (не поглощаемый веществом) свет. Это может быть связано с большой шириной щели прибора. При регистрации спектра искажения его могут быть вызваны неоправданно высокой скоростью сканирования (записи). Кроме того, в процессе преобразования сигнала в электронной схеме появляется шум, который фиксируется прибором. Оптимальная область оптической плотности, где наблюдается максимальное отношение сигнала к шуму (и наибольшая точность измерений), находится в диапазоне от 0,3 до 0,8. Если раствор имеет $D < 0,3$, необходимо использовать кювету с большей толщиной слоя, а если $D > 0,8$ – нужно раствор разбавить, после чего оптическую плотность разбавленного раствора умножить на кратность разбавления. При работе с калибровочным графиком $D = f(C)$ необходимо использовать его прямолинейный участок.

Если вещество не поглощает видимый свет, для определения концентрации можно использовать лучи невидимой, например, УФ-области, которые данное вещество поглощает. Однако возможности колориметрического анализа можно расширить, дополнив его химическим методом анализа – превратив бесцветный раствор в окрашенный. Примеры тому – количественное определение белка с биуретовым реактивом (образование сине-фиолетового окрашивания за счет медных комплексов по месту пептидных связей) или по методу Лоури (образование окрашенных продуктов остатков ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи).

6.1.2. Аппаратура абсорбционного спектрального анализа

Приборы непосредственного сравнения. Используются для определения концентрации окрашенных растворов. С их помощью осуществляют непосредственное сравнение интенсивностей окрасок испытуемого и стандартного (с известной концентрацией) растворов. Рассмотрим некоторые из них.

Способ стандартных серий. Его еще называют способом цветной шкалы. Окраску испытуемого раствора на белом фоне сравнивают с серией стандартных растворов того же вещества с возрастающей концентрацией. Визуально находят ту из пробирок цветовой шкалы, ок-

раска которой совпадает с окраской испытуемого раствора. Если последняя располагается между двумя стандартными растворами, то концентрацию испытуемого раствора принимают равной среднему арифметическому значению между концентрациями этих стандартных растворов.

Способ разбавления. В одну из градуированных пробирок одинакового диаметра наливают до определенного деления стандартный раствор с интенсивностью окраски меньшей, чем у опытного раствора, который до такого же деления наливают во вторую градуированную пробирку. При постоянном помешивании в пробирку с опытным раствором доливают растворитель (обычно воду) до тех пор, пока интенсивности окраски в обеих пробирках станут одинаковыми. Для удобства сравнения окраски обычно используют простое приспособление – компаратор (деревянный или пластмассовый брусок с отверстиями для пробирок и щелями для прохождения света). После этого производят расчет концентрации опытного раствора ($C_{он}$), которая равна произведению концентрации стандартного раствора ($C_{см}$) на кратность разбавления ($V_{он} / V_{см}$):

$$C_{он} = C_{см} \cdot (V_{он} / V_{см}),$$

где $V_{он}$ - объем опытного раствора после разбавления; $V_{см}$ – объем стандартного раствора (и опытного перед началом разбавления).

Колориметр погружения (Дюбоска). Представляет собой простой прибор (рис. 3.47), в котором осуществляется выравнивание интенсивности световых потоков (I), прошедших через стандартный и опытный растворы, посредством изменения толщины (b) одного из растворов.

Перед началом работы стеклянные цилиндрические кюветы (стандартные 2) заполняют одинаковым окрашенным (стандартным) раствором и устанавливают на произвольной, но одинаковой высоте. Затем пластины молочного цвета (1), направляющие свет от внешнего источника (лампа, дневной свет) на кюветы, поворачивают таким образом, чтобы исчезла граница, разделяющая наблюдаемые глазом поля (8). Этому положению пластин соответствует одинаковая интенсивность падающего на стаканчики света (I_0). После этого в одном из стаканчиков стандартный раствор заменяют опытным (того же веще-

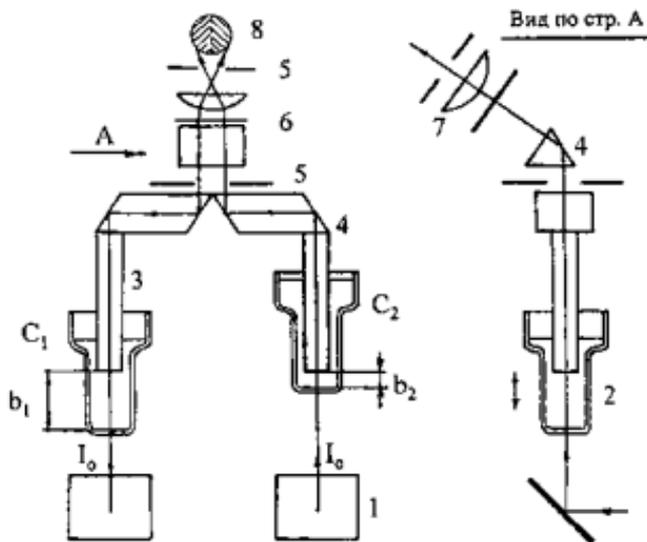


Рис. 3.47. Принципиальная схема колориметра погружения. Пояснения – в тексте

ства, но с неизвестной концентрацией C_2), устанавливают в прибор и, поднимая или опуская его, добиваются исчезновения границы между полями. Этому положению стаканчиков соответствует одинаковая интенсивность пучков света, прошедших через стандартный и опытный растворы (I). Поскольку оптическая плотность $D = \lg(I_0/I)$ обоих растворов одинакова, то и произведение концентрации стандартного раствора (C_1) на толщину слоя (b_1) будет равно такому же произведению опытного раствора ($C_2 \cdot b_2$). Молярный коэффициент поглощения (ϵ) у них одинаковый и в выражении для оптической плотности ($D = \epsilon bc$) сокращается. Отсюда концентрация опытного раствора

$$C_2 = C_1 \cdot (b_1/b_2).$$

Оптическая схема прибора, помимо названных элементов, включает стеклянные цилиндры (световоды 3), призмы (4), диафрагмы (5), сменные светофильтры (6) и линзу (7).

Существуют и другие способы непосредственного сравнения интенсивности окраски растворов, достоинством которых является простота технического исполнения, а недостатками – субъективный (неточный) характер визуального сравнения интенсивности окраски растворов и необходимость во время измерения иметь стандартные раство-

ры. Последнее обстоятельство создает неудобство при работе с растворами химически нестойких соединений. В ряде случаев их заменяют растворами устойчивых соединений с аналогичной окраской, как это сделано, например, в гемометре Сали, использующим способ разбавления для количественного определения гемоглобина в крови.

Визуальные фотометры. Визуальные фотометры, фотоэлектроколориметры и спектрофотометры относятся к приборам, с помощью которых определяют оптическую плотность растворов (а также твердых и газообразных проб). Визуальные фотометры двухлучевые: один луч проходит через кювету с испытуемым раствором, другой – через кювету с раствором сравнения, который содержит те же реактивы, что и испытуемый раствор, но в нем нет определяемого вещества (рис. 3.48).

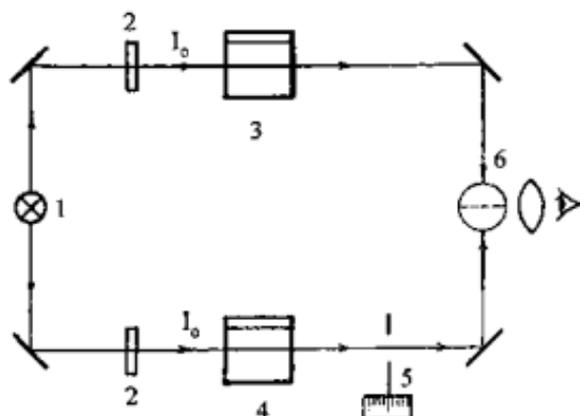


Рис. 3.48. Принципиальная схема визуального фотометра: 1 – источник света; 2 – сменные светофильтры; 3 – кювета с испытуемым раствором; 4 – кювета с раствором сравнения; 5 – диафрагма; 6 – поле окуляра

Интенсивность пучков света, падающих на кювету, одинакова. Поскольку окрашенный испытуемый раствор в большей мере, чем раствор сравнения, поглощает свет, наблюдаемые половины поля будут освещены по-разному. Уменьшая путем вращения ручки диафрагмы площадь пропускания ее, добиваются выравнивания интенсивностей световых пучков в поле зрения окуляра, о чем судят по исчезновению границы, разделяющей поля. На шкалах диафрагмы находят значения оптической плотности D и коэффициента пропускания T испытуемого раствора.

Недостатком визуального фотометра является субъективность оценки освещенности сравниваемых полей.

Фотоэлектродориметры. Недостаток, вызванный необходимостью визуального сравнения интенсивности окраски, был устранен с помощью фотоэлементов, которые преобразуют энергию светового пучка в электрический ток. Это преобразование связано с фотоэффектом, под которым понимают отрыв электронов от атомов различных веществ под действием световой энергии.

Для того, чтобы оторвать электрон, необходима энергия, называемая работой выхода (A), которую при фотоэффекте поставляет квант света ($h\nu$). Фотоэффект возможен, если $h\nu \geq A$.

Учитывая, что $\lambda = c/\nu$, вводят понятие о «красной» границе фотоэффекта – наибольшей длине волны света, при которой еще наблюдается фотоэффект. Для цезия она равна 1400, калия – 1000, натрия – 680, лития – 526, тантала – 305 нм и т.д.

В фотометрии используют фотоэлементы, основанные как на внешнем, так и на внутреннем фотоэффекте.

Фотоэлемент с внешним фотоэффектом (рис 3.49а) представляет собой стеклянный баллон, в котором в условиях вакуума находятся фотокатод, содержащий щелочной металл, и анод (обычно никелевый).

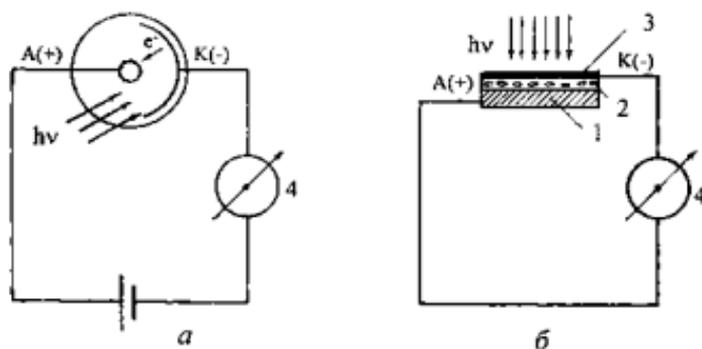


Рис. 3.49. Схема работы фотоэлементов с внешним (а) и внутренним (б) фотоэффектом: 1 – железный электрод; 2 – селеновый слой; 3 – золотой слой; 4 – гальванометр

Напряжение, приложенное к аноду и катоду, вызывает фототок – направленное движение выбитых из металла электронов от катода к аноду. В соответствии с законом Столетова, фотоэлектрический ток (i)

прямо пропорционален интенсивности падающего лучистого потока (I) с коэффициентом пропорциональности k :

$$i = kI.$$

В фотометрии используются сурьмяно-цезиевые фотоэлементы для измерений в ультрафиолетовой и видимой областях (186-650 нм) и кислородно-цезиевые (сенсibilизированные кислородом) для измерения в видимой и инфракрасной областях (600-1200 нм).

Сущность работы фотоэлементов, основанных на внутреннем фотоэффекте («вентильные» фотоэлементы), заключается в одностороннем уменьшении сопротивления некоторых полупроводников и изоляторов при падении на них лучистой энергии. Одним из таких фотоэлементов, пригодных для измерений только в видимой области (400-700 нм), является селеновый фотоэлемент (рис 3.49б). При его изготовлении на железную пластинку (1) с шероховатой поверхностью напыляется в вакууме тонкий слой селена (полупроводник), на который, в свою очередь, наносится полупрозрачный слой золота, выполняющий роль катода. При освещении фотоэлемента кванты световой энергии вырывают из атомов селена электроны и сообщают им энергию, достаточную для преодоления запирающего («вентильного») слоя на границе селен-золото и перемещения в слой золота. Поскольку сопротивление запирающего слоя для электронов в обратном направлении (из золота в селен) больше, возникает фототок – направленное движение электронов по внешней цепи от слоя золота к железному электроду, что и отмечает стрелка гальванометра.

Фотоэлектроколориметры (ФЭК) бывают однолучевыми и двухлучевыми. В однолучевом ФЭКе (рис 3.50) в световой пучок вначале вводят кювету с раствором сравнения и ручкой настройки (с помощью электронной схемы) устанавливают стрелку гальванометра на «100%» (по шкале T) или на «0» (по шкале D). Затем эту кювету заменяют кюветой с испытуемым раствором и по шкале гальванометра находят интересующие значения T или D , против которых остановилась стрелка.

Двухлучевой ФЭК (рис 3.51) напоминает визуальный фотометр (рис 3.48), принципиально отличаясь от последнего наличием двух включенных друг другу навстречу фотоэлементов и нуль-гальванометра, которые заменяют окуляр с двумя полуполями визуального фотометра.

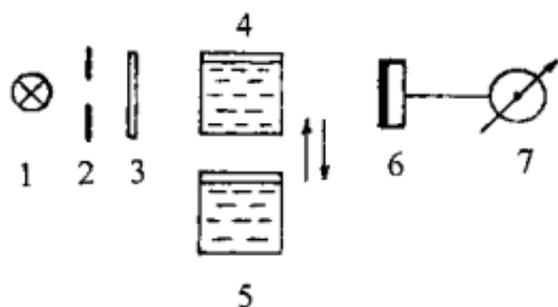


Рис. 3.50. Принципиальная схема однолучевого ФЭКа: 1 – источник света; 2 – диафрагма; 3 – светофильтр; 4 – кювета с раствором сравнения; 5 – кювета с испытуемым раствором; 6 – фотозлемент; 7 – гальванометр

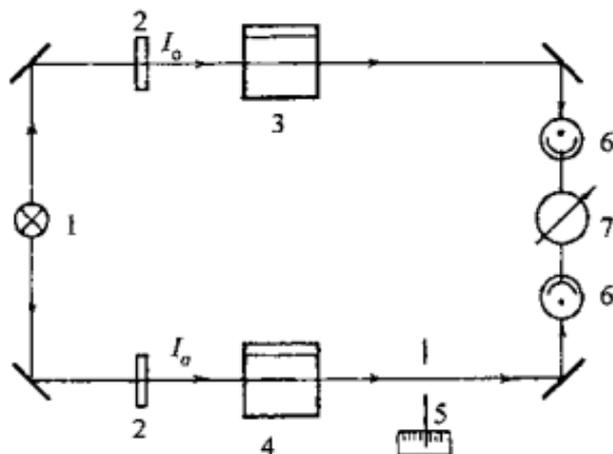


Рис. 3.51. Принципиальная схема двухлучевого ФЭКа: 1 – источник света; 2 – сменные светофильтры; 3 – кювета с испытуемым раствором; 4 – кювета с раствором сравнения; 5 – диафрагма; 6 – фотозлементы; 7 – нуль-гальванометр

Процедура измерения оптической плотности D и пропускания T заключается в выведении на нуль стрелки гальванометра путем вращения ручки диафрагмы. После этого на шкалах диафрагмы находят значения D или T .

Достоинство ФЭКов перед визуальными фотометрами состоит в исключении фактора субъективности при оценке интенсивности окраски,

так как эта операция осуществляется с использованием стрелочного или цифрового индикатора. Это повышает точность и воспроизводимость результатов.

Преимущество двухлучевых ФЭКов перед однолучевыми состоит в том, что колебания яркости источника света, вызванные разнообразными причинами, в одинаковой мере сказываются на интенсивности обеих лучей и не влияют на результаты замера значений D и T . У однолучевых ФЭКов колебание напряжения в сети, износ нити накала лампы, замена последней сказываются на замере величин D и T , а калибровочный график, используемый при определении концентрации растворов, по этой причине необходимо периодически проверять (или перестраивать).

Для повышения точности определения оптической плотности каждой опытной пробы рекомендуется несколько раз производить замеры D и вычислять среднее арифметическое значение.

Спектрофотометры. Эти приборы позволяют производить измерения светопоглощения проб в узких по спектральному составу пучках света. В спектрофотометрах белый свет разлагается на составляющие цвета, а из полученного непрерывного спектра с помощью узкой щели выделяют нужный световой поток с шириной полосы спектра обычно всего в несколько нанометров. Такой свет можно в первом приближении считать монохроматическим. В остальном оптическая схема спектрофотометра напоминает таковую фотоэлектроколориметра. Более того, многие современные ФЭКи также имеют монохроматоры (устройства для получения монохроматического света).

Особенности поглощения ультрафиолетовых и инфракрасных лучей веществом, а также разные способы их получения и измерения интенсивности накладывают существенный отпечаток на конструкцию соответствующих спектрофотометров и методы подготовки пробы к анализу.

Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой областях. Обычно осуществляется на спектрофотометре, использующем оба диапазона длин волн (видимый и ультрафиолетовый).

Источники света для видимой и ультрафиолетовой областей нередко раздельные. В видимой области используется лампа накаливания (340-1100 нм), в ультрафиолетовой – водородная (дейтериевая) лампа (186-350 нм). Смена источников излучения производится на участке, где их диапазоны перекрываются (340-350 нм). Оптическая часть спектрофотометра, включая кюветы (для слоя жидкости толщиной 10 мм), выполнена из кварцевого стекла. Разложение пучка света, поступающего от источника света, осуществляется с помощью кварцевой призмы или дифракционной решетки. Путем поворота

зеркального объектива (зеркало Литтрова) луч света нужной длины волны подается на выходную щель монохроматора и далее – на кювету. Интенсивность света, прошедшего через кювету с раствором, измеряется с помощью фотоэлементов: сурьмяно-цезиевого с окном из кварцевого стекла (186-650 нм) или кислородно-цезиевого (600-1100 нм); переключение фотоэлементов производится ориентировочно в зоне перекрытия их диапазонов (указывается в паспорте спектрофотометра).

При работе с длинами волн короче 200 нм (вакуумная ультрафиолетовая область) природный кварц, кислород воздуха, пары воды в воздухе и сама вода начинают в заметной степени поглощать свет. Возникает необходимость использования специального источника света. Все элементы в этом случае изготавливают из специального кварца («Supersil»), обладающего лучшим пропусканием, чем природный кварц. Весь оптический тракт продувают азотом, а исследуемое вещество иногда растворяют в тяжелой воде (D_2O).

На рис. 3.52 представлена упрощенная схема оптической системы одного из отечественных спектрофотометров.

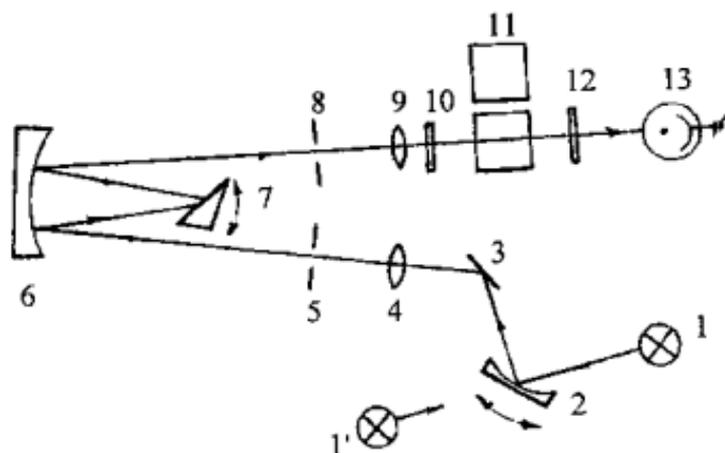


Рис. 3.52. Оптическая схема спектрофотометра СФ-16

Обозначения: 1 и 1' – источники света (лампа накаливания и дейтериевая лампа); 2 – зеркальный конденсор; 3 – плоское зеркало; 4 – линза; 5 – входная щель; 6 – зеркальный объектив; 7 – диспергирующая призма; 8 – выходная щель; 9 – линза; 10 – светофильтр; 11 – кюветы; 12 – защитная пластинка; 13 – фотоэлемент

Спектрофотометрия в ИК-области. При работе в инфракрасной области спектра в качестве источников излучения обычно используются различного рода накаляющиеся штифты (штифт Нернста, глобар, угольный штифт). Штифт Нернста представляет собой стерженек длиной 2,5 см и диаметром 2 мм, который спрессован из порошкообразной массы циркония, смешанной с 15% окиси иттрия. Накаляется он в воздухе обычно до сравнительно высокой температуры (2000°K) проходящим через него постоянным или переменным током. Непрерывный спектр штифта простирается в далекую инфракрасную область, максимум излучения обычно лежит в ближней инфракрасной области возле 2 мкм. При работе в более далекой инфракрасной области применяют штифт из карбида кремния (SiC) – глобар (силитовый стержень). Глобар также представляет стерженек, но более крупного размера (длина 5-10 см, диаметр 5-6 мм). Накаляется он, как и штифт Нернста, на воздухе постоянным или переменным током до температуры, не превышающей 1500°K. Иногда применяют угольные штифты, которые раскаляются в вакууме пропускаемым через них электрическим током.

В ближайшей ИК-области (до 2,5 мкм) в качестве источника излучения могут быть применены, как и в видимой части спектра, электрические лампы накаливания. Для разложения света используют стеклянные призмы или обычные дифракционные решетки, а для восприятия излучения – фотоэлементы и фотосопротивления.

В далекой ИК-области (свыше 2,5 мкм) применяют призмы из галогенидов щелочных металлов (NaCl, KBr, CaF₂, LiF₂ и др.). Окошки для ковет в большинстве случаев изготавливают из тех же материалов, что и призмы. Эти материалы гигроскопичны, поэтому оптические детали из них необходимо тщательнейшим образом предохранять от контакта даже со следами воды. ИК-излучение воспринимается термостолбиками, болометрами или приемниками Голея. Термостолбики представляют собой последовательно соединенные термоэлементы (термопары), что позволяет получить достаточно высокую термоэлектродвижущую силу. Часто для термоэлементов применяют висмут и его сплавы с оловом. К спаям термоэлементов припаивают тонкую металлическую пластинку, которая тщательно зачернена и выполняет роль световоспринимающей поверхности. Болометры представляют собой термосопротивления. В простейшем случае болометр содержит хорошо зачерненную металлическую полоску с ориентировочными размерами 5 мм × 0,5 мм × 1 мкм, электрическое сопротивление которой составляет несколько Ом. Изменение температуры такой полоски при поглощении падающего на нее света регистрируется по изменению ее

сопротивления. Применяются болометры обычно в схеме мостика Уитстона. Термоэлементы и болометры часто изготавливают в виде вакуумных приборов. Приемник Голея имеет две небольшие полости (по 3 мм³ каждая), соединенные между собой каналом. Торцевая часть (мембрана) одной полости хорошо зачернена и нагревается при попадании на нее излучения. Газ в полостях тоже нагревается и увеличивает свой объем. Следствием этого является небольшое перемещение мембраны второй полости, которое обнаруживают с помощью оптической системы Тейлера. Чувствительность приемников Голея на порядок выше, чем термоэлементов.

В качестве конденсоров и объектива в монохроматоре и осветительной системе ИК-спектрофотометров служат алюминиевые зеркала (отражательная оптика).

Серьезные сложности возникают с выбором растворителя. Универсальных растворителей для работы в ИК-области, которые были бы вполне прозрачны и химически индифферентны, нет. Из органических растворителей можно назвать четыреххлористый углерод и хлороформ, в особенности в ближайшей части спектра, где ими широко пользуются. В более далекой ИК-области спектра используют сероуглерод. Эти растворители для освобождения от следов воды несколько раз перегоняют и предохраняют от контакта с парами воздуха.

Поскольку биомолекулы обычно мало растворимы в названных растворителях (за исключением стероидов и липидов), в настоящее время широко применяются способы изучения ИК-спектров биологических соединений в твердом состоянии. Для приготовления образцов из кристаллических соединений используют в основном суспензирование в подходящей среде и способ прессованных таблеток. В качестве иммерсионной среды в первом способе широко применяют парафиновые масла (вазелиновое масло) и фторированные или хлорированные углеводороды, прозрачные в областях, где парафиновые масла поглощают. Одним из недостатков этого способа является невозможность контролировать толщину слоя образца. Способ прессованных таблеток лишен этого недостатка. Было показано, что галоидные соли щелочных металлов, прежде всего KBr и KCl, могут быть сплавлены в прозрачные таблетки под давлением в несколько тысяч атмосфер в вакууме при комнатной температуре. Обезвоженное исследуемое вещество тщательно растирают вместе с солью (в соотношении вещество: соль как 1:200 – 1:100) и затем прессуют. Получают таблетку, представляющую собой своего рода твердый раствор пробы в соли, выполняющей роль

растворителя. Параллельно прессуют таблетку из такой же навески соли (без пробы), которая при фотометрировании используется для компенсации поглощения света солью. Одна из конструкций пресс-формы и оправки для таблеток представлена на рис. 3.53.

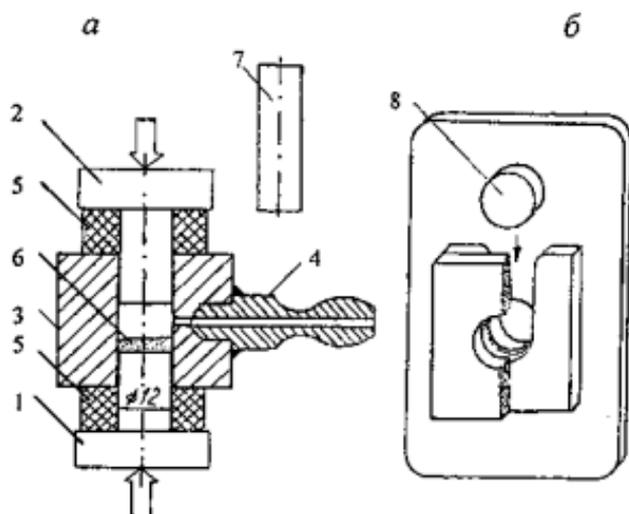


Рис 3.53. *Пресс-форма (а) и оправка для таблетки (б): 1,2 – пуансоны; 3 – корпус; 4 – штуцер для подключения к вакууму; 5 – резиновые шайбы; 6 – прессуемое вещество; 7 – выталкиватель таблетки; 8 – таблетка. Все металлические детали пресс-формы изготовлены из нержавеющей стали [29]*

При изучении полимеров обычно используют пленки, полученные осаждением из раствора или расплава. Если в качестве подложки используется хлористое серебро, прозрачное во всей средней ИК-области, пленку вещества с подложки можно не снимать. При изучении фибриллярных белков, составляющих основу волос, кожи и различных тканей, готовят тонкие среды необходимой толщины. При малой площади образцов используют специальные микроосветители.

Спектрофотометры бывают нерегистрирующими (не имеют автоматической развертки спектра) и регистрирующими. В первом случае для получения спектра поглощения образца в широком интервале длин волн необходимо последовательно производить измерения его оптической плотности для разных длин волн и по этим данным вручную строить спектральную кривую. Так поступают обычно при работе в видимой и

УФ-областях спектра. ИК-спектры очень сложны, и их снимают с помощью спектрофотометра, регистрирующего спектральные кривые автоматически на бумагу. Специальная бумага (с разметкой пропускания и волновых чисел в см^{-1}), закрепленная на барабане, вращается синхронно с изменением длины волны излучения, подаваемого на образец. Перо самописца перемещается вдоль оси барабана и регистрирует значение пропускания для каждой длины волны.

Для сравнения на рис. 3.54 представлены УФ- и ИК-спектры молекулы органического соединения [31].

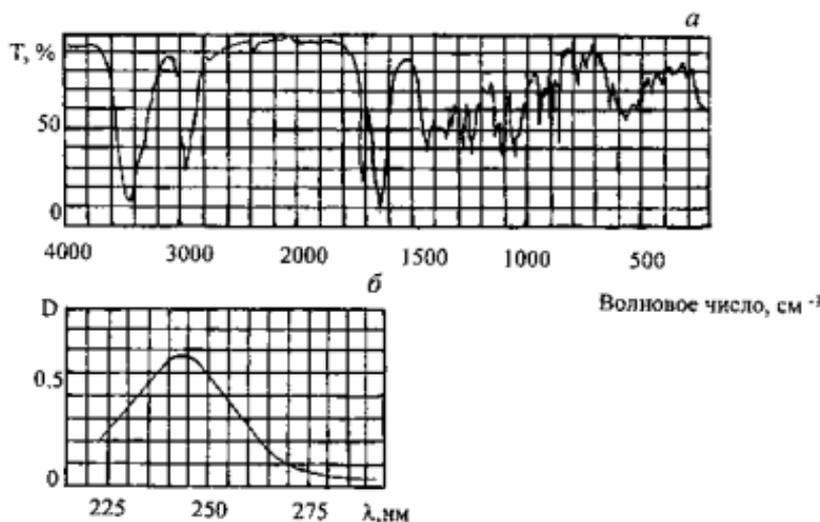


Рис. 3.54. Инфракрасный (а) и ультрафиолетовый (б) спектры гидрокортизона соответственно в бромиде калия и абсолютном этиловом спирте

Микроспектрофотометрия. Как и большинство инструментальных методов, спектрофотометрия нашла применение при изучении микроскопических объектов, специфика которых наложила отпечаток на конструкции приборов. Принцип же метода сохранился неизменным.

Обычно микрофотометр совмещен с микроскопом. Если микроскопический объект содержит хроматофоры, поглощающие видимый спектр, или субклеточные структуры окрашены препаратом, специфически реагирующим с определенными биомолекулами, применяют прибор с оптической системой, изготовленной из обычного стекла. В случае использования УФ-лучей, специфически поглощающихся

отдельными видами биомолекул, применяется более дорогая кварцевая оптика, УФ-источники излучения и соответствующие детекторы.

Распределение интересующего вещества в цитологическом объекте детально изучают обычно путем сканирования последнего узким (менее 1 мкм в диаметре) пучком монохроматического света. Поскольку интенсивность (мощность) лучка, прошедшего через объект, крайне мала, для его регистрации используют фотоэлектронный умножитель (ФЭУ), который совмещает в себе фотоэлемент и электронный усилитель электрического сигнала.

Данные микрофотометрии при одной длине волны позволяют определить концентрацию или массу вещества (рис. 3.55а), а при использовании диапазона длин волн (рис. 3.55б) – идентифицировать вещество в клетке (по его спектру).

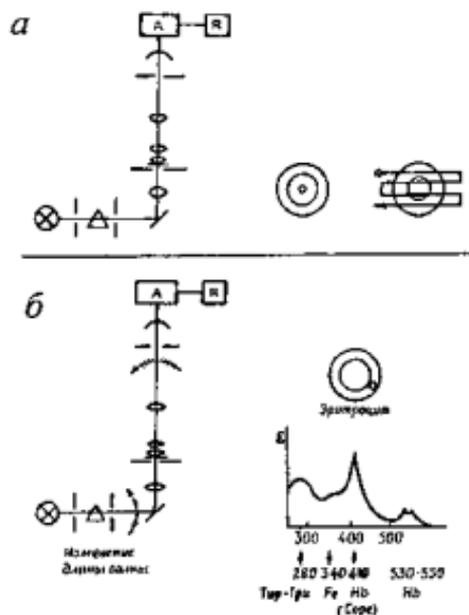


Рис. 3.55. Принципы микроспектрофотометрии ([32]): а – определение массы или концентрации вещества (измерение поглощения при одной длине волны); б – идентификация веществ (измерения при разных длинах волн). А – измеритель оптической плотности; R – регистрирующее устройство; маленький кружок (о) на эритроците – сканирующий пучок света. Стрелками со штрихами отражено использование диапазона длин волн

Существует множество систем сканирования, получения спектров поглощения, их записи (регистрации) и расшифровки.

Помимо непосредственного фотометрирования цитологического объекта применяют фотометрирование путем сканирования (денситометрирование) изображения объекта, полученного фотографическим путем на цветной пленке. Кроме денситометрирования, используют и измерение на обычном спектрофотометре в кюветах оптической плотности растворов, получаемых с помощью экстракции красителя из отдельных кусков фотопленки с изображением объекта.

6.1.3. Применение абсорбционного спектрального анализа

Абсорбционный спектральный метод обладает высокой информационной ценностью и широко применяется в биохимических исследованиях, а фотоэлектроколориметры и спектрофотометры являются обязательной принадлежностью биохимических лабораторий.

Одной из наиболее распространенных задач, решаемых этим методом, является определение концентрации веществ в растворах.

В простейшем случае, когда раствор имеет окраску, подбирают светофильтр с дополнительным цветом (табл.3.2), для серии стандартных (с известной концентрацией) растворов определяют значения оптической плотности и строят калибровочный график $D = f(C)$, пользуясь которым по замеренным значениям оптической плотности опытных растворов находят их концентрации.

Аналогичным образом поступают с растворами, получившими окраску после реакции со специфическими реагентами. При работе в УФ- и ИК-областях выбирают характерную для данного соединения длину волны, которой обычно соответствует пик поглощения, и тоже строят калибровочный график.

В лабораторной и производственной практике иногда приходится колориметрическим методом определять концентрации сильно окрашенных растворов ($D > 0,8$), измерение оптической плотности которых дает большую ошибку.

Наиболее простым способом уменьшения оптической плотности является разбавление раствора. Однако при высокой кратности разбавления возникают ошибки, связанные с измерением объемов, что существенно снижает выигрыш от точности при фотометрировании. Альтернативой способу разбавления является дифференциальный способ, сущность которого заключается в том, что оптическая плотность испытуемого раствора измеряется по отношению к стандартному раствору, содержащему определяемое вещество в повышенной

Цвет раствора в зависимости от поглощаемой части спектра [4]

Спектральный диапазон поглощенной части, нм	Цвет поглощенной части света	Кажущийся цвет раствора (дополнительный цвет)
400-450	Фиолетовый	Желто-зеленый
450-480	Синий	Желтый
480-490	Зелено-синий	Оранжевый
490-500	Сине-зеленый	Красный
500-560	Зеленый	Пурпурный
560-575	Желто-зеленый	Фиолетовый
575-590	Желтый	Синий
590-625	Оранжевый	Зелено-синий
625-750	Красный	Сине-зеленый

концентрации (C_0), а также все те реактивы, что и в испытуемом растворе с концентрацией $C > C_0$. В этом случае калибровочный график строят в осях $D = f(C - C_0)$, а концентрацию испытуемого раствора находят путем сложения известной концентрации C_0 со значением $C - C_0$, найденным по калибровочному графику (на оси абсцисс можно сразу нанести шкалу истинных значений концентрации испытуемого раствора).

Фотометрический абсорбционный анализ позволяет определять концентрацию двух и более веществ, находящихся в растворе, без разделения смеси. Если в спектре поглощения раствора имеются участки, в одном из которых поглощает только первое вещество, а в другом – только второе, то концентрацию каждого из них находят по соответствующим калибровочным графикам, построенным отдельно для растворов этих веществ при своих длинах волн. Этому случаю соответствуют два независимых друг от друга уравнения:

$$C_1 = D_1 / \varepsilon_{\lambda_1} b,$$

$$C_2 = D_2 / \varepsilon_{\lambda_2} b,$$

где ε_{λ_1} и ε_{λ_2} – молярные коэффициенты поглощения первого вещества при длине волны λ_1 и второго – при длине волны λ_2 ; D_1 и D_2 – оптические плотности раствора соответственно при длинах волн λ_1 и λ_2 ; C_1 и C_2 – концентрации первого и второго веществ в растворе; b – толщина поглощающего слоя.

В общем случае, когда спектры веществ, находящихся в растворе, взаимно перекрываются, определение их концентрации связано с решением системы взаимосвязанных уравнений. Число уравнений в системе равно числу веществ, находящихся в растворе. При этом необходимо знать молярные коэффициенты поглощения каждого из веществ при таком же числе длин волн. Так, для двухкомпонентного раствора (содержащего два растворенных вещества) оптическая плотность при длинах волн λ_1 и λ_2 будет равна:

$$D_{\lambda_1} = (\varepsilon_{\lambda_{1,1}} C_1 + \varepsilon_{\lambda_{1,2}} C_2) b,$$

$$D_{\lambda_2} = (\varepsilon_{\lambda_{2,1}} C_1 + \varepsilon_{\lambda_{2,2}} C_2) b,$$

где $\varepsilon_{\lambda_{1,1}}$ и $\varepsilon_{\lambda_{1,2}}$ – молярные коэффициенты поглощения первого и второго веществ при длине волны λ_1 , а $\varepsilon_{\lambda_{2,1}}$ и $\varepsilon_{\lambda_{2,2}}$ – соответственно при длине λ_2 .

Отсюда концентрации веществ:

$$C_1 = (\varepsilon_{\lambda_{2,2}} D_{\lambda_1} - \varepsilon_{\lambda_{1,2}} D_{\lambda_2}) / B,$$

$$C_2 = (\varepsilon_{\lambda_{1,1}} D_{\lambda_2} - \varepsilon_{\lambda_{2,1}} D_{\lambda_1}) / B,$$

$$\text{где } B = (\varepsilon_{\lambda_{1,1}} \varepsilon_{\lambda_{2,2}} - \varepsilon_{\lambda_{2,1}} \varepsilon_{\lambda_{1,2}}) b.$$

Фотоэлектроколориметры используются при титровании, позволяя более объективно и точно найти точку эквивалентности. Для этой цели обычно применяют однолучевой ФЭК. Если окончание титрования, например, сопровождается появлением окраски, то перед началом титрования стрелку гальванометра ставят на пропускание $T = 90-100\%$. Добавляя титрующий раствор и перемешивая содержимое кюветы, установленной в гнездо ФЭКа, с помощью электрической микромешалки, определяют момент, когда пропускание начнет снижаться (появляется окраска). Точку эквивалентности V_S , как это было и при кондуктометрическом титровании, находят с помощью графика $T - V$ (рис. 3.56) против точки пересечения двух прямых (горизонтальной и наклонной).

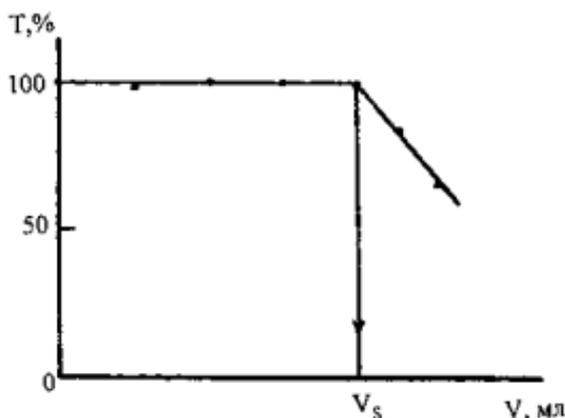


Рис. 3.56. График фотоэлектрического титрования

Для фотоэлектрического титрования выпускаются специальные приборы или приставки к обычным ФЭКом. Объем титрующего раствора отмеривают микробюреткой.

Спектрофотометрический анализ позволяет решать задачу идентификации веществ, так как каждое из них имеет свой индивидуальный спектр. С этой целью созданы атласы спектров химических соединений различных классов и веществ различного назначения, например, лекарственных.

ИК-спектры содержат богатую информацию о химическом строении молекул, что позволяет не только осуществлять идентификацию веществ, но и расшифровывать формулы вновь полученных соединений.

Биомакромолекулы, прежде всего белки и нуклеиновые кислоты, в зависимости от внешних условий (рН, температуры, природы растворителя, наличия в растворе различных веществ и т.д.) меняют свою конформацию (пространственное расположение атомов и атомных групп). Такого рода внутримолекулярные перестройки влияют на оптическую плотность, замеренную при определенных длинах волн. Например, D_{260} (оптическая плотность при 260 нм) ДНК возрастает при нагревании ее (начиная с некоторого значения температуры). Это повышение D_{260} (гиперхромия) является критерием денатурации ДНК (разделения ее цепей). В определенном диапазоне температур денатурация обратима (происходит ренатурация), что подтверждается возвращением D_{260} к прежнему значению при охлаждении. Такого же рода явление (гиперхромия) наблюдается и у белков при денатурации (переходе спираль – клубок).

При ассоциации (объединении) молекул белка и диссоциации их на субъединицы, индуцируемой, например, изменением рН, также происходит изменение оптической плотности. Этот процесс удобно изучать с помощью дифференциальной спектрофотометрии, используя два раствора, идентичные во всем, кроме значения рН.

Естественно, с помощью спектрофотометрии можно изучать кинетику реакций, так как в процессе их протекания изменяется химический состав реакционной смеси. При этом отпадает необходимость отбирать пробы, если реакция происходит в кювете.

В заключение следует отметить основные достоинства абсорбционного спектрального анализа:

1. Одновременное получение качественных и количественных данных.
2. Богатая информация о химической природе вещества.
3. Высокая скорость анализа.
4. Высокая чувствительность метода.
5. Возможность анализа веществ во всех агрегатных состояниях.
6. Возможность анализа смесей без разделения их на компоненты.
7. Возможность многократного использования пробы для повторных анализов.
8. Применимость для исследования микроскопических объектов. Так, микроспектрофотометр Касперсона, усовершенствованный Траппом, еще в 50-х годах прошлого века позволял измерять спектр поглощения объектов с диаметром всего 0,5 мкм.
9. Возможность ввода данных со спектрофотометра в ЭВМ с целью идентификации и расшифровки спектрограмм.

6.2. Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа

6.2.1. Теоретические основы методов

При прохождении света через вещество помимо его поглощения (о котором говорилось выше) имеет место и рассеяние, которое наиболее выражено в неоднородных средах. Неоднородности среды, вызывающие рассеяние света, бывают различными по размерам, форме и физической природе. К средам, содержащим частицы с размером больше длины волны, относятся эмульсии, суспензии, аэрозоли. Коллоидные системы содержат частицы с размером значительно меньше длины волны света. Рассеяние света мутными средами (дисперсными системами) изучал английский физик Дж. Тиндаль. Его именем, в частности, назван оптический эффект, суть которого состоит в том, что

благодаря рассеянию света мутными средами можно в затемненном помещении сбоку видеть световой пучок. Большой вклад в установление закономерностей рассеяния света внес английский физик, лауреат Нобелевской премии 1904 года Дж. У. Рэлей.

Если линейные размеры частиц больше длины волны падающего света, то его рассеяние обусловлено преломлением луча на границе раздела частица – растворитель (или газ), а также отражением от частиц. Если размеры частицы меньше длины волны, то наблюдается огибание ею частицы (дифракция), которая становится источником световых волн.

В биологических исследованиях наиболее часто приходится иметь дело с эмульсиями, суспензиями и коллоидными растворами.

Нефелометрический метод основан на измерении интенсивности рассеянного света (рис. 3.57).

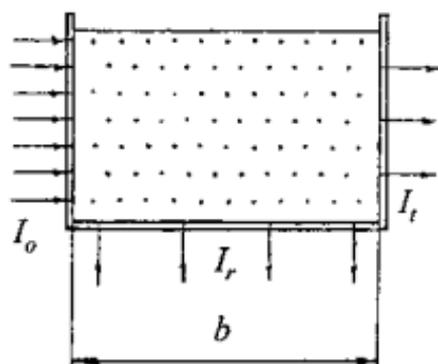


Рис. 3.57. Рассеяние светового потока: I_0 – интенсивность падающего, I_r – рассеянного и I_t – прошедшего через раствор в кювете светового потока

Для частиц с размером менее длины волны (λ) рассеяние подчиняется закономерностям, установленным Рэлеем. Прежде всего следует отметить, что частота рассеянного света совпадает с частотой света в первичном пучке (с интенсивностью I_0). Интенсивность рассеянного света (I_r) в соответствии с упрощенной формулой Рэля

$$I_r = k \frac{N_0 v^2}{\lambda^4} I_0,$$

где N_0 – число частиц в единице объема среды; v – объем частицы; k – коэффициент пропорциональности.

В соответствии с приведенным уравнением, интенсивность рассеянного света обратно пропорциональна длине волны в четвертой степени (этим, в частности, объясняется голубой цвет неба), а при одинаковой объемной концентрации взвеси (N_0v) – прямо пропорциональна объему рассеивающей частицы.

Если же линейные размеры частиц превосходят длину волны, то рассеянный свет создается не за счет дифракции, а преимущественно за счет отражения от их поверхности, в связи с чем интенсивность рассеянного света оказывается пропорциональной не квадрату объема частиц, а их поверхности (соотношение Н.Н. Андреева). При том же количестве раздробленного вещества (при той же объемной концентрации) с увеличением объема частицы интенсивность рассеянного света уменьшится (так как уменьшится **общая** площадь рассеивающей поверхности). Действительно, согласно соотношению Н.Н. Андреева,

$$I_r \sim N_0 S \sim N_0 v / d,$$

где S – поверхность частицы; d – средний линейный размер (диаметр) частицы; N_0v – объемная концентрация вещества.

Таким образом, независимо от соотношения размера частицы с длиной волны интенсивность рассеянного дисперсной системой света при одинаковых условиях (длине волны λ , размере частицы d , длине проходимого светом пути b) прямо пропорциональна концентрации частиц N_0 и, соответственно, весовой концентрации C вещества, которая равна $N_0v\rho$ (ρ – плотность частицы):

$$I_r = k_r \cdot C \cdot I_0,$$

где k_r – коэффициент рассеяния.

Поскольку доля рассеянного света $I_r/I_0 = k_r \cdot C$ для конкретной дисперсной системы с толщиной слоя $b=1$ является величиной постоянной, то интенсивность прошедшего через нее света I будет снижаться по экспоненциальному закону с увеличением пути (b), пройденного светом в дисперсной среде:

$$I_r = I_0 e^{-k_r' C b},$$

откуда $D = \lg(I_0/I_r) = k_r' C b$.

где D – рассеивающая способность; $k_r' = 0,4343 k_r$ – коэффициент ослабления светового потока. По аналогии с абсорбционным анализом, рассеивающую способность, как и оптическую плотность, обозначают буквой D .

Турбидиметрический анализ основан на измерении интенсивности светового потока, прошедшего через дисперсную среду.

Следует иметь в виду, что приведенные зависимости интенсивностей рассеянного ($I_r = k_r \cdot C \cdot I_0$) и прошедшего через среду ($I_t = I_0 \cdot e^{-k \cdot C \cdot b}$) пучков света, положенные в основу нефелометрического и турбидиметрического методов анализа, соблюдаются только в сильно разбавленных растворах (до 100 мг/л). Кроме того, необходимо принимать меры к тому, чтобы сохранить неизменным размер частиц и не дать возможности им выпасть в осадок. Последнее затруднение не имеет места в коллоидных растворах.

6.2.2. Аппаратура нефелометрического и турбидиметрического методов

Нефелометрические и турбидиметрические измерения концентрации мутных сред в простейшем случае можно проводить методом стандартных серий подобно тому, как это делается в колориметрии. Кроме того, для этой цели используются более сложные устройства – нефелометры.

Одним из таких приборов является колориметр-нефелометр Дюбоска, работа которого в колориметрическом режиме была описана ранее. При нефелометрических измерениях на этом приборе используют кюветы с непрозрачным дном и освещение их осуществляют сбоку (рис. 3.58).

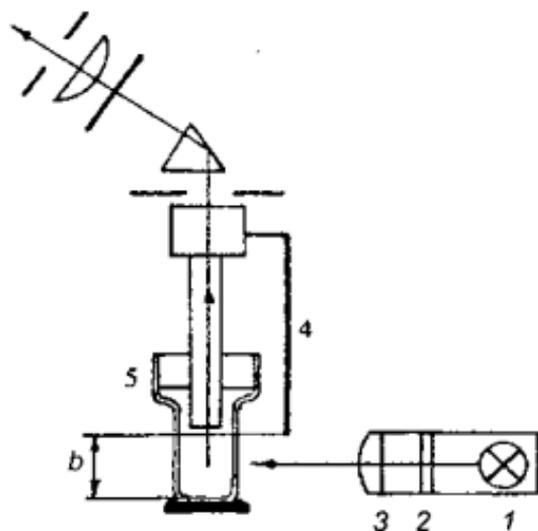


Рис. 3.58. Работа колориметра-нефелометра Дюбоска в режиме нефелометра: 1 – лампа; 2 – матовое стекло; 3 – линза; 4 – шторка, ограничивающая ширину светового потока сверху; 5 – кювета

Наблюдение за яркостью рассеянного света по-прежнему ведут через ту же оптическую систему, но уже под прямым углом по отношению к падающему свету. Нефелометрические измерения рекомендуется проводить в полностью затемненном помещении, так как посторонний свет мешает работе, в особенности при измерении слабо мутных растворов. Методика работы на нефелометре не отличается от методики, описанной для колориметрических измерений. В качестве стандарта используют взвесь с известной концентрацией частиц ($C_{ст}$). Выравнивание интенсивностей света, рассеянного опытной и стандартной средами, осуществляют путем изменения толщины слоя в опытной кювете ($b_{оп}$) до исчезновения границы между полями, наблюдаемыми в окуляр. Концентрация вещества в опытной среде $C_{оп} = C_{ст}(b_{ст}/b_{оп})$.

Описанный нефелометр относится к приборам непосредственного сравнения. Кроме них, выпускаются нефелометры, подобно колориметрам работающие по принципу уравнивания двух световых потоков: одного – от рассеивающей взвеси, другого – от матового или молочного стеклянного рассеивателя прибора. Уравнивание потоков производится путем изменения интенсивности одного из потоков с помощью переменной диафрагмы до момента исчезновения границы между полями, наблюдаемыми в окуляр (визуальные нефелометры), или установления стрелки нуль-гальванометра на нулевой отметке (фотоэлектрические нефелометры). В этих приборах фотометрированию подвергается рассеянный свет.

Турбидиметрические измерения обычно осуществляют на обычных колориметрах (визуальных или фотоэлектрических). Определение рассеивающей способности D производится с использованием тех же кювет и той же шкалы, что и в колориметрии при измерении оптической плотности истинных растворов. Длина волны источника света принципиальной роли при определении концентрации взвесей нефелометрическим и турбидиметрическим методами не имеет.

Нефелометрический метод применяется и в сочетании с микроскопией. Разрешающая способность микроскопов ограничивается явлением дифракции, ограничивающей предельный размер частицы. Изображение частицы правильно передает ее истинную форму, если размер частицы соизмерим с длиной волны и составляет для видимого света величину порядка 0,5 мкм. Изображение частиц меньших размеров будет иметь вид дифракционного кружка, форма которого практически не зависит от формы частицы. При специальном способе наблюдения эти дифракционные картины могут быть замечены, а по ним установлены факт существования частиц, их положение, движение и в определенной мере конфигурация. Вопросы на-

блюдения и исследования таких малых частиц в коллоидных растворах (и аэрозолях) составляют предмет ультрамикроскопии.

Ультрамикроскопические частицы по своим размерам в несколько сот раз превосходят молекулы растворителя, но они не настолько велики, чтобы в каждый данный момент времени удары молекул усреднялись и частица оставалась на месте. Напротив, она все время находится в состоянии интенсивного и беспорядочного броуновского движения, за которым наблюдают с помощью специального микроскопа, называемого ультрамикроскопом.

6.2.3. Области применения нефелометрического и турбидиметрического методов

Основной областью применения этих методов является определение концентрации частиц в жидких дисперсионных средах (растворителях). К числу дисперсных систем, исследуемых данными методами, относятся как грубодисперсные, так и тонкодисперсные (коллоидные) системы. К последним относятся коллоидные растворы биологических макромолекул. К грубодисперсным системам биологического происхождения принадлежат некоторые эмульсии (молоко), клетки (например, форменные элементы крови) и микроорганизмы, в частности бактерии, размер которых обычно превышает длину волны видимого света. Турбидиметрический метод по этой причине используется для исследования кинетики роста численности популяции микроорганизмов с помощью обычного ФЭКа. За меру плотности популяции в данном случае условно принимается рассеивающая способность D взвеси микроорганизмов. На основании такого рода замеров строят кривые роста микроорганизмов.

Разработаны специальные способы, в частности сочетающие нефелометрический и поляриметрический методы, которые позволяют с помощью поляризационного нефелометра получить информацию о конформации и молекулярной массе молекул полимеров, находящихся в растворе.

Измеряя рассеивание света белковыми растворами, можно найти значение молекулярной массы белка [33]. Если размеры молекулы не превышают $1/20$ длины волны света, то такие молекулы рассеивают свет равномерно (независимо от их формы). В белковом растворе рассеянный свет имеет большую интенсивность, чем в чистом растворителе. Эта разница в интенсивности светорассеяния называется мутностью раствора (τ), значение которой равно

$$\tau = 16\pi R_{90} / 3,$$

где R_{90} – интенсивность света, рассеянного под углом 90° к направлению падающего на раствор света.

Мутность белковых растворов пропорциональна числу и размерам белковых молекул:

$$\tau = MHC, \text{ или } 1/M = HC/\tau,$$

где M – молекулярная масса; C – концентрация белка (г/мл); H – коэффициент пропорциональности. Последний вычисляют по формуле

$$H = \frac{32\pi^3}{3N_A\lambda^4} n_0^2 \left(\frac{n-n_0}{C}\right)^2,$$

где N_A – число Авогадро; λ – длина волны падающего света; n и n_0 – соответственно показатели преломления белкового раствора и чистого растворителя.

Приведенное выше уравнение для значения величины $1/M$ справедливо только в идеальных системах, где нет взаимодействия между молекулами. С учетом последнего это уравнение принимает следующий вид:

$$1/M = HC/\tau - 2BC,$$

где B – константа взаимодействия.

Если отложить графически зависимость HC/τ от C , то по тангенсу наклона графика находят значение B , а отрезок, отсекаемый им (графиком) от оси ординат, дает величину $1/M$.

Если размеры белковой молекулы или другой частицы соизмеримы с длиной волны λ , то свет, рассеянный одной частью молекулы, может не совпадать по фазе со светом, рассеянным другой его частью. Возникает внутренняя интерференция, которая приводит к тому, что интенсивность рассеянного света распределяется несимметрично относительно направления, перпендикулярного пучку падающего света. Отношение интенсивности света, рассеянного под углом 45° , к интенсивности света, рассеянного под углом 135° (симметрично относительно угла 90°), за вычетом единицы называется коэффициентом диссимметрии (q). С увеличением разбавления q приближается к предельному значению, называемому характеристическим коэффициентом диссимметрии. С помощью специального прибора (например, фотометра Аминко) можно экспериментально определить значения q , а по ним найти молекулярные массы биополимеров.

Ультрамикроскопия также помимо концентрации коллоидных частиц позволяет определить их размеры. Более того, в ряде случаев она дает представление о форме частицы. Иногда можно увидеть в ультрамикроскоп мерцание светящихся точек. Это явление объясняется отступлением геометрической конфигурации наблюдаемых частиц от шарообразной формы. Частица со временем меняет свое положение по отношению к первичному лучу (наблюдение ведется на темном поле), и это может сильно повлиять на интенсивность рассеянного света, причем в тем большей степени, чем более вытянута форма частицы.

6.3. Рефрактометрический метод

6.3.1. Теоретические основы метода

Рефрактометрический анализ основан на связи показателя преломления системы с ее составом и химическими свойствами.

Преломлением, или рефракцией, называют изменение направления прямолинейного распространения света при переходе из одной среды в другую, обусловленное взаимодействием его со средой. Полагают, что в поле световой волны молекула ведет себя как осциллирующий электрический диполь, так как под воздействием света в атомах, через которые он проходит, возникают вынужденные колебания электронов и ядер, генерирующие вторичные волны. Последние взаимодействуют с исходными световыми волнами, изменяя их результирующую скорость и направление распространения.

Изменение распространения оценивают с помощью показателя преломления, который равен отношению синуса угла падения светового луча к синусу угла преломления. Различают абсолютный показатель преломления (N) вещества, вычисленный для случая, когда луч падает на вещество из пустоты, и относительный (n), когда луч падает из какой-то вещественной среды, например, из воздуха (рис. 3.59).

Было показано, что показатель преломления одновременно свидетельствует о степени изменения скорости света при переходе из одной среды в другую. Так, при переходе света из вакуума в оптически прозрачную среду абсолютный показатель преломления

$$N = \sin \alpha / \sin \beta = v_0 / v_{op}.$$

Он свидетельствует о том, что скорость света в среде (v_{op}) будет в N раз меньше, чем скорость света в вакууме ($v_0 = 300\,000$ км/с).



Рис. 3.59. Преломление светового луча на границе воздуха и другой оптической среды

На практике проще находить значение показателя преломления по отношению к воздуху:

$$n = v_{\text{возд}} / v_{\text{сп}}$$

Этот относительный показатель преломления отличается от абсолютного показателя преломления приблизительно всего лишь на 0,03%, так как $N = 1,00027n$.

Значение показателя преломления конкретного вещества зависит от его температуры, давления и длины волны света λ . С увеличением температуры газообразных и жидких тел их объем увеличивается, а плотность – уменьшается, следствием чего является уменьшение показателя преломления. Если вещество сжимаемо, то с увеличением давления его плотность возрастает, а с ней растет и значение показателя преломления. В большой мере на него влияет и длина волны света, особенно в УФ-области (рис. 3.60).

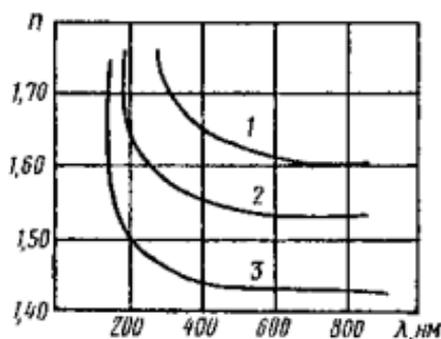


Рис. 3.60. Зависимость показателя преломления (n) от длины волны (λ): 1 – для стекла; 2 – для кварца; 3 – для флюорита [4]

С увеличением длины волны показатель преломления уменьшается. По этой причине для унификации значений показателя преломления его измеряют при определенных условиях (температура – 20 или 25°C, длина волны $\lambda_D = 589,3$ нм – желтая линия в спектре натрия), что учитывается при написании его символа (n_D^{20} или n_D^{25}). Для воды $n_D^{20} = 1,33299$; $n_D^{25} = 1,33250$. Количественно зависимость показателя преломления (n) конкретного вещества от длины волны оценивается с помощью средней дисперсии Δ_{FC} , численно равной разности показателей преломления при длинах волн, соответствующих синей (F) и красной (C) линиям в спектре водорода ($\lambda_F = 486,1$ нм; $\lambda_C = 656,3$ нм). Средняя дисперсия $\Delta_{FC} = n_F - n_C$.

Естественно, показатель преломления зависит от химической природы вещества, а если оно находится в виде раствора – от его концентрации.

Связь показателя преломления с химической природой вещества осуществляется через молекулярную рефракцию R , полученную из формулы Лоренца-Лорентца путем умножения выражения для удельной рефракции на молекулярный вес (молекулярную массу) M :

$$R = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d},$$

где d – плотность вещества.

Молекулярная рефракция обладает свойством аддитивности: она равна сумме атомных рефракций. Так, для молекулы $C_nH_kO_m$ молекулярная рефракция

$$R_{C_nH_kO_m} = nR_C + kR_H + mR_O,$$

где R_C , R_H и R_O соответственно рефракции атомов углерода, водорода и кислорода.

При работе с соединениями, имеющими двойную или тройную связь между углеродными атомами, следует учитывать приращение R за счет так называемых инкрементов связей (они прибавляются к сумме атомных рефракций). В качестве примера в табл. 3.3 представлены отдельные значения атомных рефракций и инкрементов связей.

Атомные рефракции и инкременты связей

Атом (связь)	R	Атом (связь)	R
H	1,100	O (гидроксильный)	1,525
F	0,997	O (эфирный)	1,643
Cl (хлор)	5,967	O (карбонильный)	2,211
Br	8,865	N (в первичных аминах)	2,322
I (йод)	13,900	N (во вторичных аминах)	2,502
C	2,418	N (в третичных аминах)	2,840
Инкременты связей:			
двойная углеродная связь	1,733	S (в меркаптанах)	7,810
тройная углеродная связь	2,398	S (в алкилсульфидах)	8,000
		S (в тиофенах)	7,260

Так, для воды молекулярная рефракция, вычисленная как сумма атомных рефракций,

$$R_{H_2O} = 2R_H + R_O = 2 \cdot 1,100 + 1,525 = 3,725.$$

Эмпирически найденное значение молекулярной рефракции для воды

$$R_{H_2O} = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d} =$$

$$= (1,33299^2 - 1) \cdot 18,02 / (1,33299^2 + 2) \cdot 0,9977 = 3,715.$$

Расхождение между этими значениями менее 0,3%.

Для твердых веществ эмпирически значение молекулярной рефракции R_2 находят через молекулярную рефракцию раствора этого вещества с известной концентрацией по формуле:

$$R_2 = \frac{R_{1,2} - R_1}{x_2} + R_1,$$

где R_1 – молекулярная рефракция растворителя, найденная по приве-

денной ранее формуле через значения n_1 , M_1 и d_1 ; $R_{1,2}$ – молекулярная рефракция раствора, которая вычисляется по формуле:

$$R_{1,2} = \frac{(n_{1,2}^2 - 1)(M_1x_1 + M_2x_2)}{(n_{1,2}^2 + 2)d_{1,2}}$$

В последнем уравнении M_1 и M_2 – молекулярные массы растворителя и растворенного вещества; $d_{1,2}$ и $n_{1,2}$ – плотность и показатель преломления раствора; x_1 и x_2 – молекулярные доли растворителя и растворенного вещества, которые вычисляются по формулам:

$$x_2 = \frac{q_2 / M_2}{q_2 / M_2 + q_1 / M_1}; \quad x_1 = 1 - x_2,$$

q_1 и q_2 – соответственно навески растворителя и растворенного вещества.

Плотность раствора определяют с помощью пикнометра, показатель преломления – с помощью рефрактометра.

Молекулярную рефракцию можно рассчитать и по данным для рефракций связей (табл 3.4).

Таблица 3.4

Рефракции связей

Связь	R	Связь	R
H – H	2,08	N – C	1,55
C – H	1,705	O – C	1,42
N – H	1,87	O = C	3,42
O – H	1,88	C – F	1,60
C – C	1,209	C – Cl	6,57
C = C	4,15	C – Br	9,47
C ≡ C	6,025	C – I	14,51

В этом случае молекулярная рефракция вычисляется как сумма рефракций связей. Так, для бензола молекулярная рефракция

$$R_{C_6H_6} = 6R_{C-H} + 3R_{C-C} + 3R_{C=C} = 6 \cdot 1,705 + 3 \cdot 1,209 + 3 \cdot 4,15 = 26,307.$$

По формуле, учитывающей атомные рефракции,

$$R_{C_6H_6} = 6R_H + 6R_C + 3\text{инкремента}_{C=C} = \\ = 6 \cdot 1,100 + 6 \cdot 2,418 + 3 \cdot 1,733 = 26,307$$

На зависимость показателя преломления от концентрации вещества

в растворе существенным образом влияет природа растворителя. Если взаимодействие между растворителем и растворенным веществом выражено слабо, зависимость n от концентрации раствора C носит приблизительно линейный характер. График зависимости n от C обычно находят эмпирическим путем.

6.3.2. Рефрактометры

Приборы, применяемые в рефрактометрическом анализе, называются рефрактометрами. Среди большого разнообразия конструкций рефрактометров можно выделить три группы приборов: типа Аббе, типа Пульфриха и погружные.

Рефрактометры типа Аббе. Характерным для рефрактометров этого типа (рис. 3.61) является наличие двухпризменного блока, состоящего из осветительной (1) и измерительной (2) призм, между которыми вводится исследуемая жидкость (5). Путем поворота призменного блока или зрительной трубы (3) добиваются, чтобы в ее поле зрения появилась граница света и тени. Изображенный на рисунке луч, выходящий с левого крайнего участка шероховатой поверхности осветительной призмы, падает на измерительную призму под углом α , немного меньшим 90° , так как слой жидкости имеет некоторую толщину.

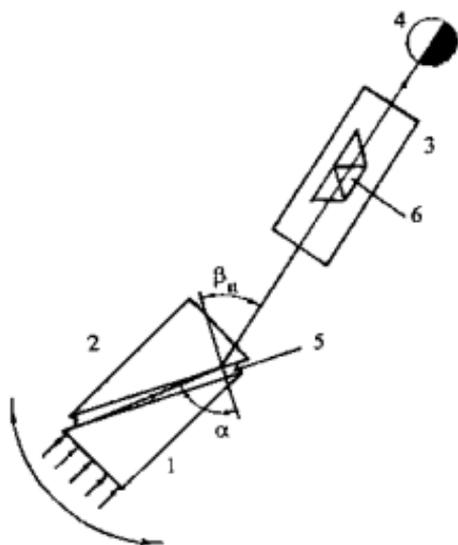


Рис. 3.61. Принципиальная схема рефрактометра типа Аббе (пояснения в тексте)

Поэтому угол β_n будет несколько меньшим, чем предельный угол преломления. Это расхождение невелико, и оно определяет погрешность прибора (приблизительно $\pm 2 \cdot 10^{-4}$).

Граница света и тени первоначально нечеткая и окрашена, поэтому вращением призмы Амичи (6) с помощью специального маховичка устраняют окрашенность границы и совмещают ее (границу) с перекрестием в поле зрения (4) трубы (3). Значение показателя преломления находят на соответствующей шкале в отсчетной системе прибора; величину средней дисперсии определяют по делениям шкалы маховичка, вращающего призмы Амичи. При проведении точных измерений призмы рефрактометра термостатируют, пропуская через их камеры воду, имеющую заданную температуру.

Рефрактометр типа Пульфриха. В отличие от рефрактометра типа Аббе имеет только одну призму – измерительную (рис. 3.62). На верхнюю грань – катет призмы (1) наклеивают цилиндрический стаканчик (2) с исследуемой жидкостью. Предельный угол преломления β_n определяют путем поворота зрительной трубы (3) до совмещения границы между светом и тенью с перекрестием прямых в поле зрения трубы. В связи с тем, что в этом рефрактометре можно получить угол падения строго равный 90° , величину показателя преломления находят с более высокой точностью – до $1 \pm 2 \cdot 10^{-5}$. Для получения такой точности используют монохроматический источник света (газоразрядная трубка или натриевая лампа) и набор призм из стекла с разным показателем преломления, термостатируемых с помощью водяной рубашки, подключаемой к жидкостному ультратермостату.

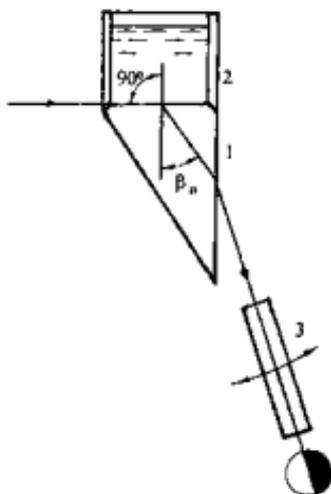


Рис. 3.62. Принципиальная схема рефрактометра типа Пульфриха (пояснения в тексте)

Погружной рефрактометр. Как и рефрактометр типа Пульфриха имеет одну призму (2) – измерительную, которую погружают в стаканчик с исследуемой жидкостью (1). Свет, отраженный от зеркала (3), имеет возможность скользить вдоль грани призмы, благодаря чему появляется луч с углом падения 90° . Граница света и тени при измерении останавливается на соответствующем делении шкалы (4) прибора и регистрируется глазом (рис 3.63).

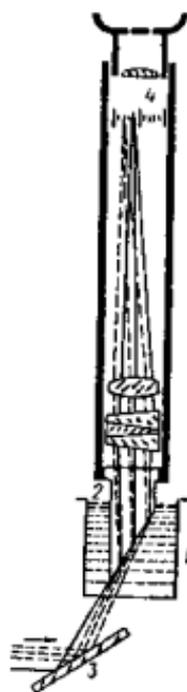


Рис. 3.63. Принципиальная схема погружного рефрактометра (по-яснения в тексте) [4]

Рефрактометр снабжен комплектом сменных призм, достигаемая точность измерения показателя преломления составляет $\pm 2 \cdot 10^{-5}$

Рефрактометрия и исследование микрообъектов. Явление преломления света используется при исследовании микроскопических объектов. Прежде всего следует отметить фазово-контрастную микроскопию, которая позволяет сделать видимыми «невидимые» объекты, обладающие такой же прозрачностью, как и среда, в которой они находятся. Однако луч, прошедший через среду, и луч, прошедший через микроскопируемый объект, будут иметь сдвиг по фазе, поскольку показатели преломления и соответственно скорости света в

этих двух оптических средах различаются между собой. Оптическая система микроскопа позволяет использовать явление интерференции, вызванное сдвигом фаз, благодаря чему появляется контраст, и прозрачный объект становится видимым.

При исследовании микроорганизмов определенный интерес представляет знание их показателя преломления, который зависит от физиологического состояния клетки. В частности, показатели преломления живых и мертвых клеток сильно различаются между собой. Один из способов измерения показателя преломления бактерий – иммерсионная рефрактометрия, которая основана на принципе определения равенства показателей преломления микроскопического объекта и иммерсионной среды. С этой целью исследуемые микроскопические объекты помещают на предметное стекло, заливают жидкостью с известным показателем преломления и покрывают покровным стеклом. Меняя показатель преломления иммерсионной жидкости, добиваются полного равенства показателей преломления объекта и среды. Последнее устанавливают при помощи фазово-контрастного микроскопа или его разновидности – аноптрального микроскопа. В этом микроскопе при равенстве показателей преломления среды и объекта изображение последнего оптически исчезает. Видимым остается лишь оптический эквивалент клеточной стенки в виде четкого светлого ободка. В качестве иммерсионной среды применяют водные растворы альбумина и водноглицериновые гели желатины.

Показатель преломления бактериальной суспензии в целом может быть определен с помощью обычного рефрактометра типа Аббе или Пульфриха. Способ основан на том, что резкая граница света и тени в поле зрения трубы наблюдается лишь в случае равенства показателей преломления частиц и дисперсионной среды, в которой они находятся. Точность определения показателя преломления микрообъектов при этом способе составляет $\pm 2 \cdot 10^{-4}$

Существуют и другие способы рефрактометрии микроскопических биообъектов.

6.3.3. Применение рефрактометрического анализа

Рефрактометрический метод позволяет решать широкий круг задач в области биохимии.

Прежде всего, с помощью рефрактометра определяют показатель преломления вещества, который является одной из его физических характеристик (констант).

Связь показателя преломления с концентрацией веществ в растворе позволяет осуществлять количественный анализ двухкомпонентных систем (растворитель+растворенное вещество). Более того, некоторые специализированные рефрактометры помимо шкалы показателей преломления имеют дополнительную шкалу концентрации вещества (обычно сахара).

Знание зависимости еще одного параметра, например весовой плотности от концентрации компонент, позволяет с помощью рефрактометра определить количественное содержание по отдельности каждого из двух растворенных веществ в трехкомпонентной системе.

Показатель преломления, будучи стабильным параметром вещества, позволяет определять степень его чистоты, а при получении его в чистом виде, например с помощью перегонки, устанавливать момент завершения очистки. Это тем более ценно, поскольку путем несложной процедуры удастся оценить наличие малого количества примесей на фоне основного вещества, что химическим путем сделать не всегда удастся.

С помощью двух параметров – показателя преломления и средней дисперсии – можно установить сходство исследуемого вещества с предполагаемым аналогом – чистым веществом (то есть осуществить идентификацию вещества). Более достоверной идентификация будет при использовании в качестве дополнительного теста молекулярной рефракции. Кроме того, для большей определенности полезно измерять несколько показателей преломления для разных длин волн.

Помимо идентификации вещества молекулярная рефракция играет важную роль в установлении его химической формулы.

Одной из важных особенностей рефрактометрического метода является безынерционность, что позволяет использовать его для анализа непрерывно меняющихся процессов. Для этой цели разработаны и применяются в производстве проточные рефрактометры.

При исследовании микроорганизмов рефрактометрический метод дает возможность получать информацию о содержании сухого вещества в клетке, отличить под микроскопом живую клетку от мертвой и т.д.

6.4. Поляриметрический анализ

6.4.1. Теоретические основы анализа

Электромагнитная волна (сюда относится и световая волна) характеризуется колебанием двух векторов: вектора электрической напряженности \mathbf{E} и вектора магнитной напряженности \mathbf{H} . Оба вектора колеблются во взаимно перпендикулярных плоскостях в одинаковых фазах.

Скорость распространения волны \mathbf{v} перпендикулярна к направлениям обоих векторов \mathbf{E} и \mathbf{H} (рис. 3.64), откуда следует, что электромагнитная волна поперечная.

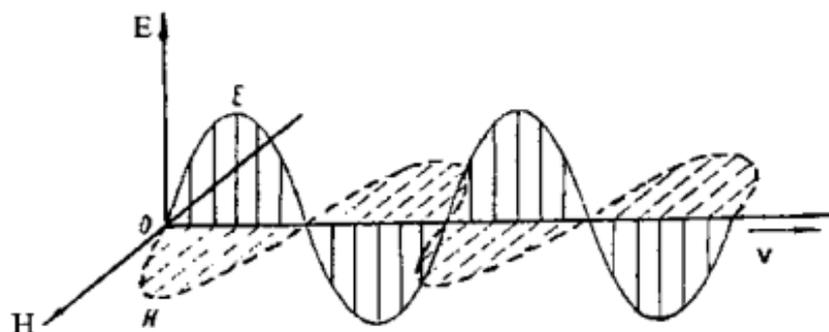


Рис. 3.64. Электромагнитная волна

Если вектор \mathbf{E} колеблется, сохраняя свое направление неизменным, то такая волна называется плоскополяризованной, а плоскость, проходящая через вектор \mathbf{E} и направление распространения волны, — плоскостью поляризации (иногда плоскостью поляризации называют ту, в которой колеблется вектор \mathbf{H}). В естественном свете колебания волн осуществляются в разных направлениях, он состоит из бесчисленного множества плоскополяризованных волн с равновероятным расположением плоскостей колебаний относительно направления распространения волны \mathbf{v} . Такой свет называется неполяризованным. С помощью специальных устройств из него можно выделить плоскополяризованный свет, колебания вектора \mathbf{E} которого совершаются в одной плоскости. Одно из них — призма Николя (сокращенно: николь). Она разделяет падающий на нее луч на два составляющих — обыкновенный и необыкновенный, плоскости поляризации которых ориентированы по отношению друг к другу под углом 90° . Обыкновенный луч выводится из николя, а необыкновенный проходит через вторую призму николя и используется в работе. Помимо призмы Николя роль поляризатора (дающего плоскополяризованный свет) могут выполнять устройства, основанные на использовании дихроизма — способности некоторых материалов пропускать свет, ориентированный в одной плоскости, и поглощать волны с другой ориентацией плоскости поляризации. К их числу относятся крис-

таллы турмалина, однако они обладают некоторой селективностью поглощения и для необыкновенного луча (выходящий из них свет окрашен в желто-зеленый цвет). Поэтому в качестве поляризаторов часто используют поляроиды – пленки прозрачного вещества, на которые нанесены тонким слоем определенным образом ориентированные микрокристаллы сильно дихроичного вещества, например йод-хинина, называемого герпатитом. Интервал длин волн, в котором можно с успехом применять поляроиды, захватывает всю видимую область спектра (от 400 до 800 нм). Степень поляризации достигает 98% (лишь 2% волн могут иметь иную плоскость поляризации). В ультрафиолетовой области могут работать призмы Николя из исландского шпата (кальцита – CaCO_3). Лучшей прозрачностью по отношению к УФ-лучам обладают призмы из кварца, хотя эффект двойного лучепреломления выражен у него менее резко, чем у кальцита. В качестве поляризаторов ИК-излучения обычно используются: стопка пластинок хлористого серебра, селеновых пленок или соляных пластин, напыленных селеном или германием.

Обыкновенный и необыкновенный луч, вышедшие из николя, не являются когерентными. Если же плоскополяризованный луч пропустить через николю, плоскость пропускания которого не совпадает с плоскостью поляризации луча (составляет с ней некоторый угол), то плоскополяризованный луч будет разложен на обыкновенный и необыкновенный лучи, которые являются когерентными, и после объединения с помощью другого поляризатора (совмещения их плоскостей поляризации) способны к интерференции. При разложении плоскополяризованного луча с помощью николя появляются два луча, один из которых (например, обыкновенный) повернут влево, а другой (соответственно необыкновенный) – вправо от плоскости исходного плоскополяризованного луча (за направление вращения плоскости поляризации принят поворот влево или вправо, то есть против и по часовой стрелке, если смотреть навстречу падающему лучу). Разложение амплитуды волны (вектора амплитуды напряженности \mathbf{E}) на право- и левоориентированные составляющие ($\mathbf{E}_\text{п}$ и $\mathbf{E}_\text{н}$) осуществляется по общему правилу разложения векторов, то есть путем проецирования вектора \mathbf{E} на расположенные под прямым углом плоскости пропускания (для необыкновенного луча) и отражения (для обыкновенного луча) призмы Николя. По правилу сложения векторов осуществляется и нахождение результирующего вектора в случае присутствия в луче двух когерентных волн, плоскости поляризации которых располагаются под углом друг к другу. В простейшем случае, если происходит наложение двух плоскополяризованных волн со взаимно перпендикулярными векторами, осуществляющими колебание в одной фазе, результирующий

вектор \mathbf{E} при движении вдоль направления скорости света \mathbf{v} будет образовывать плоскую поверхность, ориентированную под определенным углом к векторам \mathbf{E} составляющих лучей. Если же происходит наложение двух плоскополяризованных лучей, смещенных по фазе на угол θ , например, равный $\pi/2$ (то есть 90°), то конец результирующего вектора \mathbf{E} , двигаясь вдоль скорости света \mathbf{v} , будет описывать спираль, проекция которой на плоскость, перпендикулярную направлению \mathbf{v} , даст круг, если амплитуды \mathbf{E} составляющих плоскопараллельных лучей одинаковы, или эллипс, если они не одинаковы. В этом случае говорят, что свет поляризован по кругу или является эллиптически поляризованным (рис. 3.65).

Рассмотренные примеры позволяют объяснить механизм вращения плоскости поляризации света при прохождении его через анизотропные среды, к числу которых наряду с кристаллами относятся и жидкие вещества, содержащие молекулы с асимметричным атомом углерода (связанного с четырьмя разными радикалами). Такие вещества называют оптически активными. Анизотропию можно получить искусственным путем, поместив, например, в кювету с прозрачной оптически неактивной жидкостью заряженные пластины конденсатора (ячейка Керра) или поместив прозрачное тело между полюсами магнита (опыты Фарадея), а также с помощью механической деформации прозрачного изотропного тела (метод фотоупругости). Во всех этих случаях можно наблюдать вращение плоскости поляризации плоскополяризованного света.

При взаимодействии плоскополяризованного света с молекулой оптически активного вещества происходит «расщепление» луча на обыкновенный и необыкновенный, которые будут распространяться в этом веществе в одном и том же направлении, но с разными скоростями. Колебания их векторов \mathbf{E} будут происходить во взаимно перпендикулярных направлениях (плоскостях). Скорости распространения лучей будут равны c/n_o и c/n_e , где n_o и n_e – показатели преломления вещества для луча, отклонившегося от исходной плоскости поляризации соответственно вправо и влево, c – скорость света в воздухе. При прохождении плоскополяризованным светом пути l в оптически активном веществе между колебаниями обоих лучей возникнет разность фаз:

$$\Delta = \frac{2\pi l}{\lambda} (n_e - n_o),$$

где $\lambda = c/\nu$ – длина волны в пустоте (ν – частота колебаний, у обоих лучей она одинакова). Таким образом, оптически активное вещество осуществляет над плоскополяризованным светом два действия:

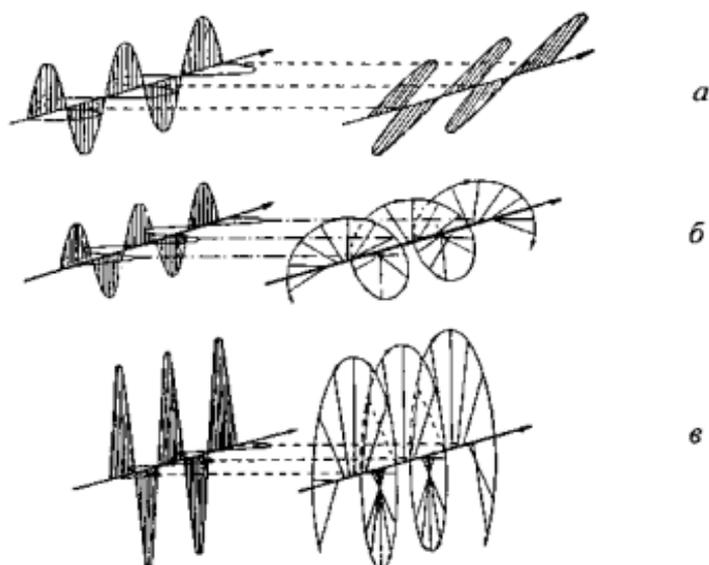


Рис. 3.65. Совместное действие двух синусоидальных взаимно-перпендикулярных колебаний равной частоты [34]: а) одинаковой амплитуды при разности фаз, равной нулю; б) одинаковой амплитуды при разности фаз, равной $\pi/2$ (свет поляризован по кругу); в) разной амплитуды при разности фаз, равной $\pi/2$ (эллиптически поляризованный свет)

расщепляет его на два когерентных луча и делает их скорости распространения неодинаковыми. Вращение же результирующего вектора \mathbf{E} и плоскости поляризации является следствием этих процессов и обусловлено появлением разности фаз Δ , которая с увеличением пути l возрастает. После выхода из оптически активного вещества длины волн обоих лучей станут одинаковыми, но сдвинутыми по фазе на величину Δ . Положение результирующей плоскости поляризации определяется путем сложения векторов \mathbf{E} обоих лучей, а в эксперименте находится с помощью анализатора, который по устройству сходен с призмой Николя и имеет возможность вращаться вдоль оси, совпадающей с направлением падающего на него светового луча. Легко показать, что максимальная яркость наблюдаемого через анализатор поля будет в том случае, когда плоскость, в которой располагается результирующий вектор \mathbf{E} , совпадает с плоскостью пропускания анализатора (будет обеспечено максимальное пропускание света через анализатор). Поворот анализатора в ту или другую сторону от этого положения ведет к ослаблению яркости прошедшего через него света.

Из формулы для нахождения разности фаз следует, что значение Δ зависит от длины волны λ и связанных с ней показателей преломления (n_o и n_e). В целом же угол вращения быстро возрастает с уменьшением длины волны. Метод, основанный на изучении зависимости угла вращения плоскополяризованного света от его длины волны, называют методом дисперсии оптической активности (ДОВ), а кривая, отражающая эту зависимость, – спектром ДОВ. Угол вращения плоскости поляризации для конкретного оптически активного соединения обычно дается в справочниках для определенной длины волны (обычно для линии D в спектре натрия: $\lambda_D = 589,3$ нм), температуры, в расчете на длину пути 1 дм и концентрацию 1 г/мл (применительно к растворам в определенном растворителе). Этот угол вращения называется *удельным вращением* и вычисляется по формуле: $[\alpha] = \alpha / lC$, где α – измеренный угол вращения (обычно дается в градусах), l – длина пути (дм), C – концентрация оптически активного вещества (г/мл). Зная значение $[\alpha]$ для исследуемого соединения, можно по замеренному углу α , исходя из последнего выражения, находить неизвестную концентрацию C . Зависимость угла α от концентрации раствора свидетельствует о том, что вращение плоскости поляризации, описываемое языком квантовой механики, по-видимому, представляет собой многоактный процесс, когда луч света при взаимодействии с оптически активной молекулой каждый раз поворачивает свою плоскость поляризации на определенный очень малый угол, который суммируется с уже имеющимся углом, а окончательное значение α будет прямо пропорционально числу провзаимодействовавших с лучом молекул, то есть произведению Cl . В этой связи следует напомнить, что и показатель преломления прямо пропорционален концентрации раствора (например, сахарозы).

Картина прохождения плоскополяризованного света через оптически активное вещество усложняется, если оно в исследуемом диапазоне длин волн поглощает свет, причем с разной интенсивностью обыкновенный и необыкновенный лучи (коэффициенты поглощения ϵ_o и ϵ_e неодинаковы). В этом случае значения напряженности (длины векторов) E_o и E_e , в отличие от непоглощающих свет оптически активных веществ, будут разными. Разницу значений молярных коэффициентов поглощения $\Delta\epsilon = \epsilon_e - \epsilon_o$ называют *круговым дихроизмом* (КД), который считают положительным, если $\Delta\epsilon > 0$, и отрицательным, если $\Delta\epsilon < 0$. В этом случае свет, прошедший через оптически активное вещество, будет эллиптически поляризованным. Обычно эту эллиптичность выражают не через $\Delta\epsilon$, а с помощью связанной с ней *молярной эллиптичности*:

$$[\theta] = M\theta/IC,$$

где M – молекулярная масса оптически активного вещества, l – длина пути (дм), C – концентрация (г/мл), θ – наблюдаемая эллиптичность для конкретной длины волны (в градусах). Кривая, показывающая зависимость эллиптичности от длины волны, называется кривой КД, или спектром КД. Эффект превращения плоскополяризованной волны в эллиптически поляризованную, обычно наблюдаемый вблизи полос поглощения оптически активного вещества, в литературе называют эффектом Коттона.

Все сказанное об изменениях вектора электрической напряженности E в раной мере относится и к неразрывно связанному с ней вектору магнитной напряженности H .

6.4.2. Аппаратура поляриметрического анализа

В простейшем случае, когда необходимо измерить лишь угол вращения плоскости поляризации, используют достаточно простой прибор – поляриметр, включающий в себя источник света, светофильтр, поляризатор, кювету (трубку) с исследуемым веществом и анализатор (рис.3.66).

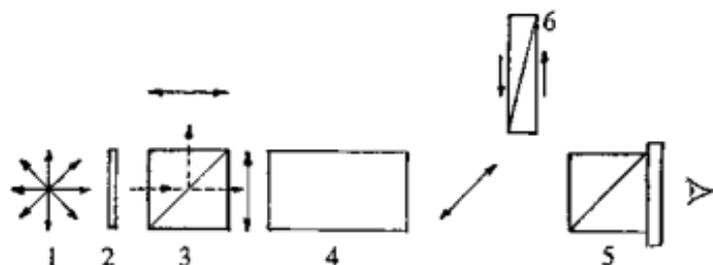


Рис. 3.66. Принципиальная схема поляриметра: 1 – источник естественного света; 2 – светофильтр; 3 – поляризатор; 4 – кювета с раствором; 5 – анализатор; 6 – клиновидной компенсатор. Двусторонними стрелками обозначены плоскости поляризации света

Свет от лампы накаливания проходит через желтый светофильтр (пропускает линию D в спектре натрия) и поступает на поляризатор. Плоскость поляризации анализатора предварительно устанавливают

совпадающей с плоскостью поляризатора. Плоскополяризованный луч, вышедший из поляризатора, после прохождения через кювету с оптически активной жидкостью изменяет положение своей плоскости поляризации. Вследствие этого через анализатор пройдет лишь часть светового потока (необыкновенная составляющая), поскольку обыкновенная составляющая уйдет в сторону. Чтобы на выходе из анализатора восстановилась прежняя освещенность, нужно его повернуть вокруг оптической оси поляриметра на угол, равный углу поворота плоскости поляризации вышедшего из кюветы луча. В этом случае плоскости анализатора и плоскополяризованного света вновь совпадут. Угол поворота анализатора находят на его угловой шкале. В ряде случаев анализатор делают неподвижным, а отклоненную оптически активной жидкостью плоскость поляризации возвращают в прежнее состояние (совмещают с плоскостью пропускания николя) с помощью клинового компенсатора (б, на рис. 3.66), который располагается между кюветой и анализатором. Компенсатор в простейшем случае (компенсатор Бабине) состоит из двух кварцевых клиньев со взаимно перпендикулярными оптическими осями (один клин вращает луч вправо, другой влево). При перемещении компенсатора в вертикальном направлении изменяется соотношение длин, проходимых светом через право- и левовращающие клинья компенсатора, а следовательно, и угол поворота плоскости поляризации луча, вышедшего из кюветы. После получения максимальной освещенности на выходе из анализатора находят на шкале компенсатора угол поворота плоскости поляризации. Клиновой компенсатор дает более точное значение угла, чем устройство с вращением анализатора. На практике чаще работают со «скрещенными» николями, когда плоскость пропускания анализатора настроена на темноту, то есть повернута на 90° по отношению к плоскости пропускания поляризатора. Более того, фотометрическое поле поляриметра состоит из трех частей, и при нахождении угла вращения луча необходимо добиться исчезновения границ в освещенности между этими частями поля, то есть сделать его равномерно освещенным, что повышает точность измерения.

Наряду с описанным визуальным поляриметром применяют и фотоэлектрические, у которых интенсивность освещения измеряют с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ).

В методах ДОВ и КД используется монохроматический свет, который получают с помощью монохроматоров, аналогичных применяемым в спектрофотометрах. Спектры ДОВ и КД регистрируются автоматически самописцем. В приборе для измерения КД с целью получения от одного источника право- и левополяризованных лучей применяют

электрооптический модулятор, использующий явление Керра (плоскополяризованный свет проходит через кристалл, к которому приложено переменное электрическое поле).

В целом же приборы для измерения ДОВ и КД представляют собой сложные устройства с автоматической обработкой информации.

Микромодификация поляриметрического анализа представлена поляризационными микроскопами.

Поляризационный микроскоп принципиально не отличается от обычного микроскопа, но снабжен некоторыми специальными оптическими деталями и принадлежностями (рис. 3.67). Между источником естественного света (электрической лампочкой) и конденсором установлен поляризатор, после прохождения которого свет становится линейно поляризованным (плоскополяризованным) и освещает объект. Над объектом установлен анализатор, плоскость пропускания которого перпендикулярна плоскости пропускания поляризатора. Поэтому в отсутствие объекта поле зрения микроскопа будет выглядеть темным. Если помещенный в микроскоп объект вносит хотя бы самые незначитель-

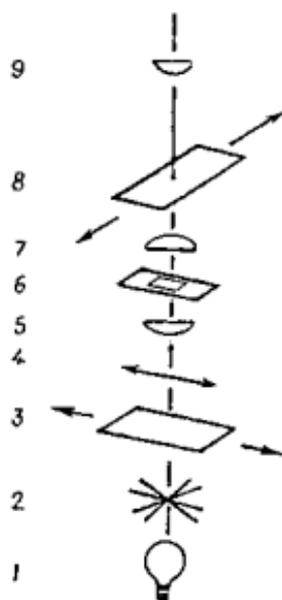


Рис. 3.67. Принципиальная схема поляризационного микроскопа [32]: 1 – источник света; 2 – неполяризованный свет; 3 – поляризатор; 4 – линейно поляризованный свет; 5 – конденсор; 6 – объект; 7 – объектив; 8 – поляризатор, скрещенный с первым (анализатор); 9 – окуляр

ные изменения в состоянии поляризации, то в прошедшем через него излучении будет обязательно присутствовать составляющая, лежащая в плоскости колебаний анализатора. В этом случае объект будет выглядеть ярким на темном фоне.

6.4.3. Применение поляриметрического анализа

Тривиальной задачей, решаемой с помощью поляриметрического анализа, является определение концентрации оптически активного вещества в растворе. Для этого предварительно строят калибровочный график зависимости угла вращения плоскости поляризации от концентрации исследуемого вещества в растворе, затем измеряют на поляриметре угол вращения для раствора с неизвестной концентрацией этого вещества и по калибровочному графику находят ее.

Другой важной областью приложения возможностей поляриметрического анализа в биохимии является исследование конформации биологических макромолекул: белков, полипептидов, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов.

Из опыта хорошо известно, что все белки и синтетические полипептиды вращают плоскость поляризации света, то есть являются оптически активными. Наблюдаемая оптическая активность состоит, как минимум, из двух компонент. Прежде всего, это сумма вкладов, вносимых асимметрическими α -углеродными атомами аминокислот. Поскольку все природные аминокислоты являются левовращающими, то и в полипептидной цепи α -углеродные атомы вращают *влево*. Поэтому любой полипептид, находящийся в форме беспорядочного клубка, будет обладать отрицательной оптической активностью.

Второй большой вклад в оптическое вращение белков и полипептидов вносит внутренняя асимметрия самой α -цепи. Полипептиды, построенные из L-аминокислот, образуют, вероятно, только правые спирали, которые будут вращать плоскость поляризации *вправо*. По абсолютной величине эти компоненты довольно близки друг к другу, поэтому в целом величина оптической активности полипептидной спирали приближается к нулю. Поэтому напрашивается мысль с помощью оптической активности оценивать степень спирализации компонентов. Однако было показано, что плоскость поляризации вправо вращают и β -структуры полипептидов. Поэтому поляриметрические данные должны быть дополнены результатами анализов, выполненных другими методами.

Молекулы нуклеиновых кислот также состоят из звеньев, обладающих оптической активностью. В видимой области спектра пуриновые основания дают отрицательное вращение, а пиримидиновые – близкое

по величине положительное вращение. Раствор одинаковых концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований оказывается почти неактивным. Такой же результат получают для полностью разупорядоченной (клубковой) конформации нуклеиновых кислот. Однако, как и для полипептидов, вторичная структура нуклеиновых кислот дает вполне заметное положительное вращение. Поэтому измерение вращения плоскости поляризации можно использовать для оценки степени спирализации нуклеиновых кислот при переходе из нативного состояния в денатурированное и наоборот. Правомерность такого подхода была подтверждена данными по параллельному изучению плавления ДНК, полученными методом оптической абсорбции в полосе поглощения 259 нм (гипохромный эффект – снижение оптической плотности при переходе из денатурированного состояния к нативному).

Поляриметрические методы (ДОВ, КД) при всей своей высокой информативности пока еще не позволяют установить точную структуру белка, хотя в случае нуклеиновых кислот дело обстоит несколько лучше. Для этого еще не создана теоретическая база, в связи с чем для интерпретации спектров КД их сравнивают со стандартными спектрами, полученными для структур с известным строением, определенным методом рентгеноструктурного анализа. Тем не менее, поляриметрические методы дают ценную информацию о всякого рода конформационных *изменениях* биомакромолекул, на которые они четко реагируют изменением вращения плоскости поляризации. Эти измерения часто проводят в УФ-области спектра. Так как при работе с биополимерами нередко приходится иметь дело с очень небольшими вращениями (до $0,005-0,010^\circ$), необходимо иметь хорошее компенсирующее устройство, позволяющее с соответствующей точностью измерять углы вращения. Одним из самых простых и наиболее точных компенсирующих устройств является ячейка Фарадея, питаемая постоянным током. В ней угол вращения плоскости поляризации определяется по силе тока в катушке электромагнита.

Поляризационный микроскоп делает видимыми оптически «пустые» (не обладающие контрастностью, прозрачные) объекты. Более того, поскольку эффективность вращения плоскостей поляризации разных составляющих белого света осветителя элементами биообъекта разная (дисперсия оптической активности), на выходе из анализатора микроскопа будет иное соотношение цветовых компонентов, благодаря чему наблюдаемый через окуляр объект будет выглядеть окрашенным.

Двойное лучепреломление биологических структур нередко складывается из двух величин – собственного двойного преломления, являющегося характеристикой вещества объекта, и текстурного двойного лу-

чепреломления, определяемого влиянием структуры. Оба вида двойного лучепреломления могут складываться или, наоборот, частично компенсироваться, когда они имеют противоположные знаки. Анализ с применением различных иммерсионных жидкостей позволяет разделить эти два фактора.

Как правило, величина двойного лучепреломления структурных единиц клетки очень мала и выявляется достаточно трудно. В связи с этим клетки и ткани в поляризационной микроскопии обрабатывают дихроичными (поглощающими один из поляризованных лучей сильнее, чем другой) красителями, молекулы которых ориентированы определенным образом, обладают сильным двойным лучепреломлением и дихроизмом. Поэтому исследуемые структуры хорошо различимы в поляризационном микроскопе. К таким объектам относятся митохондрии, волокна глии, растительные волокна, амилоид и др.

6.5. Люминесцентный анализ

6.5.1. Теоретические основы анализа

В основе люминесцентного анализа, связанного с решением как теоретических проблем биологии, так и прикладных задач медицины, сельского хозяйства и иных областей человеческой деятельности, лежит явление люминесценции. Под люминесценцией подразумевается так называемое *холодное* свечение тел, в отличие от температурного, при котором аналогичный по длине волны свет испускает тело, нагретое до очень высоких температур. В отличие от температурного излучения люминесценция является неравновесным процессом и продолжается относительно долгое время после прекращения действия внешнего возбуждающего фактора. В зависимости от природы последнего различают:

- фотолюминесценцию, основанную на свечении вещества при поглощении световой энергии;
- катодолюминесценцию, возбуждаемую электронным пучком («катодными лучами»);
 - радиолюминесценцию, вызываемую альфа-частицами;
- рентгенолюминесценцию, возникающую под действием рентгеновских лучей;
- электролюминесценцию, возбуждаемую электрическим полем;
- хемилюминесценцию, возникающую при протекании некоторых химических реакций (включает биолюминесценцию как хемилюминесценцию в живых объектах);

- трибололюминесценцию, возбуждаемую в некоторых материалах трением.

Используемые в биохимических исследованиях методы люминесцентного анализа основаны на явлении фотолюминесценции, поэтому при дальнейшем изложении для краткости мы фотолюминесценцию будем называть просто люминесценцией.

Существует условное деление люминесценции в зависимости от продолжительности свечения после прекращения возбуждения на флуоресценцию и фосфоресценцию. Если свечение практически мгновенно (через 10^{-6} - 10^{-10} с) прекращается после прекращения возбуждения, говорят о флуоресценции. Если же свечение после прекращения возбуждения протекает длительное время: часы, минуты, секунды или хотя бы заметные доли секунды (10^{-3} с), то такую люминесценцию обычно называют фосфоресценцией.

Подобно ряду авторов, под флуоресценцией мы будем подразумевать частный случай фотолюминесценции – характерное видимое свечение веществ под действием ультрафиолетового (невидимого) света.

Все люминесцирующие вещества называют *люминофорами*. Они по химическому составу бывают неорганическими и органическими. Неорганические люминофоры обычно имеют кристаллическую структуру и активирующие добавки. У них в процессах поглощения возбуждающей энергии и излучении принимают участие кристаллы в целом (свет испускает вся кристаллическая решетка), поэтому такие люминофоры называют кристаллофорами. У органических люминофоров поглощение энергии возбуждающего фактора (в нашем случае – света) и излучение протекают в пределах каждой способной люминесцировать молекулы. Из всех сложных органических молекул способны люминесцировать в растворах и парах только молекулы с более или менее развитыми системами сопряженных связей, то есть молекулы ароматические и гетероциклические, а также полиены. К этому классу веществ относятся все азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот, три важнейшие аминокислоты (триптофан, фенилаланин, тирозин), входящие в состав всех функционально важных белков, все коферменты, многие витамины и гормоны, наконец, пигменты, участвующие в преобразовании световой энергии (хлорофилл и зрительные пигменты), а также некоторые другие соединения биологической природы.

Упрощенно процесс возбуждения люминофора и возникновения люминесценции представлен на рис. 3.68.

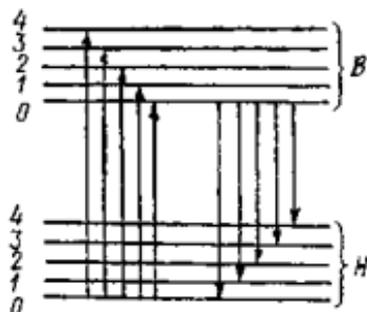


Рис. 3.68. Схема люминесценции молекул [4]

При возбуждении молекулы электроны с нормального уровня основного состояния H с подуровнями $0, 1, 2, 3, 4$ переходят на подуровни $0, 1, 2, 3, 4$ возбужденного состояния B . Этот процесс изображен стрелками, направленными вверх. Он связан с абсорбцией света. После этого за время $10^{-9}-10^{-8}$ с происходит перераспределение электронов по колебательным подуровням и излучение квантов света в результате переходов электронов с наиболее вероятного уровня B_0 на подуровни H_0, H_1, H_2, H_3 и H_4 , что на схеме обозначено стрелками, направленными вниз. Поскольку длины стрелок пропорциональны энергиям переходов, а следовательно, и частотам колебаний ($\Delta E = h\nu$), то из рассмотренной схемы следует, что длины волн спектра люминесценции обычно больше, чем спектра поглощения. Разница энергий поглощения и люминесценции превращается в тепло и диссипирует (рассеивается). В отличие от простых молекул в случае сложных молекул, к которым относятся названные выше биомолекулы, уровней колебательной энергии так много и они настолько близки один к другому, что сливаются в одну непрерывную полосу, имеющую универсальную для разных веществ форму, но свои максимумы поглощения и люминесценции. Универсальность формы спектров поглощения и люминесценции, на что обратил внимание еще в 1922 г. С.И. Вавилов, очень сильно ограничивает объем полезной информации, извлекаемой из изучения этих спектров, поскольку остается по существу единственный индивидуальный параметр, который можно получить из изучения спектров – значение длин волн, соответствующих максимумам поглощения и люминесценции. Даже идентификация того или иного вещества по спектру люминесценции возможна лишь в ограниченном числе случаев и всегда требует очень тщательного анализа всей химической и физической ситуации. При решении многих задач с помощью люминесцентного анализа обычно имеет значение не сам спектр, а его *изменение* в результате той или иной реакции или при протекании определенного биологического процесса.

Можно отметить ряд характерных особенностей спектра люминесценции. Во-первых, полоса люминесценции в целом и ее максимум смещены в длинноволновую сторону относительно полосы поглощения и ее максимума (правило Ломмеля). Во-вторых, спектры поглощения и люминесценции для довольно обширного ряда веществ зеркально подобны (симметричны) по отношению друг к другу (правило Левшина). В третьих, обычно полосы поглощения и люминесценции частично перекрываются (рис. 3.69). В четвертых, спектр люминесценции практически не зависит от длины волны возбуждающего света. Более того, он не зависит и от того, возбуждается ли люминесценция светом, ударом электронов или каким-нибудь иным способом.

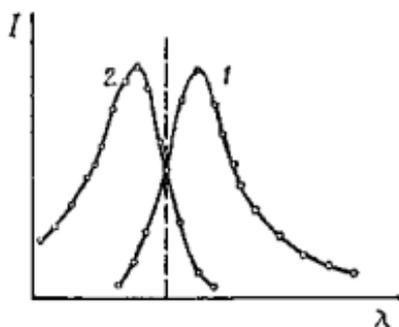


Рис. 3.69. Зеркальная симметрия спектров поглощения (1) и излучения (2)

Сдвиг спектра излучения в более длинноволновую область по сравнению со спектром возбуждения называется *стоксовым смещением*.

В области взаимного перекрытия спектров поглощения (возбуждения) и излучения (люминесценции) правило Стокса (смещение спектра излучения в более длинноволновую область) нарушается. В этом случае появляется *антистоксовская люминесценция*, при которой частота люминесценции выше частоты поглощения за счет тепловой энергии системы.

Обогащает люминесцентный анализ дополнительное использование (помимо длины волны максимального излучения) ряда параметров, характеризующих процесс люминесценции. Рассмотрим кратко их.

Энергетический выход люминесценции — отношение энергии, излученной веществом за некоторое время, к энергии, поглощенной им за это же время.

Квантовый выход люминесценции – отношение числа квантов, излучаемых системой в стационарном режиме за единицу времени, к числу квантов возбуждающего излучения, поглощенных системой за то же время.

Длительность люминесценции – естественная средняя длительность жизни возбужденных молекул. Обычно она составляет миллиардные доли секунды.

Кроме того, для люминесценции характерны процессы тушения, которые имеют разную природу и не всегда выясненный механизм. Среди основных видов тушения люминесценции, с которыми приходится часто сталкиваться исследователю, следует назвать концентрационное тушение, температурное тушение и тушение посторонними примесями (тушителями). В частности, концентрационное тушение придает особый характер кривой зависимости энергетического выхода люминесценции от концентрации люминесцирующего вещества. Выход люминесценции при малых количествах люминесцирующего вещества пропорционален его содержанию в растворе и может быть использован для количественного люминесцентного анализа. Однако с некоторого значения концентрации ее дальнейшее повышение начинает работать в противоположном направлении, то есть вести к ослаблению яркости люминесценции, и при достижении определенной концентрации (концентрационного барьера) наступает полное тушение люминесценции. Для большинства люминесцирующих веществ концентрационный барьер лежит в области 10^{-4} - 10^{-3} М. Явление концентрационного тушения обратимо, то есть при разбавлении концентрированных растворов свечение восстанавливается.

При повышении температуры обычно снижается энергетический выход люминесценции. К числу тушителей, проявляющих в наибольшей мере гасящее действие по отношению к ароматическим люминофорам, относятся газы – кислород и окись азота.

Излучение люминесцирующих растворов сложных органических молекул бывает частично поляризованным, что позволяет получать информацию о структуре этих молекул.

6.5.2. Аппаратура люминесцентного анализа

Наиболее часто в люминесцентном анализе для возбуждения свечения люминофора используется УФ-излучение. В качестве источников ультрафиолетового света обычно применяют ртутные и ртутно-кварцевые лампы. Действие их основано на электрическом разряде в парах ртути, возникающем при определенной разности потенциалов на

электродах лампы. В зависимости от величины давления паров ртути, возникающего при работе лампы, различают лампы низкого, высокого и сверхвысокого давления. Для люминесцентного анализа обычно применяют лампы высокого давления (марки ПРК-2, ПРК-4 и др.). При необходимости иметь ультрафиолетовый свет большой яркости применяют ртутно-кварцевые лампы сверхвысокого давления (марки ДРШ), действие которых основано на явлении газового дугового разряда. В простейшем случае с помощью специального светофильтра на кювету с испытуемым раствором подается УФ-компонента излучения источника света. Поскольку флуоресценция испускается во всех направлениях, ее обычно изучают под прямым углом по отношению к возбуждающему свету. Для количественной оценки яркости флуоресценции используют фотоэлементы или фотоэлектронные умножители (ФЭУ), так как интенсивность флуоресценции мала (рис. 3.70). Такие приборы называются флуориметрами.

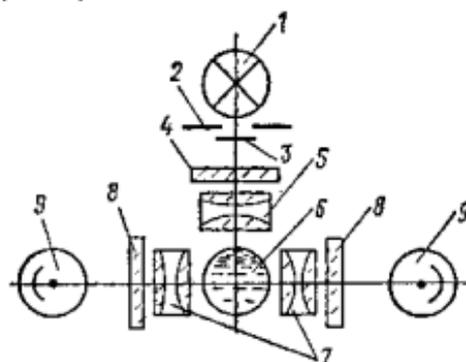


Рис. 3.70. *Схема электрофлуориметра ЭФ-3М: 1 – кварцевая лампа; 2 – диафрагма; 3 – заслонка; 4 – первичный фильтр; 5 – кварцевая оптика; 6 – пробирка с испытуемым раствором; 7 – кварцевая оптика; 8 – вторичные светофильтры; 9 – фотоэлементы*

Для более детального анализа флуоресценции вместо первичного и вторичного светофильтров (рис. 3.70) используют монохроматоры возбуждения и испускания; нередко в таких спектрофлуориметрах осуществляется автоматическая регистрация зависимости выходного сигнала детектора от длины волны испускаемого света либо зависимость выходного сигнала детектора при одной или нескольких длинах волн от длины волны возбуждающего света. В связи с тем, что чувствительность и величина выходного сигнала ФЭУ зависят от длины волны воспринимаемого света и при одной и той же его энергии сигнал будет

разным, для абсолютных измерений производят калибровку ФЭУ с помощью термоэлемента, способность которого измерять энергию падающего света не зависит от длины волны. По данным калибровки строят *исправленный* спектр флуоресценции.

Таким образом, спектрофлуориметр по конструкции сходен со спектрофотометром, отличаясь лишь тем, что измеряется интенсивность не прошедшего через раствор света, а флуоресценции, выходящей под прямым углом к нему.

Аналогичным образом обстоит дело и с прибором для измерения поляризации флуоресценции, который имеет те же устройства, что и спектрофлуориметр, но дополнительно содержит поляризатор (между монохроматором возбуждения и образцом) и анализатор (между монохроматором испускания и детектором), причем его плоскость пропускания настроена либо на пропускание плоскополяризованного света, либо на темноту (рис. 3.71).

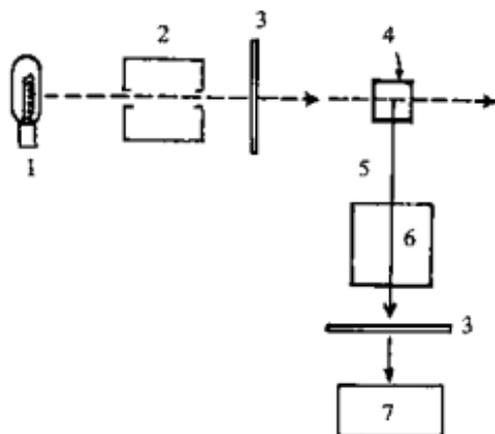


Рис. 3.71. *Схема экспериментальной установки для измерения поляризации флуоресценции [21]: 1 – источник света; 2 – монохроматор возбуждения; 3 – поляризатор и анализатор; 4 – кювета с образцом; 5 – испускаемый свет; 6 – монохроматор испускания; 7 – детектор (ФЭУ)*

В люминесцентном анализе широко применяются люминесцентные микроскопы, позволяющие производить исследования на уровне микрообъектов (клеток, органелл). Конструкции таких микроскопов можно разделить на три группы.

1. Люминесцентная микроскопия в сине-фиолетовом свете. Многие микрообъекты люминесцируют при возбуждении их сине-фиолетовым или ближайшим УФ-светом. В этом случае люминесцентная микроскопия существенно не отличается от обычных методов микроскопии. Если объект прозрачный, его изучают в проходящем свете; непрозрачные объекты освещают сверху (с помощью так называемого опак-иллюминатора). В качестве источника света применяют ртутно-кварцевую лампу сверхвысокого давления. Оптика микроскопа обычная (не кварцевая). Если исследуемый объект не способен люминесцировать, его окрашивают флуоресцирующими красителями (флуорохромами): акридином, теазолом, ксентаном, хинолином или их производными и др., которые способны практически почти все вещества превратить в люминесцирующие.

2. Люминесцентная микроскопия в УФ-свете. В этом случае возбуждение осуществляется УФ-светом с длиной волны короче 350 нм, что требует применения особых конструкций осветительных систем (кварцевых или зеркальных), удорожающих установку.

Микроскоп для наблюдения в простейших случаях может быть использован обычный. Число объектов, флуоресцирующих (светящихся видимым светом), значительно больше, чем при освещении сине-фиолетовым светом. Освещение также может осуществляться снизу или сверху. В качестве источника света используются кварцевые криптоновые лампы сверхвысокого давления.

3. Цветная абсорбционная микроскопия в невидимых лучах. В сущности, это абсорбционная микроскопия, позволяющая вести прижизненные биологические исследования. Объекты окрашиванию (флуорохромированию) не подвергаются. Вся оптика, включая микроскопическую, кварцевая. Люминесцирует не объект, а экран, на который проецируется изображение. Такую методику цветной абсорбционной микроскопии разработал отечественный ученый Е.М. Брумберг. Методика используется в двух вариантах – фотографическом и визуальном. Наблюдение объекта во втором варианте осуществляется следующим образом. Препарат освещается снизу неразложенным пучком УФ-света, например, в области от 350 до 200 нм. Перед окуляром микроскопа в плоскости, где расположено ахроматическое (бесцветное) изображение исследуемого объекта, устанавливается особой конструкции трехслойный люминесцирующий прозрачный экран. Он состоит из комбинации трех экранов в виде прозрачных окрашенных пленок агар-агара или желатина. Каждая из пленок флуоресцирует под действием различных участков длин волн своим цветом. Например, первая пленка люминесцирует синим цветом под действием только лучей области от

200 до 250 нм (а остальные пропускает), вторая – зеленым, поглощая лучи в диапазоне от 250 до 300 нм, третья – красным под действием лучей в диапазоне от 300 до 350 нм. Все три пленки склеиваются вместе. Под действием соответствующих УФ-лучей, прошедших через объект и ослабленных его отдельными деталями соответственно их избирательной поглощающей способности, экран будет люминесцировать и создавать многоцветное изображение объекта со всеми полутонами видимого цвета.

Люминесцентная микроскопия не ограничивается задачами визуального качественного анализа изображений микроскопических объектов. С помощью микроспектрофлуориметров, в состав которых помимо люминесцентного микроскопа обычно входят зондовая насадка, монохроматор, фотоэлектронный умножитель, самописец и другие блоки, осуществляется автоматическая регистрация спектра флуоресценции участка микрообъекта размером 1 мкм и менее. Возбуждение люминесценции осуществляется коротковолновым излучением дуговой лампы. Среди микроспектрофлуориметров можно назвать прибор, разработанный в НИИ биофизики (г. Пузино).

6.5.3. Области применения люминесцентного анализа

В теоретическом плане методы люминесцентного анализа помогают решать, прежде всего, задачи, связанные с изучением конформации биомолекул. Применительно к белкам, например, изменение интенсивности люминесценции свидетельствует об изменении окружения триптофана вследствие изменения конформации белковой молекулы, в частности при связывании фермента с субстратом, денатурации, изменении pH, температуры и т.д. В присутствии акридинового оранжевого одноцепочечные и двухцепочечные полинуклеотиды светятся разным цветом (красным и зеленым соответственно). Поляризационные изменения люминесценции происходят при существенном изменении объема молекулы или степени ее асимметрии, при переходе спираль-клубок в белках, ассоциации белковых молекул. Они помогают в исследовании ориентации хлорофилла в хлоропластах, ориентации ДНК в хромосомах. Метод нанесения флуоресцирующей метки на антитела, предложенный немецким ученым А. Кунсом, помог в изучении под микроскопом образования их комплексов с антигенами. Важна роль флуоресцентных красителей, так называемых зондов, в исследовании биологических мембран. По принципу применения флуоресцентные зонды делят на три большие группы:

1. Водорастворимые соединения типа цианиновых красителей и других ионных структур. Главная особенность этих зондов состоит в повышенной чувствительности к величинам мембранных потенциалов, к градиенту кислотности, существующему в клетке. Распределение этих зондов между материалом мембраны и окружающей ее водной средой смещено в сторону последней.

2. Гидрофобные зонды, которые растворимы преимущественно в липидной составляющей мембран. Параметры их флуоресценции (интенсивность, поляризация, время жизни) зависят от физических характеристик микроокружения зонда в мембране. Гидрофобные зонды представляют собой чувствительный инструмент для исследования внутреннего содержимого мембран.

3. Зонды, распределяющиеся между водной и мембранной фазами в измеримой пропорции. Они флуоресцируют лишь в связанном с мембраной состоянии и являются чувствительным индикатором на трансмембранный потенциал, транспорт через мембраны ионов, конформацию мембранных белков и т.д. Поэтому почти любые структурные изменения в мембранах, обусловленные действием химических или физических факторов, отражаются на изменении флуоресценции зондов этого типа.

Метод флуоресцентных зондов помогает в изучении функций мембран, связанных с переносом ионов и возникновением поверхностного потенциала; в исследовании физических свойств липидной составляющей мембран (фазовое состояние, изменение вязкости или содержания полярных молекул типа воды); в раскрытии белково-липидных взаимодействий при работе мембранных ферментных систем и т.д.

Серьезные задачи фундаментального и прикладного характера решает люминесцентный анализ в медицине (исследование физиологических процессов, контроль за поступлением и превращением лекарств в организме, диагностика многих заболеваний, в том числе онкологических и т.д.).

С помощью люминесцентного анализа оценивают качество пищевых продуктов, поскольку их окраска чутко реагирует на процессы, протекающие при хранении. Важную роль играет здесь биолюминесценция. «Сортовой» анализ (по С.И. Вавилову) позволяет быстро установить степень чистоты и фальсификацию пищевых продуктов животного и растительного происхождения, выявить наличие в них вредных микроорганизмов, в том числе болезнетворных, например бактерий рода сальмонеллы.

Люминесцентный анализ помогает оценить качество питьевой воды, обнаружить степень загрязнения элементов окружающей среды

вредными, особо опасными веществами, содержащимися даже в ничтожных концентрациях, в частности таким очень опасным канцерогенным ароматическим соединением, как 3,4-бензпирен, который содержится и в табачном дыме.

К числу тривиальных задач, решаемых с помощью люминесцентного анализа, относятся: определение концентрации люминесцирующих веществ в растворах, титрование с использованием люминесцентных индикаторов, обнаружение бесцветных веществ на тонкослойной хроматограмме (о чем говорилось ранее) и т.д.

Определение концентрации способных к свечению веществ осуществляют с помощью описанного выше флуориметра, построив предварительно калибровочный график для стандартных растворов (с известной концентрацией).

Следует отметить, что теоретические основы, раскрывающие связь различных параметров люминесценции со свойствами исследуемых объектов, как и в поляриметрии еще очень слабо разработаны, поэтому преимущественно используются эмпирически установленные закономерности. По мере теоретической проработки названных методов будут все более полно раскрываться заложенные в них возможности исследования структуры и функции биомолекул.

ГЛАВА СЕДЬМАЯ**РАДИОСПЕКТРОСКОПИЯ**

К радиоспектроскопии относится совокупность методов исследования вещества по спектрам поглощения их атомами, ионами и молекулами электромагнитных волн радиодиапазона. Это обстоятельство, а также общий квантово-механический характер процессов, лежащих в основе методов, роднят радиоспектроскопию с абсорбционным спектральным анализом. Однако имеются и существенные различия: поглощение радиоволн происходит по иному механизму и, как правило, в искусственно созданных для этого условиях.

Радиоспектроскопия позволяет получать информацию химического характера без разрушения молекул исследуемого вещества, хотя на него оказываются достаточно мощные физические воздействия. По этому критерию радиоспектроскопия занимает промежуточное положение между физико-химическими и физическими методами в принятой нами классификации.

К радиоспектроскопии относятся методы электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), ядерного магнитного резонанса (ЯМР), циклотронного резонанса и др. Наибольшее распространение в биохимических исследованиях получили методы ЭПР и ЯМР.

7.1. Электронный парамагнитный резонанс

Теоретические основы ЭПР. Явление электронного парамагнитного резонанса было открыто в 1944 году в Казанском госуниверситете Е.К. Завойским. Это открытие послужило основой для создания метода ЭПР, который используют при изучении структуры парамагнитных (способных намагничиваться во внешнем магнитном поле в направлении поля) частиц. К парамагнитным веществам (парамагнетикам), представляющим большой интерес для биологов, относятся свободные радикалы – кинетически независимые частицы (атомы или атомные группы), обладающие неспаренными электронами. К одновалентным радикалам, парамагнетизм которых обусловлен наличием одного неспаренного электрона, относятся атомы H, Na, Cl и др., а также радикалы OH, CH₃, NH₂ и др. Парамагнетизм двухвалент-

тных радикалов (например, атомов O, S и радикалов CH₂, NH) обусловлен наличием в них двух электронов с некомпенсированными магнитными моментами, а трехвалентных радикалов (например, атомов N, P и радикалов CH, CCl, SiH) – наличием трех электронов с некомпенсированными моментами. Помимо свободных радикалов, которые возникают в ходе биохимических реакций, при действии на биологические объекты ионизирующей радиации, в ходе фотосинтетических процессов, к парамагнитным частицам относятся ионы металлов переходной группы (Fe, Co, Ni, Cu, Mn), парамагнетизм которых обусловлен особенностями заполнения электронных оболочек, когда на некоторых орбиталях находятся неспаренные электроны.

Неспаренный электрон придает магнитные свойства всей частице за счет имеющихся у него орбитального и спинового магнитных моментов.

Движению электрона по орбите соответствуют орбитальный магнитный (μ_m) и механический (P) моменты:

$$\mu_m = -vRe/2; P = m\upsilon R,$$

где υ - скорость движения электрона;

R - радиус орбиты;

e - заряд электрона;

m - масса электрона.

Спиновый магнитный и механический моменты электрона связаны со спиновым движением электрона, которое можно представить как вращение электрона вокруг собственной оси.

Полный магнитный момент электрона равен векторной сумме орбитального и спинового моментов. Аналогичным образом обстоит дело и с полным механическим моментом электрона.

Отношение магнитного момента к механическому называется гиромангнитным отношением γ . Для орбитального и спинового движения значения γ соответственно равны $-e/2m$ и $-e/m$, - то есть спиновое гиромангнитное отношение в 2 раза превышает орбитальное. Орбитальный магнитный момент в большинстве случаев «погашен» электрическими полями, создаваемыми окружением неспаренного электрона, и не вносит существенного вклада в общий магнитный момент электрона. Поэтому при обсуждении принципа ЭПР обычно рассматривают только спиновый магнитный момент, а орбитальным – пренебрегают.

Метод ЭПР основан на взаимодействии магнитных моментов неспаренных электронов с внешним магнитным полем. В отсутствие внешнего магнитного поля магнитные моменты неспаренных элект-

ронов ориентированы хаотически. При наложении внешнего магнитного поля магнитные моменты свободных радикалов будут ориентироваться в этом поле. Величина энергии взаимодействия магнитного момента неспаренного электрона с внешним магнитным полем квантованная, в численном выражении прямо пропорциональна напряженности этого поля и очень мала (на порядки меньше средней энергии теплового движения молекул). Во внешнем магнитном поле магнитные моменты неспаренных электронов ориентируются как параллельно, так и антипараллельно его направлению. Если к системе, находящейся в магнитном поле, подвести высокочастотное излучение, то в ней начнут происходить переходы электронов между двумя состояниями (параллельным и антипараллельным). Однако для этого необходимо, чтобы энергия кванта подводимого излучения ($h\nu$) была равна энергии перехода (условие резонанса). В этом случае электроны, находившиеся на нижнем уровне (параллельное состояние), будут поглощать энергию высокочастотного излучения и переходить на верхний уровень, а электроны, находившиеся на верхнем уровне (антипараллельное состояние), испустив квант энергии, перейдут на нижний уровень. Вероятности одиночного перехода из нижнего состояния в верхнее и наоборот равны. Однако заселенность нижнего состояния выше, чем верхнего, поэтому количество переходов снизу вверх больше, чем сверху вниз, что ведет в целом к поглощению энергии образцом в условиях резонанса, которое регистрируется на экране осциллографа или на ленте самописца.

Спектрометры ЭПР. Предназначены для получения спектра ЭПР твердых или жидких образцов, обладающих парамагнитными свойствами. Основным (и наиболее массивным) устройством спектрометра является большой постоянный электромагнит, напряженность поля которого может изменяться в широких пределах путем изменения силы тока в его обмотке (рис. 4.1). В зазоре магнита располагается объемный резонатор, внутри которого помещается исследуемый образец. Объемный резонатор настраивается на частоту клистрона (источника излучения). Резонаторы являются аналогами колебательных контуров, которые накапливают энергию подводимых к ним колебаний, если частота колебаний соответствует резонансной частоте контура. Назначение резонатора состоит в концентрировании на образце энергии СВЧ-излучения, приходящего от клистрона по волноводам – металлическим трубкам определенного сечения, являющимся аналогами высокочастотных кабелей.

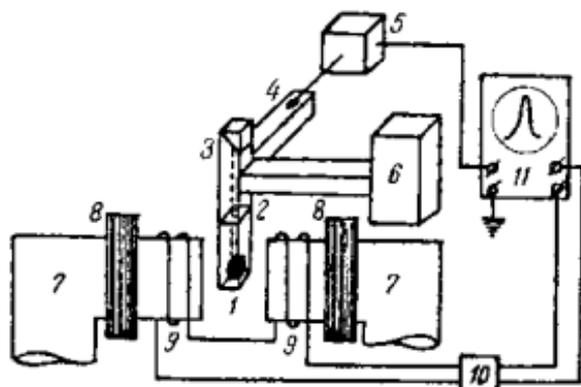


Рис. 4.1. Принципиальная схема спектрометра ЭПР [1]: 1 – образец парамагнитного вещества; 2 – объемный резонатор; 3 – двойной волноводный тройник; 4 – детектор; 5 – усилитель; 6 – источник излучения (клистрон, стабилизированный по частоте); 7 – полюсы магнита; 8 – катушки питания магнита; 9 – катушки, возбуждающие модулирующее магнитное поле; 10 – источник, осуществляющий модуляцию магнитного поля и развертку осциллографа; 11 – осциллограф

Если внутри резонатора находится образец парамагнитного вещества и частота клистрона совпадает с частотой парамагнитного резонанса, часть энергии электромагнитного поля поглощается образцом. Резонансное поглощение можно наблюдать, изменяя частоту электромагнитного излучения при постоянстве напряженности магнитного поля или напряженности магнитного поля при постоянстве частоты излучения. Из практических соображений применяют второй способ обнаружения резонансного поглощения. Вместо того, чтобы перестраивать частоту клистрона до появления парамагнитного резонанса, что потребовало бы одновременной перестройки объемного резонатора и высокочастотного тракта, в парамагнитных спектрометрах изменяют напряженность магнитного поля. Частота ЭПР ν (в МГц) связана с величиной напряженности магнитного поля H (в эрстедах) соотношением $\nu = 2,8H$. Так, получившие широкое распространение спектрометры X-диапазона работают на длине волны 3 см, которой соответствует частота 10 000 МГц. Отсюда следует, что для получения резонанса необходимо создать напряженность магнитного поля порядка 3570 эрстед. Для наблюдения спектральной линии поглощения на этой частоте устанавливают вычисленное таким образом значение напряженности магнитного

поля и накладывают на него небольшое модулирующее переменное магнитное поле с помощью небольшой катушки. Обычно это поле изменяется в пределах нескольких десятков эрстед. Если при этом осуществлять развертку осциллографа синхронно с изменением магнитного поля, то на экране осциллографа можно наблюдать спектральную линию парамагнитного резонанса (рис. 4.2).

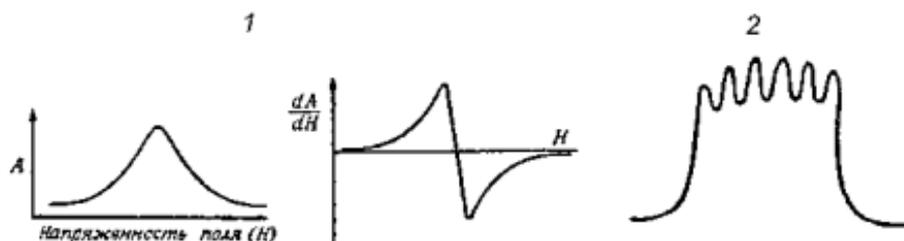


Рис. 4.2. Спектральная линия ЭПР [1]: 1 – одиночная линия; 2 – сверхтонкая структура

Для этого достаточно подать на осциллограф сигнал, пропорциональный мощности, поглощаемой образцом. При изменении напряженности магнитного поля поглощаемая энергия (A) будет возрастать до достижения резонанса и затем вновь убывать. Часто спектр ЭПР выражают в виде зависимости dA/dH от H . Если ядро атома или иона, для которого наблюдается ЭПР, обладает собственным магнитным моментом, то картина усложняется: резонансная линия приобретает сложную структуру, ее вершина распадается на ряд узких резонансных максимумов (так называемая сверхтонкая структура – СТС).

Наблюдение этой структуры позволяет легко определить значение спина исследуемого ядра, дает возможность для выяснения расположения атомов в молекуле. Площадь пика ЭПР зависит от концентрации неспаренных электронов в образце, которую можно определить, если предварительно снять спектр образца, содержащего неспаренные электроны известной концентрации.

Биологические образцы, как правило, содержат много воды, молекулы которой обладают большой величиной электрического дипольного момента, что ведет к сильному нерезонансному поглощению СВЧ-излучения и снижению чувствительности спектрометра. Чтобы ослабить влияние этого фактора, используют прямоугольные резонаторы и плоские тонкие кюветы (с внутренним зазором приблизительно 0,2 мм). Кроме того, снимают спектр ЭПР и с обезвоженных биологических образцов.

Применение метода ЭПР. Электронный парамагнитный резонанс широко используется при изучении металлоферментов, особенно содержащих молибден (ксантинооксидаза), медь (цитохромоксидаза) и железо (цитохромы, ферредоксин). Метод ЭПР позволяет исследовать роль этих металлов в работе многоферментных систем интактных митохондрий и хлоропластов, а также в модельных экспериментах с изолированными металлоферментами.

Метод ЭПР применяется также для исследования структурно-динамических свойств макромолекул и биомембран с помощью спиновых меток и зондов. Суть метода заключается в том, что в исследуемую систему вводят стабильный радикал, который ковалентно связывается с макромолекулой (спиновая метка) или удерживается в системе за счет физических взаимодействий (спиновый зонд). Спектр ЭПР этого стабильного радикала чувствителен к свойствам среды, в которую он внедрен. Так, пометив стабильным радикалом *нитроксидом* глицерофосфатиды, удалось исследовать их диффузию в мембранах, а также их «перескакивание» между наружной и внутренней поверхностями бислоя липидов.

Во многих важных биологических процессах существенную роль играют короткоживущие свободные радикалы, которые как и фермент-субстратные комплексы в кинетике ферментативных реакций невозможно выделить и исследовать традиционными методами. Метод ЭПР позволяет обнаружить короткоживущие свободные радикалы и установить их количественное содержание, поскольку обладает высокой чувствительностью (позволяет обнаружить в образце примерно 10^{10} парамагнитных частиц, а содержание свободных радикалов в различных тканях изменяется в пределах 10^{16} - 10^{18} на 1 г сухой массы).

Фотохимические процессы обычно сопровождаются появлением свободных радикалов в качестве промежуточных продуктов. Современные чувствительные спектрометры ЭПР позволяют регистрировать и идентифицировать эти промежуточные соединения непосредственно в резонаторе прибора при освещении.

Применение метода ЭПР позволило непосредственно детектировать появление свободнорадикальных семихинонных форм различных коферментов типа флавинов, хинонов и других в процессах аэробного и анаэробного окислительно-восстановительного катализа как в изолированных ферментных системах, так и в целых клетках и тканях, подтвердив высказанное в 30-х годах XX века предположение. Метод ЭПР нашел применение в исследованиях процессов транспорта электронов в митохондриях, строения и механизмов

окисления и восстановления коэнзима Q_{10} и других биологически важных соединений. Он позволил проследить путь неспаренного электрона на всех участках цепи электронного переноса от флавина до иона меди цитохромаксидазы, сделать существенные заключения о тонких деталях механизмов аэробного окисления и гликолиза, о роли воды в этих процессах.

Метод ЭПР широко применяется при изучении механизма действия ионизирующего излучения на биосистемы. С его помощью обнаружены и идентифицированы свободные радикалы и ион-радикалы, возникающие в целых клетках и тканях, в модельных экспериментах с препаратами аминокислот, пептидов, белков, нуклеиновых кислот и других соединений под действием радиации. Этот метод первым позволил подойти к решению вопроса о механизме действия защитных веществ, в частности серосодержащих соединений.

7.2. Ядерный магнитный резонанс

Теоретические основы ЯМР. С помощью метода ЯМР регистрируются атомы, ядра которых обладают магнитным моментом. К их числу, как правило, относятся атомы, содержащие нечетное число протонов. Наличие вращающегося неспаренного протона создает результирующий магнитный момент ядра, в состав которого входит этот протон. Будучи помещенным во внешнее постоянное магнитное поле, вектор магнитного момента совершает вращательное движение вокруг направления этого поля (прецессию), все время находясь под определенным углом θ по отношению к нему и описывая конус. Частота (угловая скорость) прецессии прямо пропорциональна напряженности магнитного поля. Эту частоту ω_0 называют частотой ларморовой прецессии. Прецессирующий магнитный момент, точнее, проекция его вектора на направление магнитного поля, может принимать только два альтернативных положения: совпадать с направлением магнитного поля или иметь противоположное ему направление. Второе (антипараллельное) расположение обладает большим запасом энергии, чем первое (параллельное), поэтому переориентация магнитного момента ядра из параллельного состояния в антипараллельное сопровождается поглощением электромагнитной энергии $\Delta E = 2\mu H_0$ (μ - магнитный момент ядра; H_0 - напряженность магнитного поля). Эта переориентация происходит по резонансному механизму под действием слабого электромагнитного поля, ориентированного под прямым углом к направлению внешнего магнитного поля. Когда частота электромагнитного поля сравнивается с ларморовой частотой, произойдет резонансный переход («переброс») ядра из параллель-

ной ориентации в антипараллельную, сопровождающийся поглощением энергии электромагнитного излучения.

Разница в населенностях верхнего (антипараллельного) и нижнего (параллельного) состояний для ЯМР очень мала и составляет при комнатной температуре приблизительно миллионную долю от общего числа ядер. Поэтому интенсивность поглощения в спектрах ЯМР мала по сравнению с ЭПР.

Магнитные моменты ядер существенно меньше магнитных моментов электронов (для ядра водорода – протона – примерно в 2000 раз). Поэтому резонансные частоты ядер находятся в более низкочастотной области (от 1 до 500 МГц).

В реальных веществах ядерный резонанс проявляется не при строго постоянной для каждого вещества частоте. Это связано с взаимным влиянием магнитных моментов ядер и орбитальных электронов, которые экранируют ядро. Вследствие этого напряженность измененного влиянием электронов магнитного поля у данного ядра будет отличаться от напряженности магнитного поля, действующего на образец. Следствием этого является и расхождение резонансных частот для одного и того же атома (например, водорода), входящего в состав разных молекул. Это расхождение называют *химическим сдвигом*; оно измеряется относительно стандартного вещества и оценивается в миллионных долях (м.д.) резонансной частоты.

Так, для CH_3 - и CH_2 - групп химический сдвиг мал. Расстояние между максимумами частот равно 98 Гц при резонансной частоте $\nu_0 = 4 \cdot 10^7$ Гц, то есть химический сдвиг $\delta = 98/4 \cdot 10^7 = 2,45 \cdot 10^{-6} = 2,45$ м.д. Химический сдвиг несет информацию о строении и межатомном (межмолекулярном) взаимодействии в веществе, благодаря чему представляет интерес для химиков (и биохимиков).

Спектрометры ЯМР. Принципиальная схема ЯМР-спектрометра сходна со схемой установки для наблюдения ЭПР. Различие, прежде всего, заключается в том, что частота ЯМР примерно 2000 раз меньше частоты ЭПР. Это связано с тем, что магнитный момент электрона, равный приблизительно $9,274 \cdot 10^{-24}$ Дж/Тл, почти в 2000 раз больше магнитного момента протона ($5,051 \cdot 10^{-27}$ Дж/Тл).

При проведении анализа ампула с веществом помещается в небольшую катушку индуктивности, которая подключена к генератору высокой частоты и создает высокочастотное поле. Катушка с веществом располагается между полюсами мощного электромагнита (весом 10^3 - 10^4 кг), создающего постоянное поле напряженностью 10^4 - 10^5 эрстед, причем оси катушки и электромагнита ориентированы под прямым углом друг к другу. Состояние резонанса добиваются изменением частоты колебаний в катушке или напряженности магнит-

ного поля. На приведенной схеме (рис. 4.3) использован второй вариант: на дополнительные (модулирующие) катушки от генератора развертки подается линейно изменяющееся напряжение, а частота, подаваемая на катушку с веществом, остается неизменной. При соответствующем напряжении на катушке модуляции (соответствующей результирующей напряженности внешнего магнитного поля) наступает резонанс, сопровождающийся поглощением веществом электромагнитной энергии, поступающей от генератора высокой частоты. Это поглощение сопровождается некоторым изменением напряжения в катушке, которое преобразуется приемником (5, на рис. 4.3) и в виде электрического сигнала подается к пластинам осциллографа, отклоняющим электронный луч по вертикали; горизонтальное отклонение луча осуществляет генератор магнитной развертки. В результате на экране осциллографа луч рисует кривую резонансного поглощения (спектр ЯМР).

Для получения хорошего отношения сигнала к шуму, искажающему истинное значение сигнала, необходимо много раз повторять развертку (получать много спектров) и усреднять данные. Недостатки этого медленного и неэффективного метода устраняются в Фурье-спектроскопии ЯМР, при котором возбуждение атомных ядер осуществляется коротким, но очень интенсивным радиочастотным импульсом при фиксированном значении напряженности магнитного поля. Сложная кривая спада индуцированного сигнала обрабатывается на ЭВМ.

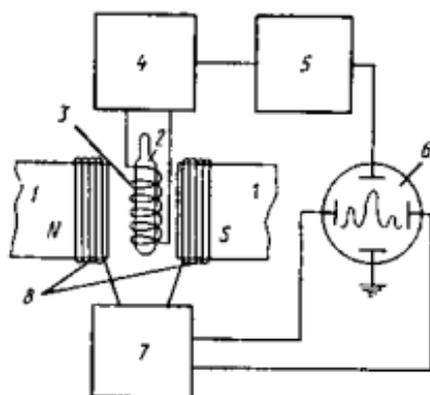


Рис. 4.3. Принципиальная схема ЯМР-спектрометра [2]: 1 – мощный электромагнит (обмотка на схеме не указана); 2 – ампула с веществом (образцом); 3 – катушка индуктивности; 4 – генератор высокой частоты; 5 – приемник (усилитель и детектор); 6 – осциллограф; 7 – генератор магнитной развертки; 8 – катушка модуляции

Фурье-спектроскопия ЯМР позволяет не только сократить время измерения в сотни и тысячи раз, но и дает возможность исследовать короткоживущие соединения.

Кроме того, существует метод, объединяющий ЭПР и ЯМР, – двойной электронно-ядерный резонанс (ДЭЯР), который является мощным инструментом для изучения структуры молекул.

Применение метода ЯМР. Полнота использования потенциальных возможностей, заложенных в методе ЯМР, зависит от разрешающей способности ЯМР-спектрометров и степени разработки теоретической базы, позволяющей адекватно интерпретировать ЯМР-спектры.

Наличие химического сдвига и таблиц химических сдвигов отдельных групп для многих природных соединений помогает в установлении химического строения относительно небольших молекул (приблизительно до 500 Да). Решение аналогичной задачи для биомакромолекул (белков, нуклеиновых кислот) в настоящее время не представляется возможным. Однако ЯМР позволяет фиксировать изменения в окружении ядра, которые часто оказываются связанными с изменением конформации биомакромолекулы. В частности, методом ЯМР могут быть зафиксированы переходы спираль-клубок, определен процент спирализации полипептидов и выявлена его зависимость от условий среды. Для полинуклеотидов и нуклеиновых кислот с помощью ЯМР удается установить наличие упорядоченной структуры и ее плавление.

Метод ЯМР широко используют для изучения состояния воды в разнообразных биологических объектах. По времени продольной и поперечной релаксации (восстановления равновесного состояния) легко идентифицировать в клетке воду, находящуюся в свободном или связанном состояниях.

ЯМР на ядрах изотопа ^{31}P применяют для исследования поведения фосфолипидов в модельных и природных мембранах. Этот метод имеет даже некоторое преимущество по сравнению с методом спиновых зондов, поскольку исследуются непосредственно молекулы фосфолипидов, а не характеристики спинового зонда в системе (своего рода изотопный индикатор с полуцелым спином ядра).

Метод ЯМР удобен при изучении кинетики изотопного обмена, например протонного, по изменению площади под пиками сигналов с течением времени.

Примечание. В методе ЯМР большое внимание уделяется влиянию внешнего магнитного поля (МП) на движение электронов внутри исследуемого вещества. В диамагнетиках, к которым принадлежат многие органические соединения, под дей-

ствием МП возникает диамагнитный момент. Он антипараллелен приложенному МП и ослабляет его, вызывая магнитное экранирование ядра исследуемого химического элемента, что в конечном счете ведет к химическому сдвигу на ЯМР-спектрограмме.

В этом отношении определенный интерес представляет внутримолекулярное экранирование бензольного кольца. В квантово-химической модели молекулы бензола все шесть атомов углерода связаны друг с другом σ -связями, которые находятся в одной плоскости. Каждый из углеродных атомов имеет, кроме того, по одному p -электрону. Они находятся на гантелеподобных орбиталях, оси которых расположены под прямыми углами к плоскости кольца. Каждый из этих p -электронов взаимодействует с p -электронами смежных углеродных атомов, поэтому все p -электроны распределяются симметрично вокруг кольца и могут перемещаться по нему в том или ином направлении. Если приложить к молекуле бензола МП, перпендикулярное плоскости кольца, «делокализованные» p -электроны будут двигаться в одном направлении, что вызовет заметный диамагнетизм. Это подтверждено экспериментально. Бензольное кольцо рассматривается как замкнутый сверхпроводник, в котором электроны движутся свободно, не испытывая сопротивления. Направление результирующего химического сдвига зависит от локализации ядра по отношению к атомам углерода кольца. Химический сдвиг такого типа называется сдвигом, обусловленным кольцевыми токами. Он наблюдается в случае ароматических аминокислот, пуринов, пиримидинов, порфиринов и флавинов, то есть соединений, содержащих бензольные кольца или гетероциклы.

Вместе с тем, бензольное кольцо (ядро) в первом приближении можно рассматривать как материальный кольцевой проводник с током, который определенным образом ориентирован во внешнем МП и способен совершать колебательные движения около этого равновесного положения, будучи выведенным из него. Собственная частота колебаний такого «витка с током» зависит от силы кольцевого тока, массы бензольного кольца и связанных с ним радикалов, напряженности внешнего МП и некоторых других факторов. Если бензоидное (содержащее бензольное кольцо) соединение поместить в рабочий объем ЯМР-спектрометра и создать резонансные условия для колебания бензольного кольца, то, по-видимому, можно получить характерный для конкретного бензоидного соединения спектр ЯМР. Аналогичным образом поведут себя в ЯМР-спектрометре химические соединения с гетероциклами, поскольку последние также имеют кольцевой ток.

Следует отметить, что соединения с бензольными кольцами и гетероциклами очень многообразны и играют чрезвычайно важную роль в функционировании биосистем.

В случае с химическими соединениями, содержащими бензольные кольца и гетероциклы, резонанс обусловлен собственными частотами целых молекул (или их фрагментов), что дает основание называть его молекулярным магнитным резонансом (ММР), а соответствующий прибор – ММР-спектрометром. Естественно, высказанное предположение нуждается в серьезной теоретической проработке и экспериментах, связанных, в частности, с установлением параметров такого резонанса (частоты возбуждающего колебания, напряженности МП).

Возможность существования ММР косвенно подтверждает обнаруженное нами неконтактное действие (НКД) ароматических соединений (содержащих бензольные кольца и гетероциклы) на биосистемы, включая ферменты. Эти соединения, будучи герметично улакованными, изменяют скорость протекания ферментативной реакции в сосуде, находящемся от них на расстоянии. Эффект прояв-

ляется при наличии геомагнитного поля (ГМП); внешнее постоянное МП усиливает эффект НКД, экранирование ГМП ведет к исчезновению НКД [22-24 и др.]. Это свидетельствует о достаточно большом магнитном моменте бензольного кольца и гетероциклов, а также о резонансном механизме поглощения ЭМИ, генерируемого молекулами ароматических соединений, соответствующими участками молекул ферментов. Более того, по нашему мнению, аналогичный механизм проявляется при лечебном воздействии широко используемого нормализатора В. Зорина (МЕДИВа), в состав которого входит комплекс экзотических природных соединений, подвергнутых специальной обработке. Не исключено, что она ведет к ароматизации природных соединений. При экранировании ГМП действие МЕДИВа на ферменты исчезает (наши эксперименты 2000 г.); чтобы вернуть его или усилить, необходимо использовать внешнее МП. Бензольные кольца и гетероциклы часто оказывают противоположное НКД на ферменты, поэтому не исключено, что изготовление корпуса МЕДИВа из полистирола снижает эффект действия природных компонентов (попутно следует отметить, что одноразовые полистирольные чашки Петри, в отличие от традиционных стеклянных, могут оказывать НКД на выращиваемые микроорганизмы). По-видимому, лечебное действие будут оказывать и чистые ароматические соединения (или их смеси), будучи герметично запакованными в корпус из нейтрального в отношении НКД материала, к тому же снабженного магнитом, что позволит получать лечебный эффект и в экранированных от ГМП помещениях.

ГЛАВА ВОСЬМАЯ

ЭМИССИОННЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

8.1. Теоретические основы метода

Эмиссионный спектральный анализ основан на изучении спектров испускания (эмиссии) атомов, ионов и молекул, находящихся в возбужденном состоянии. При эмиссионном спектральном анализе обычно используются спектры атомов и ионов. Излучающее вещество находится в свободном парообразном состоянии, поэтому спектры носят линейчатый характер. Поскольку в большинстве случаев для возбуждения спектров применяются температуры в тысячи - десятки тысяч градусов, подавляющее число молекул разрушается до атомов, и эмиссионный анализ несет информацию лишь об их элементном составе. Поэтому эмиссионный анализ иногда называют атомарным или элементным анализом. В редких случаях, когда при возбуждении молекул они не разрушаются, молекулярный спектр испускания является полосатым. Каждая полоса образована большим числом близко расположенных линий.

Структура линейчатого спектра однозначно связана с энергетической структурой электронных уровней (термов) атомов и ионов химических элементов. Сложное движение электрона можно представить как сумму трех простых: вращение электрона вокруг ядра по орбите,

вращение плоскости орбиты и вращение электрона вокруг своей оси. Каждое из этих трех вращательных движений характеризуется собственным квантовым числом. Внутренняя энергия атома зависит от всех трех движений, поэтому каждый энергетический уровень определяется тремя квантовыми числами.

Основной вклад в энергию атома вносит вращение электрона по орбите, которое характеризуется главным квантовым числом $n = 1, 2, 3, \dots$. Его значение только целое, положительное и говорит о том, сколько длин волн укладывается на орбите (образование стоячей волны является условием устойчивого, безизлучательного движения электрона вокруг ядра). Скорость вращения плоскости орбиты и ее форма (круг, эллипс) определяются орбитальным квантовым числом l , которое тоже целое, всегда меньше n и свой счет начинает с нуля. При движении по различным эллиптическим орбитам с одним и тем же квантовым числом электрон имеет одинаковую энергию, пока нет никаких возмущающих сил. В случае какой-нибудь возмущающей силы внешнего или внутриатомного происхождения эллиптические орбиты, соответствующие одной и той же энергии, но имеющие различное соотношение полуосей, будут возмущены различно, и это определенным образом сказывается на спектре. Вращение электрона вокруг своей оси (спин электрона) всегда происходит с постоянной скоростью. Направление вращения или совпадает с вращением электронов по орбите, или имеет противоположное направление. Энергия атома для этих двух случаев будет несколько различаться, что приводит к дальнейшему слабому расщеплению каждого терма на два. Разность энергии, соответствующей различным направлениям спина, равна одному кванту, а спиновое квантовое число может иметь два значения: $S = +1/2$ или $S = -1/2$.

Если поместить атом в сильное магнитное поле, то возникнут новые уровни. При вращении электрона вокруг ядра возникает магнитное поле (орбитальный магнитный момент), величина которого связана с орбитальным квантовым числом l . Магнитное поле атома может иметь только определенные направления относительно внешнего поля. Каждому положению соответствует определенное значение магнитного квантового числа m , возможные значения которого меняются от $+l$ до $-l$ с интервалом, равным единице. В этом случае энергия каждого простого уровня, который дальше нельзя расщепить, определяется четырьмя квантовыми числами: n, l, s, m . Различные сочетания квантовых чисел дают огромное количество энергетических уровней электронов, на которых они могут очень короткое время находиться. В зависимости от количества поглощенной энергии электрон может перейти на один из более высоких (дальше удаленных от ядра)

уровней, с которого вновь вернуться (сразу или через ряд более низких уровней) на прежний уровень. При фотолюминесценции переход электрона на более высокий уровень осуществляется за счет поглощения кванта света (фотона), а возвращение на прежний уровень происходит с задержкой и сопровождается испусканием кванта более длинноволнового света (холодное свечение). Испускание света в эмиссионном спектральном анализе, как правило, связано с предварительным поглощением атомом тепловой высокотемпературной энергии. При возбуждении атомов переход совершает обычно один из внешних электронов. Для его перевода на более высокий уровень необходимо передать атому вполне определенную энергию, которую обычно измеряют в электрон-вольтах и называют потенциалом возбуждения. В возбужденном состоянии атом находится около 10^{-8} с, после чего возвращается на более низкий уровень, излучая фотон с определенной энергией. Вариантов таких переходов много, число их растет с увеличением температуры возбуждения, поэтому эмиссионные спектры атомов и ионов содержат большое количество спектральных линий (различных длин волн), измеряемое для некоторых химических элементов тысячами (например, в спектре вольфрама или железа известно около 5000 линий).

Наименьшая энергия, необходимая для ионизации невозбужденного атома, называется потенциалом ионизации и измеряется тоже в электрон-вольтах. Потенциал ионизации больше, чем потенциал возбуждения любой спектральной линии в любом атоме. Ионы могут возбуждаться так же, как и нейтральные атомы, только у иона все линии смещены в коротковолновую область.

8.2. Аппаратура эмиссионного анализа

Приборы, применяемые в эмиссионном спектральном анализе, подразделяются на спектроскопы, спектрометры и спектрографы. Спектроскопы предназначены для визуального наблюдения спектра, спектрометры – для измерения оптических спектров с помощью фотоэлектрических приемников излучения, спектрографы – для регистрации всего спектра на фотопластинке или фотоэлектрическим способом (в частности, с помощью многоэлементного фотоприемника).

Принципиальная схема установки для эмиссионного спектрального анализа (рис. 4.4) включает в себя источник света и спектральный аппарат (спектроскоп, спектрометр или спектрограф). Основными элементами спектрального прибора являются: входная щель, устройство для разложения света и регистрирующее (измерительное) устройство [3].

Источники света. Служат для получения излучения с присущим данному веществу спектром. Роль источника света велика, поскольку он в значительной степени определяет характеристику всего спектрального анализа. При эмиссионном спектральном анализе проба вводится непосредственно в источник света, поэтому если она жидкая или твердая, вещество необходимо испарить, разрушить его молекулы до атомов или ионов, после чего возбудить их. Возбуждение частиц происходит при их соударении.

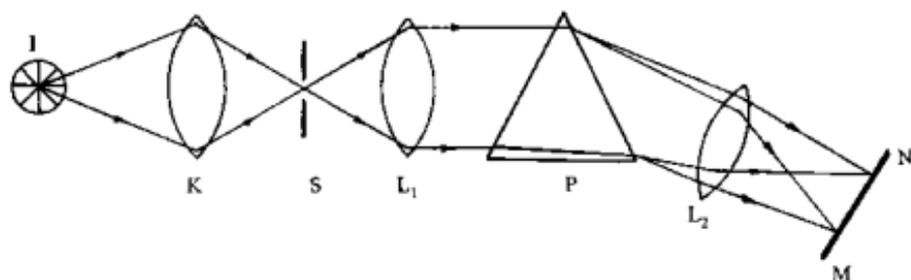


Рис. 4.4. Принципиальная схема установки для эмиссионного спектрального анализа: *I* – источник света; *K* – конденсорная линза; *S* – щель; *L₁* – объектив коллиматора; *P* – призма; *L₂* – объектив камеры; *MN* – матовое стекло (для наблюдения) или фотопластинка (для регистрации)

Если кинетическая энергия соударяющихся частиц меньше, чем потенциал возбуждения ближайшего энергетического уровня, то возбуждения не будет. Такое соударение называется упругим. Если же кинетическая энергия столкнувшихся частиц больше потенциала возбуждения, может произойти неупругое столкновение, при котором вся или часть кинетической энергии идет на увеличение внутренней энергии атома или иона. Неупругое столкновение приводит к возбуждению вещества и появлению линейчатого излучения или к ионизации нейтральных частиц. За время жизни атома в возбужденном состоянии ($\approx 10^{-8}$ с) он может столкнуться с другими частицами и передать им часть своей энергии или получить от них дополнительную энергию. В первом случае произойдет гашение излучения, во втором – дальнейшее возбуждение частицы и переход на более высокий уровень или ее ионизация.

Средняя кинетическая энергия частиц в газе

$$\bar{E} = kT,$$

где $k = 1,380 \cdot 10^{-18}$ эрг/град = $8,616 \cdot 10^{-5}$ эВ/град – константа Больцмана;
 T – абсолютная температура газа.

Например, при 27°C (300°K) средняя энергия одной частицы равна всего лишь $0,026$ эВ. Уровни возбуждения химических элементов измеряются десятными долями – единицами электрон-вольт, то есть требуют температуры на один – два порядка выше комнатной (выраженной в $^\circ\text{K}$).

Число излучаемых фотонов пропорционально числу атомов, находящихся в соответствующем возбужденном состоянии, а оно, помимо значения температуры, зависит от общего количества атомов данного элемента. При постоянной концентрации вещества в источнике света интенсивность (свечения) спектральной линии по мере увеличения температуры вначале быстро растет, а затем начинает уменьшаться. Рост связан с увеличением числа возбужденных молекул, уменьшение – с ионизацией и уменьшением числа нейтральных атомов. Каждая линия имеет наибольшую интенсивность при определенной температуре. При постоянной температуре в области малых концентраций вещества интенсивность спектральной линии линейно пропорциональна концентрации. При переходе к большим концентрациям рост интенсивности начинает отставать от увеличения концентрации, что объясняется самопоглощением света атомами вещества (рис. 4.5). Для относительно небольшого интервала концентраций соблюдается линейный характер между *логарифмами* интенсивности линии (I) и концентрации атомов (C):

$$\lg I = a + b \lg C,$$

где a и b – постоянные величины.

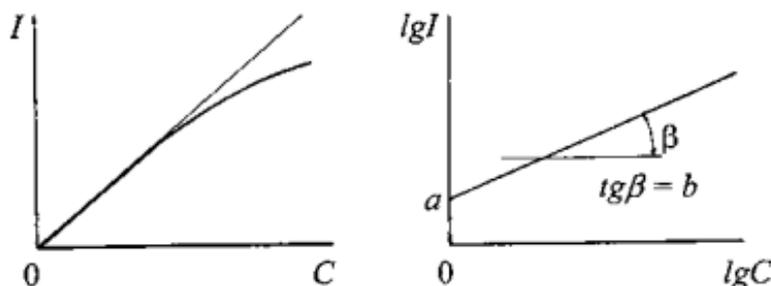


Рис. 4.5. Зависимость интенсивности спектральной линии от концентрации вещества: слева – в обычных, справа – в логарифмических координатах для относительно невысоких концентраций

Для возбуждения атомов и молекул в эмиссионном анализе применяют дуговой, искровой и газовый разряды, а также пламя.

Дуговой разряд дает сравнительно низкую температуру (4000- 8000°), он протекает при небольшом напряжении на электродах (25-80 вольт) и силе тока от 1-2 до нескольких десятков ампер. Electroды обычно располагают вертикально, горизонтальная дуга горит менее стабильно. Температура плазмы в дуге зависит от расстояния между электродами. Дуговой разряд можно питать как постоянным, так и переменным током, в последнем варианте стабильность дуги выше.

Благодаря высокой яркости дуги и энергичному испарению вещества, она обеспечивает высокую чувствительность при анализе всех элементов, кроме трудновозбудимых.

Искровой разряд позволяет увеличить температуру плазмы без повышения средней мощности источника света, поскольку, в отличие от непрерывного горения дуги, искровой разряд является прерывистым. Искра позволяет получать температуру в десятки тысяч градусов, поэтому искровой разряд применяется для анализа трудновозбудимых элементов. Электрическим током дуга питается от специального искрового генератора.

Газовый разряд при низком давлении (в отличие от дугового и искрового разрядов при атмосферном давлении) применяется для анализа смесей газов. Осуществляется в специальных разрядных трубках при низком (от 0,1 до нескольких десятков мм рт. ст.) давлении. К разрядной трубке, изготовленной из стекла или кварца, подводится постоянное или переменное (10^8 Гц и более) напряжение. Несмотря на невысокую температуру газа в трубке (немногим выше комнатной), интенсивность спектральных линий соответствует температуре в несколько десятков тысяч градусов.

Пламя было первым источником света при эмиссионном спектральном анализе. Окрашивание пламени при введении пробы использовалось для открытия ряда металлов.

Пламя образуется при горении многих газов (метана, пропана, ацетилен, водорода) в смеси с воздухом или кислородом. Пламя, применяемое для спектрального анализа, имеет температуру от 1900° до 3100°, хотя получено пламя с температурой до 5000°. Сгорание газа происходит в специальных горелках, изготовленных из кварца, стекла или металла. Из-за относительно низкой температуры пламени в нем возбуждаются и имеют большую интенсивность линии с низким потенциалом возбуждения, присущие обычно щелочным и щелочно-земельным элементам.

Введение анализируемого вещества. Эта процедура не менее

важна, чем способ возбуждения атомов. Она в большой мере зависит от агрегатного состояния анализируемого вещества. Как отмечалось выше, в высокотемпературном источнике света, например в электрической дуге, прежде всего происходит диспергирование (от латинского слова *dispergo* – *рассеиваю*) вещества до отдельных корпускул, которое осуществляется путем его испарения и является обязательным условием получения линейчатого спектра. Для твердой пробы испарению предшествует обычно плавление ее, жидкая проба сразу начинает испаряться, а газообразная не требует осуществления этих предварительных процессов. При высоких температурах происходит диссоциация (разрушение) молекул до отдельных атомов и возбуждение (и частичная ионизация) последних. Большинство соединений полностью диссоциирует уже при сравнительно невысоких температурах (2000-3000°), однако некоторые из них сохраняются в молекулярном или свободнорадикальном состояниях и при значительно более высоких температурах. В связи с этим концентрация свободных атомов может оказаться заниженной, особенно в низкотемпературных источниках света. Иногда концентрация атомов уменьшается вследствие протекания химических реакций в плазме, приводящих к образованию очень прочных молекул и радикалов. Например, в пламени практически не удастся определить алюминий, который образует прочные кислородные соединения, а концентрация свободных атомов становится незначительной. Эти негативные явления, а также твердые, неиспарившиеся кусочки пробы, раскаленные концы электродов, излучающие сплошной свет, создают фон, который понижает чувствительность метода. Ухудшает качество спектрального анализа и так называемое *самообращение*, которое наступает при прохождении света через остывшие пары вокруг источника света и связано с поглощением фотонов излучения невозбужденными атомами этой зоны. Степень выраженности этих негативных явлений во многом зависит от качества процедуры введения пробы в источник света.

Элементный состав металлических сплавов определяют преимущественно в технике. Для этого деталь или образец, состав которых исследуют, используют в качестве одного из электродов в искровом разряде.

В биохимических исследованиях часто используют пробы в виде не проводящего электрический ток вещества, которое получают путем минерализации биологического материала в относительно мягких условиях, исключающих улетучивание нужных компонентов при выполнении этого процесса. Одним из наиболее распространенных методов является испарение пробы из глубокой лунки в угольном или

графитовом электроде (обычно нижнем), куда помещают пробу (30-50 мг), часто смешанную с графитовым порошком. Большое распространение получило брикетирование пробы с металлическим (обычно медным) порошком при давлении порядка 2000 кг/см². Такой брикет используют в качестве нижнего электрода при дуговом разряде. В дугу порошкообразную пробу можно вводить способом просыпки, а в пламя – путем вдувания в него порошка.

Жидкие пробы (растворы) вводят в источник света путем их распыления (пульверизации). При работе с электрическими источниками света растворы применяют реже, чем в пламенной спектрофотометрии. Распылитель представляет собой пульверизатор, в котором сжатый воздух, проходя через капилляр, захватывает раствор исследуемого вещества. К этому воздуху подмешивается горючий газ, и полученная смесь поступает в микрогорелку.

Газовые пробы подаются через дозирующее устройство в предварительно вакуумированные газоразрядную трубку и подводящие к ней пути. Количество вводимых газов обычно дозируется по давлению в трубке.

Первым устройством спектрального аппарата, на которое падает луч от источника света, является *щель*. Она устанавливается в фокусе объектива, что позволяет получить параллельный пучок, падающий на диспергирующее устройство. Щель является весьма ответственной частью прибора. В спектрографах применяются симметричные щели, ширину которых с точностью до 1 мкм можно регулировать, не смещая центра щели. Щель образована двумя металлическими ножами, которые перемещаются в направляющих. Установка ширины щели осуществляется с помощью микрометрического винта. При выборе ширины щели находят компромисс между интенсивностью освещения (растет с увеличением щели) и разрешающей способностью по длине волны (растет с уменьшением щели).

Пройдя щель и объектив, свет падает на диспергирующее устройство, осуществляющее разложение света в спектр, то есть пространственное разделение лучей разных длин волн. Дисперсию света осуществляют с помощью призмы или дифракционной решетки.

Для изготовления *призмы* выбирают прозрачные материалы с наибольшей дисперсией в рабочей области. Обычно призмы изготавливают из кварца, так как приблизительно только 10% химических элементов имеют последние линии (такие, которые на спектрограмме последними исчезают при постепенном уменьшении концентрации данного элемента в пробе и поэтому являются наиболее чувствительными) в видимой области спектра. У остальных элементов пос-

ледние линии располагаются в УФ-области. Различные сорта стекла сильно поглощают свет в области длин волн короче 360–400 нм, а для кварца эта граница смещается на длины волн короче 185–190 нм. Наиболее распространена призма с преломляющим углом, близким к 60° , хотя существуют призмы с преломляющим углом 30° , у которых одна грань (большой катет) является отражающей, а также составные призмы.

Другим очень действенным устройством для разложения излучения в спектр являются **дифракционные решетки**. Они имеют ряд серьезных преимуществ по сравнению с призмами, в частности, возможность использования в тех областях оптического спектра, где нет прозрачных материалов для изготовления призм. Для этих целей применяют отражательные дифракционные решетки, которые нарезают на зеркальной поверхности. По принципу своего действия эти решетки не отличаются от прозрачных, но в них падающий пучок отражается от поверхности решетки и оба пучка оказываются с одной стороны от нее. Обычно изготавливают решетки, имеющие 600 или 1200 штрихов на миллиметре. Очень часто применяют вогнутые дифракционные решетки, нарезанные на сферической поверхности вогнутого зеркала с большим радиусом кривизны, которое не только разлагает свет, но и фокусирует его.

Регистрация спектров осуществляется фотографическим или фотоэлектрическим способами.

Фотографический способ основан на фотохимическом действии света на галоидные соли серебра, находящиеся в форме микрокристаллов в светочувствительном (эмульсионном) слое фотографического материала (пластинки или пленки). Образующееся после экспонирования фотоматериала скрытое изображение спектра после химической обработки (проявления и закрепления) становится видимым. Оно является негативным (обратным), так как освещенные при экспонировании участки (спектральные линии) будут выглядеть темными, а неосвещенные – светлыми (прозрачными). Зарегистрированный таким образом спектр в дальнейшем используется для проведения качественного и количественного анализа.

При фотоэлектрическом способе регистрации для измерения интенсивности спектральной линии нужно выделить ее, отграничить от остальной части спектра. Для этой цели в фокальной поверхности перед приемником света (фотоэлементом, болометром, фотоэлектронным умножителем – ФЭУ) располагают вторую – выходную щель. Такие устройства называются монохроматорами. Ширину щели, в зависимости от ширины спектральной линии, можно изменять. Помимо мо-

нохроматоров, с помощью которых осуществляется *последовательный* анализ спектральных линий, для *одновременного* анализа нескольких линий применяют полихроматоры, имеющие несколько выходных щелей и приемников света. Они могут одновременно зарегистрировать несколько линий в сложной по составу смеси (по одной характерной линии для каждого из интересующих химических элементов).

8.3. Применение спектрального анализа

В биохимических исследованиях эмиссионный анализ позволяет установить наличие интересующего исследователя химического элемента и определить количественное содержание его.

Качественный анализ ставит своей задачей определить, какие химические элементы входят в состав анализируемой пробы. При этом различают полный качественный анализ, когда необходимо установить, какие химические элементы имеются в пробе, и частичный, когда необходимо ответить лишь на вопрос о том, содержатся ли в ней заданные элементы или нет.

Полный качественный анализ сложной пробы трудоемок, частичный анализ выполняется значительно проще, быстрее и с меньшей затратой труда.

В основу качественного эмиссионного анализа положены различного рода таблицы спектральных линий элементов. В настоящее время такие таблицы включают данные практически о всех химических элементах, а число линий, приведенных в них, перевалило за 100 000. Кроме таблиц спектральных линий, имеются атласы, которые содержат отпечатки спектрограмм химически чистых элементов. Существуют также таблицы и атласы наиболее чувствительных (так называемых последних) линий. Значения длин волн в таблицах даются с точностью до сотых долей ангстрема. Чтобы безошибочно установить длину волны на полученной спектрограмме и выявить ее принадлежность к определенному химическому элементу, ее необходимо измерить с высокой точностью. Для этой цели используются специальные приспособления и приборы: измерительные лупы (цена деления 0,1 мм), измерительные микроскопы (цена деления 0,01 мм), горизонтальные компараторы (с точностью до 0,001 мм). Если спектр получен с помощью дифракционной решетки, длину волны можно рассчитать по формуле для дифракции. В тех случаях, когда требуется установить присутствие в анализируемой пробе линии какого-либо элемента, его спектр можно сфотографировать рядом со спектром пробы. Точное совпадение наиболее ярких линий в спектре этого элемента с ли-

ниями в спектре пробы является обычно достаточно надежным признаком присутствия в ней данного элемента. Для определения длин волн неизвестных спектральных линий в анализируемом спектре иногда пользуются интерполяционными формулами. Если спектр получен с применением дифракционной решетки, интерполяция будет линейной, если на приборе с призмой – необходимо пользоваться дисперсионными формулами Коши или Гартмана [4]. Можно построить для конкретного спектрального прибора экспериментальную дисперсионную кривую, то есть график зависимости линейной дисперсии от длины волны (линейная дисперсия $dl/d\lambda$ выражает, сколько долей миллиметра приходится на единицу длины волны; обычно на оси ординат откладывают обратную величину – ангстремы на миллиметр; с повышением длины волны эта обратная величина возрастает).

Для определения длины волны исследуемой пробы нередко используют *нормали* – элементы с точно известными длинами волн спектра. Их спектр снимают параллельно со спектром пробы. Часто в качестве нормалей используют спектр меди, а также закрытых источников линейчатого излучения – ртутной лампы, разрядных трубок с инертными газами.

Количественный анализ осуществляют путем сравнения яркости выбранной линии опытного образца и эталона, для которого известна концентрация элемента. В специальных приборах – стилометрах – относительную интенсивность измеряют ослаблением с помощью фотометрического клина более яркой из сравниваемых линий до тех пор, пока интенсивности линий не станут равны (визуальная фотометрия). При фотографической регистрации концентрацию химического элемента определяют на основании замера степени почернения спектральной линии, измеренной с помощью специальных приборов – микрофотометров. Фотопластинка со спектром помещается на столик микрофотометра; через интересующий участок спектра (спектральную линию) пропускают световой пучок, интенсивность которого на выходе определяется с помощью фотоэлемента и чувствительного гальванометра. По данным замера и предварительно построенному для стандартных (с известной концентрацией элемента) образцов калибровочному графику определяют неизвестную концентрацию химического элемента в исследуемом образце. При фотоэлектрической регистрации измеряют интенсивность светового потока, составляющего спектральную линию, после отделения его монохроматором от всего остального спектра. Преобразование светового потока в электрический сигнал, как отмечалось выше, осуществляют с помощью фотоэлемента, теплового приемника (болметра) или ФЭУ. На основании замера интенсивности свечения выбранной линии и

предварительно построенного калибровочного графика для эталонных образцов находят концентрацию химического элемента в анализируемой пробе.

Эмиссионный спектральный анализ отличается высокой чувствительностью. Для веществ, обнаруживаемых без особого труда, их количество в пробе находится в пределах 10^{-8} - 10^{-9} г. Поэтому с помощью этого вида анализа можно производить количественное определение химических элементов, содержащихся в малых количествах, прежде всего микроэлементов.

ГЛАВА ДЕВЯТАЯ

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ

Рентгеновские лучи представляют собой электромагнитные колебания с длиной волны в диапазоне 10^{-5} - 10^2 нм (10^{-4} - 10^3 ангстрем). Они были открыты немецким физиком-экспериментатором В.К. Рентгеном в 1895 г., а в 1912 г. другой немецкий физик М. Лауэ в опыте с дифракцией на кристалле доказал электромагнитную природу этих X-лучей.

При бомбардировке анода электронами, имеющими скорость, близкую к световой, возникает тормозное излучение, которое разлагается в сплошной спектр. Характер последнего не зависит от материала анода. Тормозное излучение возникает при резкой остановке электрона. Максимум излучения с увеличением скорости электрона (ускоряющего напряжения) сдвигается в сторону более коротких волн.

Помимо тормозного излучения возникает характеристическое рентгеновское излучение, имеющее характерный, зависящий от материала электрода, линейчатый спектр, который накладывается на сплошной спектр тормозного излучения. Испускание этого излучения выглядит следующим образом: интенсивным внешним воздействием (например, ударом внешнего быстрого электрона) один из внутренних электронов выбивается за пределы атома – атом ионизируется. У возникшего иона на одной из внутренних оболочек оказывается свободное место. Это свободное место может быть заполнено электроном с одной из соседних оболочек. Таким образом, возникают переходы между соседними внутренними оболочками, что и ведет к испусканию рентгеновских лучей. Следовательно, рентгеновский спектр, в отличие от оптического, обязан своим происхождением не валентным электронам, а внутренним. В соответствии с законом Г. Мозли (1913), корень квадратный из частот соответствующих характеристических линий явля-

ется линейной функцией порядкового номера элементов, то есть с увеличением порядкового номера элемента длина волны характеристических линий уменьшается.

Для исследовательских целей рентгеновские лучи используются в рентгеновской микроскопии, рентгеноспектральном, рентгенофазовом и рентгеноструктурном анализе. В теновом рентгеновском микроскопе объект (например, срез биологической ткани) располагается вблизи точечного источника рентгеновского излучения. Расходящийся пучок просвечивает объект и формирует на удаленной от него фотопленке увеличенное изображение. Рентгеноспектральный анализ применяют для количественного определения содержащегося в пробах элемента (начиная с магния). Рентгенофазовый анализ представляет собой метод качественного и количественного определения числа и соотношений кристаллических фаз в кристаллических смесях. Он основан на том, что каждая кристаллическая фаза дает индивидуальную картину расположения дифракционных колец и их интенсивностей. Дифракционная картина обычно регистрируется с использованием поликристаллического порошка с помощью счетчика рентгеновских квантов (дифрактометрически). Наибольшее значение в биохимических исследованиях имеет рентгеноструктурный анализ, который включает в себя совокупность методов исследования атомной структуры вещества с помощью дифракции рентгеновских лучей.

Теоретические основы и аппаратура рентгеноструктурного анализа. Рентгеноструктурный анализ основан на получении дифракционной картины от взаимодействия рентгеновского луча (длина волны от 0,07 до 1 нм) с кристаллом и расшифровке ее с целью получения информации о структуре кристаллов и молекул.

Для получения рентгеновских лучей используют рентгеновскую трубку, которая представляет собой стеклянный вакуумированный баллон с впаянными в него электродами – катодом с нитью накала и анодом (антикатодом). Электроны, испускаемые вследствие термоэлектронной эмиссии поверхностью катода, ускоряются в электрическом поле приложенного к электродам постоянного напряжения (несколько киловольт) и бомбардируют анод. Результатом такой бомбардировки является возникновение рентгеновского излучения, которое через специальное окно (трубка экранирована) выходит наружу. Окно обычно изготавливается из тонкой бериллиевой фольги, пропускающей излучение от 4 ангстрем и менее.

Первые дифракционные картины получил М. Лауэ, направляя узкий

пучок рентгеновских лучей через отверстие в свинцовом экране на кристалл. Рассеянный последним, луч давал дифракционную картину (набор дифракционных максимумов) на расположенной за ним фотопластинке (рис. 4.6).

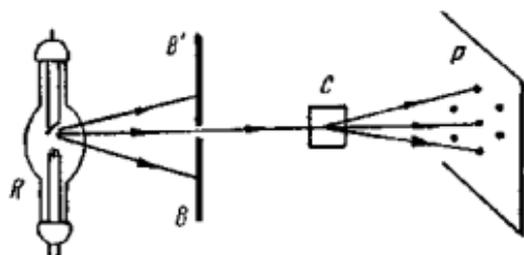


Рис. 4.6. Схема опыта по дифракции рентгеновских лучей: *R* – рентгеновская трубка; *BB'* – толстый свинцовый экран с отверстием; *C* – кристалл; *P* – фотопластинка [6]

Наблюдаемая дифракционная картина может быть использована для двух целей: для определения типа кристаллической решетки и расстояния между атомами и ионами (если длина волны рентгеновских лучей заранее известна) или для измерения длины волны рентгеновских лучей (если известны тип кристаллической решетки и расстояние между соседними атомами и ионами). Это стало возможным, прежде всего, после установления закона Вульфа-Бреггов. Если использовать рентгеновские лучи, длина волны которых соизмерима с межатомными (межионными) расстояниями в кристалле, то он будет играть роль дифракционной решетки. Луч 1, падающий под углом θ к одной из плоскостей кристалла, будет отражаться электронными оболочками атомов под таким же углом (рис. 4.7). Параллельный когерентный луч 2 в отраженном фронте будет сдвинут по фазе по отношению к лучу 1, поскольку прошел более длинный путь (на величину $2d \sin \theta$). Условию совпадения по фазе лучей 1 и 2 в плоскости отраженного фронта соответствует равенство:

$$2d \sin \theta = n\lambda,$$

где λ – длина волны, n – целое положительное число, d – расстояние между соседними плоскостями расположения атомов (постоянная решетки).

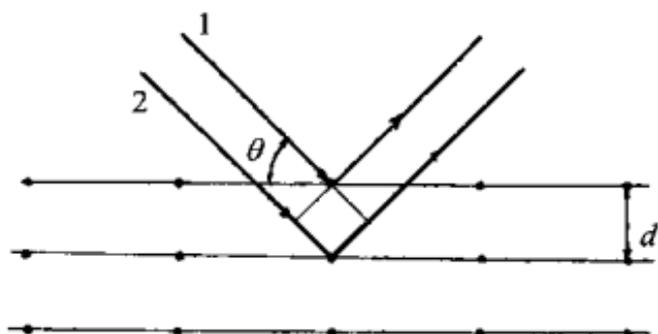


Рис. 4.7. Дифракция рентгеновских лучей от кристаллической решетки

На этом уравнении основано устройство рентгеновского спектрографа с вращающимся кристаллом (рис. 4.8).

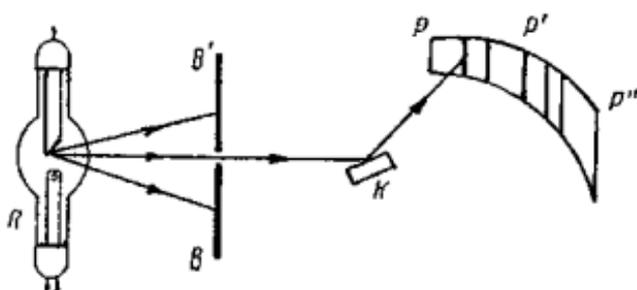


Рис. 4.8. Схема рентгеновского спектрографа с вращающимся кристаллом: *R* – рентгеновская трубка; *BB'* – свинцовая диафрагма с узкой щелью; *K* – кристалл; *PP'P''* – фотопленка

Узкий рентгеновский монохроматический пучок падает на кристалл и под определенным углом отражается на фотопленку, расположенную по окружности с центром, который лежит на оси вращения кристалла. При определенных углах θ , которым соответствует совпадение по фазе лучей, отраженных от соседних плоскостей расположения атомов, на фотопленке после проявления и закрепления появятся черные полосы (максимумы интенсивности пучка). Если известна длина волны рентгеновского излучения, по формуле может быть рассчитана постоянная кристаллической решетки. Изменяя ориентацию кристалла по отношению к пучку (установку кристалла на вра-

щающейся площадке), можно аналогичным образом найти другую постоянную решетки (расстояние между другими плоскостями расположения атомов).

В биохимических исследованиях обычно используют не монокристаллы (их трудно вырастить большими), а порошок из мелких кристаллов, запаянных в стеклянные капилляры, на дне которых находится капля маточного раствора. В методе порошков (Дебая - Шерера) такой поликристаллический образец помещают на пути узкого монохроматического рентгеновского луча. Вокруг образца по окружности размещают фотопленку (в кассете) так, чтобы падающий на него пучок пересекал ее по диаметру (рис. 4.9).

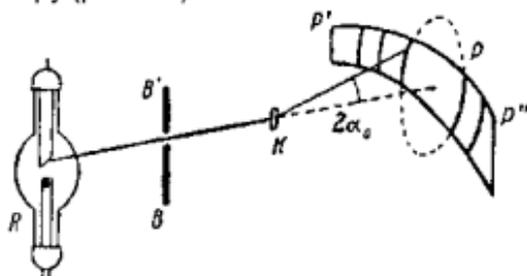


Рис. 4.9. Схема рентгеновской съемки методом поликристаллических порошков (Дебая - Шерера): *R* – рентгеновская трубка; *BB'* – диафрагма с узким отверстием; *K* – поликристаллический образец; *P'PP''* – фотопленка [6]

Поскольку в порошке имеются кристаллы любой ориентации по отношению к пучку, всегда найдутся такие кристаллы, положение которых отвечает условию максимума излучения в формуле Вульфа-Бреггов, что отразится на пленке в виде дуг, принадлежащих основанию конуса с соответствующим углом при вершине, равным $2\alpha_0$ (дебаеграмма). По полученным значениям этих углов можно рассчитать соответствующие межплоскостные расстояния в кристаллах.

В современных рентгеновских спектрометрах вместо фотографической регистрации дифракционной картины используют регистрацию с помощью счетчиков рентгеновских квантов. Такие приборы называются дифрактометрами. Счетчик синхронно с вращением кристалла перемещается по окружности так, что отраженный пучок всегда попадает во входное отверстие счетчика. Таким образом, дифрактометр регистрирует не только положение (момент появления) очередного максимума излучения, но и его интенсивность, которую в фотографическом способе измеряли на денситометре после химичес-

кой обработки пленки. Эти приборы не только приблизительно на порядок повышают точность измерений, но и более чем на порядок сокращают время измерения интенсивностей рефлексов (отраженных лучей). Более того, информация с дифрактометра в электрической форме может быть подана на ЭВМ, без которой не обходится в настоящее время расшифровка рентгенограмм.

Применение рентгеноструктурного анализа в биохимии. Макромолекулы, изучаемые молекулярной биологией (белки, нуклеиновые кислоты), в отличие от молекул субстратов и промежуточных продуктов обмена, при работе не расходуются и практически не изменяют свой химический состав. Их функционирование проявляется в изменении конформации – пространственном изменении положения отдельных частей макромолекулы. Конформация макромолекул очень изменчива, она реагирует на малейшие внешние воздействия. Нативная и денатурированная молекулы фермента, как правило, имеют одинаковый химический состав, но каталитическую активность проявляет фермент лишь в нативном состоянии. Поэтому очень важно знать не только первичную структуру макромолекулы, но и вторичную, третичную, четвертичную. Химический анализ может дать информацию об элементном составе молекулы, а также о характере и порядке связей между атомами в ней. Физико-химический анализ (в сочетании с химическим) позволяет установить первичную структуру макромолекул. Однако в настоящее время состояние теоретической базы молекулярной биологии не позволяет по данным о первичной структуре макромолекулы рассчитать (смоделировать) ее вторичную и третичную структуры, а электронный микроскоп – рассмотреть положение отдельных атомов в молекуле. Поэтому практически единственным путем, который дает возможность исследовать конформацию молекул, прежде всего макромолекул, является использование рентгеноструктурного анализа, а наиболее сложное в рентгеноструктурном анализе – расшифровка рентгенограмм, которая связана не только с чрезвычайно высокой трудоемкостью, но и с использованием солидного математического аппарата. Существуют специальные технологии расшифровки рентгенограмм, и одной из сложностей, которую успешно разрешил английский химик М. Перутц, являлась проблема фаз. Сама по себе рентгенограмма говорит только об амплитудах, но ничего не говорит о фазах полос. Отсутствует вторая половина информации, необходимой для получения пространственной структуры молекул. В 1953 году М. Перутц применил к белкам метод, разработанный кристаллографами для расшифровки фаз в случае известных структур. Метод состоит в том, что молекулу исследуемого вещества слегка изменяют, присоединяя к ней в определенных местах атомы тяжелых металлов (напри-

мер, ртути). Для полной определенности в молекулу вводят два атома металла. В частности, в случае с гемоглобином атомы ртути присоединяли к атомам серы в цистеине. Обязательным условием служит неизменность структуры молекул гемоглобина и их расположения в кристалле после присоединения атомов ртути. О трудоемкости расшифровки структуры говорит то, что с момента получения М. Перутцем первой рентгенограммы гемоглобина до установления им с сотрудниками структуры этой молекулы в 1959 году прошло 22 года. Трехмерная модель гемоглобина была установлена ими с относительно невысоким разрешением (5,5 ангстрема). Косвенную информацию об изменении конформации молекулы гемоглобина получил в 1937 году Ф. Гауровиц, работавший тогда в Праге. Он поставил в холодильник суспензию игольчатых кристаллов оксигемоглобина. Когда через несколько недель он вынул их оттуда, оказалось, что весь кислород был использован попавшими в суспензию бактериями, алые иголки превратились в шестиугольные темно-красные пластинки восстановленного гемоглобина. Пока Гауровиц рассматривал кристаллы под микроскопом, кислород, проникший под покровное стекло, вызвал растворение темно-красных пластинок и появление алых иголок оксигемоглобина. Наблюдение это привело Гауровица к выводу, что взаимодействие гемоглобина с кислородом должно сопровождаться изменением структуры молекулы гемоглобина. На основании данных рентгеноструктурного анализа Перутц установил молекулярный механизм, лежащий в основе изменения формы кристаллов гемоглобина, которое наблюдал Гауровиц. Дело в том, что две из четырех цепей молекулы способны сближаться и раздвигаться, так что промежуток между ними становится то уже – когда гемоглобин связан с кислородом, то шире – когда кислород освобождается. Гемоглобин оказался "дышащей" (по определению Перутца) молекулой, порядок работы которой заключается в том, что она расширяется, освобождая кислород, а не поглощая. Исследования Перутца показали, что каждая из четырех цепей гемоглобина по своей форме поразительно напоминает одиночную цепь миоглобина, структуру которой в 1957 году с помощью рентгеноструктурного анализа расшифровал английский биохимик Дж. Кендрию с сотрудниками. В 1962 году он совместно с Перутцем за эти работы получил Нобелевскую премию.

Позднее, в 1962 году Д.Филлипс с помощью рентгеноструктурного анализа получил изображение структуры открытого в 1922 году А. Флемингом фермента лизоцима. Изображение было установлено с малым разрешением (на основании примерно 400 дифракционных максимумов) и показало, что конфигурация полипептидной цепи (129 аминокислотных остатков) здесь еще сложнее, чем в миоглобине

(153 аминокислотных остатка). В 1965 году, после разработки более эффективных методов измерения и вычисления, был сделан расчет изображения на основании почти 10 000 дифракционных максимумов с разрешением деталей, разделенных расстоянием в 2 ангстрема. Уровень разрешения был достаточен для того, чтобы можно было ясно распознать многие группы атомов. Это исследование позволило построить модель, раскрывающую молекулярный механизм работы фермента лизоцима.

Рентгеноструктурный анализ сыграл большую роль в установлении в 1953 году Дж. Уотсоном, Ф. Криком и М. Уилкинсом вторичной структуры ДНК (двойной спирали).

В настоящее время с помощью рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением исследованы структуры сотен белковых молекул. Их рентгенограммы снимают обычно с использованием характеристического K_{α} -излучения меди с длиной волны 1,537 ангстрема.

Следует отметить, что в отличие от рентгеноструктурного анализа неорганических молекул, рентгенограммы нативных биомолекул (например, белков) приходится снимать в присутствии воды. Элементарная (повторяющаяся) ячейка кристаллов белка всегда в виде необходимого компонента содержит воду, которая может составлять от 30 до 60% веса содержимого ячейки. Помимо воды в элементарной ячейке могут находиться также ионы солей, молекулы органических растворителей, содержащиеся в маточном растворе, из которого происходила кристаллизация. Все это еще более усложняет и без того архисложную рентгенограмму, которую приходится расшифровывать.

ГЛАВА ДЕСЯТАЯ

МАСС-СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Теоретические основы и аппаратура. Масс-спектральный анализ основан на пространственном или временном разделении различающихся по массе и заряду предварительно ионизированных (ионизованных) молекул или их фрагментов (осколков). Масс-спектральный анализ осуществляется на специальных приборах – масс-спектрометрах.

В биохимических исследованиях наибольшее распространение получили масс-спектрометры, в основе работы которых лежит метод, предложенный английским физиком Ф. Астоном (лауреатом Нобелевской премии 1922 года). Масс-спектрометр состоит из ряда устройств,

последовательно выполняющих функции ионообразования; ускорения ионов и формирования ионного пучка; разделения ионов по массам; измерения интенсивности ионного пучка. Все эти процессы осуществляются в вакууме (10^{-7} – 10^{-4} мм рт. ст. или 10^{-5} – 10^{-2} Па). Исследуемое вещество обычно вводится в масс-спектрометр в виде газа (паров) через специальную систему напуска (натекатель). Образцы малолетучих веществ иногда помещают непосредственно в ионизационную камеру прибора, где происходит его испарение (прямой ввод). Молекулы газа подвергаются ионизации. Для этой цели обычно используется бомбардировка их электронами с регулируемой энергией в диапазоне 5–100 эВ. В зависимости от величины энергии бомбардирующих электронов может произойти ионизация молекулы или ее распад на положительно заряженные фрагменты разной массы. Наиболее вероятным является образование однозарядных положительных ионов. Многозарядные ионы образуются реже. Кроме электронной бомбардировки, вещество можно ионизовать, поместив его в сильное электрическое поле или облучив ультрафиолетовым светом.

Образующиеся молекулярные осколочные ионы ускоряются в электрическом поле и фокусируются, после чего попадают в масс-анализатор, который обычно состоит из электростатического и магнитного анализаторов. Окончательное пространственное разделение ионов в зависимости от соотношения их массы и заряда происходит в поле магнитного анализатора (рис. 4.10).

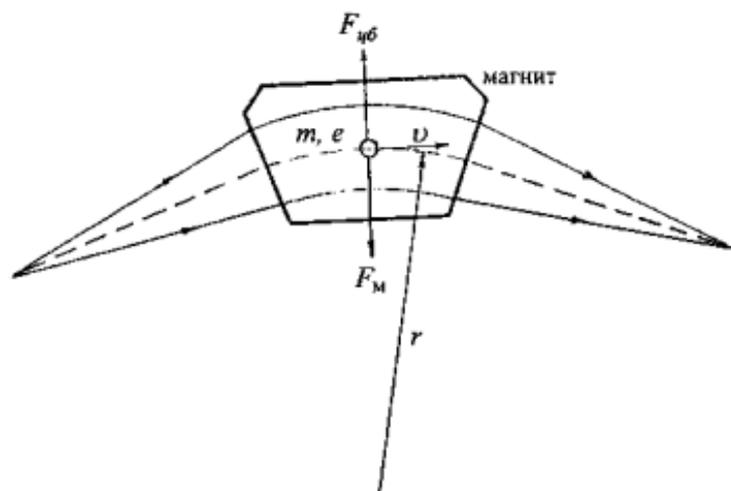


Рис. 4.10. Силы, действующие на ион в магнитном анализаторе

На ион действуют две противоположно направленные, равные по величине силы: магнитная (F_M) и центробежная ($F_{цб}$). Магнитная сила обусловлена действием магнитного поля анализатора на движущийся носитель заряда – ион. Она равна произведению напряженности H магнитного поля на заряд иона e и скорость его движения v : $F_M = Hev$. Эта сила зависит от заряда иона. Центробежная сила $F_{цб} = mv^2/r$, где m – масса иона, r – радиус кривизны траектории иона в зоне действия магнита. Она зависит от массы иона. Кинетическая энергия иона ($mv^2/2$) равна произведению его заряда на ускоряющее напряжение U в ионном источнике ($mv^2/2 = Ue$). Из приведенных трех уравнений при условии равенства сил F_M и $F_{цб}$ может быть найдено значение радиуса кривизны траектории:

$$r = \sqrt{2Um / H^2 e} = \sqrt{(2U / H^2)(m / e)}.$$

Таким образом, радиус кривизны при неизменных значениях H и U будет зависеть от обоих параметров (m и e), точнее, от отношения массы иона к его заряду (m/e): чем больше масса иона и меньше его заряд, тем выше траектория (больше r), и наоборот. Поскольку в большинстве случаев разделению подвергаются однозарядные ионы, радиусы кривизны их траекторий будут определяться только их массами. Если двигающиеся по разным траекториям ионы магнитного анализатора попадут на фотопластинку, как это сделал в своем масс-спектрографе Астон (рис. 4.11), то на ней после химической обработки проявятся темные участки, соответствующие каждому виду ионов (масс-спектрограмма).

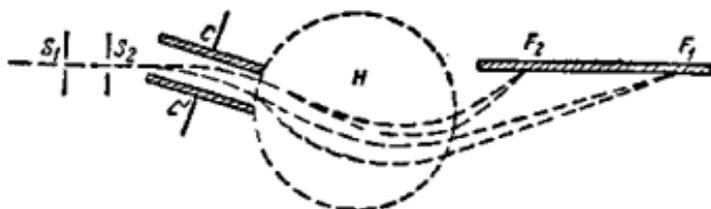


Рис. 4.11. Масс-спектрограф Астона [18]: S_1 и S_2 – диафрагмы; C и C_1 – параллельные пластины, к которым приложено определенное напряжение (электростатический анализатор); пунктиром обведена область, где действует магнитное поле с напряженностью H (магнитный анализатор); F и F_2 – места пересечения траекторий ионов с фотопластинкой

В современных масс-спектрометрах обычно ионный пучок регистрируется с помощью детектора (например, просто электрода – чаши

Фарадея). Для этой цели изменяется напряженность магнитного поля H анализатора, что позволяет поочередно направлять в щель детектора поток разных ионов. После усиления электрические сигналы поступают на регистратор (электронно-лучевую трубку или самописец). Упрощенная схема такого масс-спектрометра представлена на рис. 4.12.

Важной характеристикой масс-спектрометра является его разрешающая способность (сила). Она равна отношению массы m_1 иона к ее разнице с массой m_2 ближайшего отдельно регистрируемого иона: $m_1 / (m_1 - m_2)$. Для приборов третьего класса разрешающая способность принимается равной 1000, для второго класса – 10 000, для первого класса – 100 000 и выше.

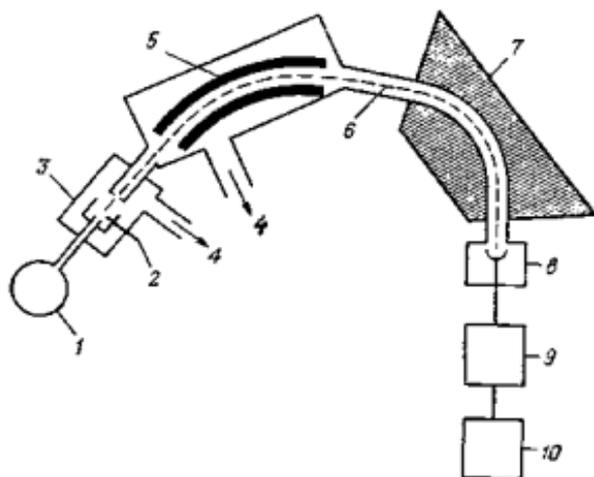


Рис. 4.12. Схема масс-спектрометра с детектором [7]: 1 – резервуар с парами образца или 2 – малолетучий образец; 3 – ионизационная камера; 4 – выход к вакуумному насосу; 5 – электростатический анализатор; 6 – траектория иона; 7 – магнитный анализатор; 8 – детектор; 9 – усилитель; 10 – самописец

Помимо рассмотренных масс-спектрометров статического типа используются масс-спектрометры динамического типа. Один из них – прямопролетный динамический, представляющий собой вакуумированную трубку, в которую в межэлектродное пространство порциями подаются ионы. Под действием ускоряющего напряжения U они приобретают скорости, соответствующие значениям m/e . Ионы, имеющие большую величину m/e , будут двигаться медленнее, и наоборот. По длине трубки ионы будут разделены пространственно,

а по моменту прихода на катод – по времени. Сигнал с катода подается на регистрирующее устройство (рис. 4.13).

Как и в статическом масс-спектрометре, полученная масс-спектрограмма будет представлять собой ряд пиков, разделенных интервалами. Площадь пика определяется величиной соответствующего ионного тока, то есть количеством ионов, поступающих в единицу времени на детектор (коллектор).

Применение масс-спектрального анализа. Большая часть выпускаемых промышленностью масс-спектрометров (ориентировочно три четверти) используется химиками-органиками (включая биохимиков). Впервые масс-спектрометрия в биохимии была применена как вспомогательное средство в изотопном методе для обнаружения стабильных изотопов. Обычно при изучении метаболических процессов в качестве метки используют радиоактивные изотопы, которые легко обнаружить с помощью радиометра. Однако для ряда важных биогенных элементов, в частности азота и кислорода, нет удобных для работы радиоактивных элементов. В связи с этим простые молекулы-предшественницы, поступающие в организм, метят стабильными изотопами: ^{15}N , ^{18}O и др. После соответствующей обработки биопробы, в состав которой в результате метаболизма вошел стабильный изотоп, с помощью масс-спектрометра определяют его количественное содержание на фоне основного изотопа (например, ^{15}N на фоне ^{14}N). Этот метод более сложен, чем радиометрический, но у исследователя в данной ситуации нет иного выхода.

Масс-спектрометрия используется и для определения структуры молекул. Расшифровку масс-спектра обычно начинают с установления химического состава всех наблюдаемых ионов. После этого определяют их молекулярных предшественников, то есть устанавливают, является ли тот или иной ион молекулярным или осколочным. При решении этой задачи снимают зависимости интенсивностей ионных токов от энергии ионизирующих (бомбардирующих) электронов (кривые эффективности ионизации), с помощью которых можно определить потенциалы появления регистрируемых ионов. Сравнение этих потенциалов с табличными потенциалами ионизации атомов и молекул дает возможность установить природу появления ионов (находящихся в газообразном состоянии), и выявить их молекулярных предшественников.

В более простом случае с помощью полученного масс-спектра можно выполнить качественный анализ вещества (идентификацию) путем сравнения с имеющимися спектрами.

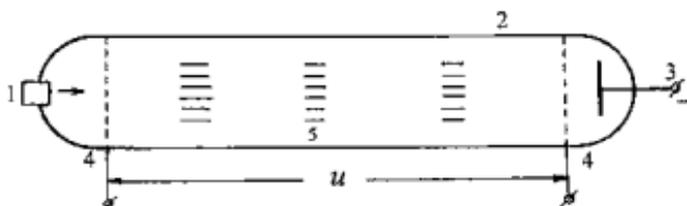


Рис. 4.13. Принципиальная схема работы прямопролетного динамического масс-спектрометра: 1 источник ионов; 2 - стеклянная трубка; 3 катод; 4 - ускоряющие электроды; 5 - движущиеся зоны ионов

В настоящее время масс-спектрометры, подобно секвенаторам в хроматографии, позволяют установить первичную структуру олигопептидов (последовательность аминокислотных остатков). Олигопептиды, полученные путем гидролиза белков, для повышения летучести ацетилируют и метилируют. При бомбардировке их электронами происходит расщепление пептидных связей с С-конца. Поскольку все отщепляемые аминокислоты имеют разные массы, их удастся идентифицировать в порядке появления на масс-спектрометре.

В связи с высокой чувствительностью масс-спектрометрии (10^{-7} г) ее применяют в сочетании с газовой хроматографией для установления химической природы выходящих из колонки фракций (хромато-масс-спектрометрический метод анализа). Для этого во время работы колонки непрерывно в масс-спектрометр подается небольшая часть выходящего газа, которая при одном или нескольких напряжениях подвергается ионизации, после чего ионы разделяются на магнитном анализаторе. Полученные масс-спектры затем анализируются на предмет идентификации выходящих из колонки фракций.

ГЛАВА ОДИННАДЦАТАЯ

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

11.1. Теоретические основы электронной микроскопии

Электронная микроскопия, как и световая, позволяет получить увеличенное изображение микроскопических объектов. Благодаря этому она решает в целом общие со световой микроскопией задачи, но преимущественно на ином, более низком структурном уровне. Электронная микроскопия позволяет изучать тонкое строение суб-

клеточных структур, а также получить визуальную информацию о форме и строении макромолекул. В отличие от рентгеноструктурного анализа, в электронной микроскопии наблюдаемая картина предстает не в «закодированном» виде, требующем трудоемкой расшифровки, а в привычной для зрительного восприятия и доступной для непосредственного анализа форме.

Электронный микроскоп, как и световой, увеличивает угол зрения, под которым наблюдателем рассматривается объект. Это увеличение у электронного микроскопа на порядки выше, чем у светового. Однако не в этом заключается основное достоинство электронного микроскопа, он одновременно повышает и разрешающую способность. Разрешающая способность (разрешение) – это то наименьшее расстояние, на котором две близлежащие точки объекта еще воспринимаются отдельно. Разрешение оптического прибора, в том числе микроскопа, ограничивается явлением дифракции и теоретически составляет примерно половину длины волны луча, применяемого для освещения. Поскольку предельная, лежащая на границе видимого и ультрафиолетового света длина волны равна 400 нм, предельное разрешение светового микроскопа в видимом диапазоне составляет 200 нм (2000 ангстрем). Применение микроскопа, использующего ультрафиолетовый свет, может повысить разрешение примерно в два раза (сделать равным 1000 ангстрем). Дальнейшее увеличение разрешающей способности связано с использованием более коротковолнового электромагнитного излучения. Такое излучение применяется в электронном микроскопе. Уже в 1924 году, благодаря работам французского физика, лауреата Нобелевской премии (1929 г.) Л. де Бройля, было известно, что движущемуся электрону присущи волновые свойства и длина волны электрона обратно пропорциональна его скорости. Поскольку электрон имеет заряд, ему можно сообщить требуемую скорость, разогнав в электрическом поле. Длина волны (λ) электрона, согласно формуле де Бройля:

$$\lambda = h / mv,$$

где h – постоянная Планка, m и v – соответственно масса и скорость электрона.

С учетом сказанного, длина волны электрона (в ангстремах), ускоренного в постоянном электрическом поле с разностью потенциалов U , равна:

$$\lambda = \sqrt{150/U}.$$

В большинстве просвечивающих электронных микроскопов применяется ускоряющее напряжение 50 000-100 000 вольт. Этому диапазо-

ну напряжений соответствуют длины волн 0,055–0,039 ангстрема и максимальное теоретическое разрешение приблизительно 0,02 ангстрема. По целому ряду технических причин такое разрешение получить не удастся. Практически достигнутые разрешения на два-три порядка ниже: для кристаллических (периодических) материалов оно ориентировочно составляет 2, для материалов с неперiodической структурой – 3–4, а для большинства биологических объектов – 10–20 ангстрем.

Электроны способны проникать через тончайшие слои материала и частично рассеиваться на электронных оболочках атомов. Благодаря избирательности в рассеивающей способности различных атомов создается определенный контраст изображения. Однако, в отличие от света, ходом электронных лучей нельзя управлять с помощью стеклянных линз. Этого достигают, опираясь на корпускулярные свойства электрона как носителя заряда, с помощью электростатических, а чаще всего – магнитных линз.

Устройство электронного микроскопа, техника построения изображения в нем, технология подготовки проб для микроскопирования в электронной и световой микроскопии имеют много общего, что, в частности, отразилось и на неизменности многих терминов, применяемых в обоих видах микроскопии. Однако техническая сущность этих одинаковых терминов, как правило, в световой и электронной микроскопии разная, не говоря уже о количественной стороне выражаемых ими явлений.

11.2. Аппаратура электронной микроскопии

К приборам, применяемым в электронно-микроскопических исследованиях, относятся собственно электронные микроскопы и устройства для подготовки биологических объектов к микроскопированию.

Электронные микроскопы. При попадании потока электронов (например, электронного зонда) на объект возникают сложные процессы, сопровождающиеся испусканием рентгеновского излучения, вторичных и упруго рассеянных электронов, катодолюминесценцией. Часть электронов пройдет через объект (если он достаточно тонкий) (рис. 4.14.).

Вторичные электроны возникают в результате столкновения электронов зонда с атомами объекта. Электроны зонда «выбивают» из объекта вторичные электроны, покидающие объект. Они несут информацию о топографии поверхности объекта.

Электроны, прошедшие через объект, несут информацию о структуре объекта.

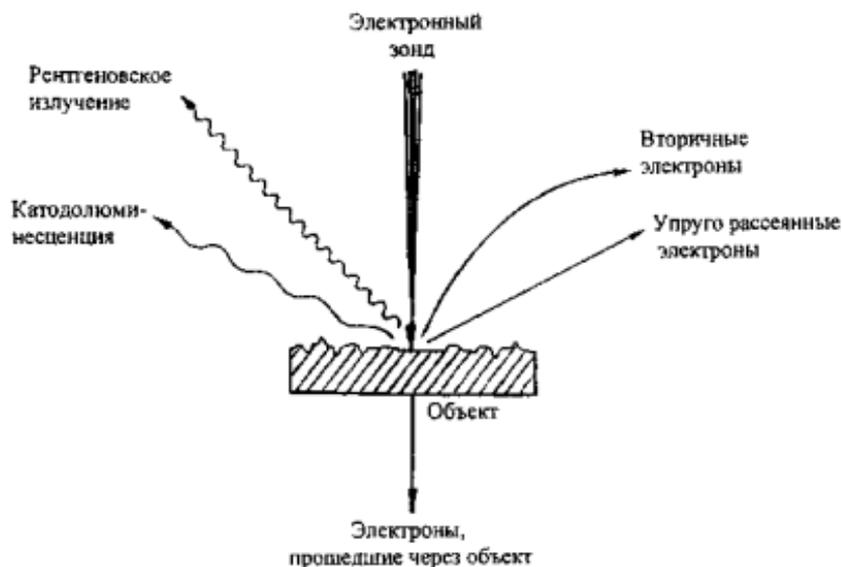


Рис. 4.14. *Виды сигналов, возникающих при взаимодействии электронов зонда с объектом [8]*

Рентгеновское излучение возникает при взаимодействии электронов зонда с веществом объекта. С помощью специальной аппаратуры оно может быть детектировано и подвергнуто анализу на предмет качественного и количественного элементного состава объекта, распределения отдельных элементов в нем.

Катодолюминесценция представлена фотонами, генерируемыми при взаимодействии электронов зонда с объектом. Люминесценция зависит от молекулярной структуры вещества объекта. Сложность в использовании катодолюминесценции для познавательных целей обусловлена очень низкой интенсивностью свечения.

Существует достаточно большое количество видов электронных микроскопов, каждый из которых использует преимущественно тот или иной эффект взаимодействия электрона с исследуемым объектом. Среди них можно назвать просвечивающие, растровые, отражательные, эмиссионные, теневые и зеркальные. В биологии преимущественное распространение получили просвечивающие и растровые микроскопы.

В просвечивающих микроскопах изображение создается электронами, прошедшими через объект наблюдения. Ход электронных лучей в микроскопе сходен с таковым для оптического микроскопа.

В качестве примера рассмотрим устройство одного из отечественных микроскопов (УЭМБ-100К) (рис.4.15). Универсальный электронный микроскоп УЭМБ-100К предназначен для визуального и фотографического исследования объектов.

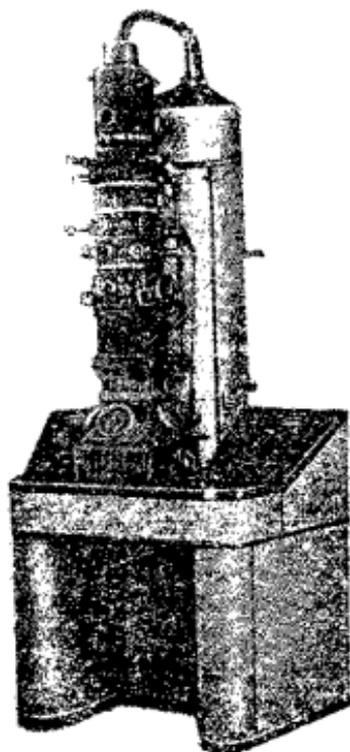


Рис. 4.15. Электронный микроскоп УЭМБ-100 К

Он позволяет: а) исследовать объекты на просвет в широком диапазоне увеличений; б) получать стереоскопические снимки с объекта при работе на просвет; в) получать светлопольные и темнопольные изображения; г) производить дифракционные исследования изображенного участка на просвет; д) производить микродифракционные исследования участков объектов с локальностью 1-2 мкм; е) исследовать объекты, в том числе живые, в газовой среде (при использовании специальной приставки), а также выполнять ряд других операций.

Электронно-оптическая система (рис. 4.16) прибора обеспечивает регулируемое увеличение от 300 до 200 000 крат. Разрешающая способность при работе с объективным наконечником высокого разрешения 8 ангстрем. Максимальное значение ускоряющего напряжения 100 кВ, потребляемая мощность 4 кВт. Съемка производится на фотопластинке размером 6,5×9,0 см. Рабочий вакуум в колонне $1\text{-}2\cdot 10^{-4}$ мм рт. ст. Расход воды для охлаждения микроскопа 5 л/мин. Общий вес микроскопа 950 кг.

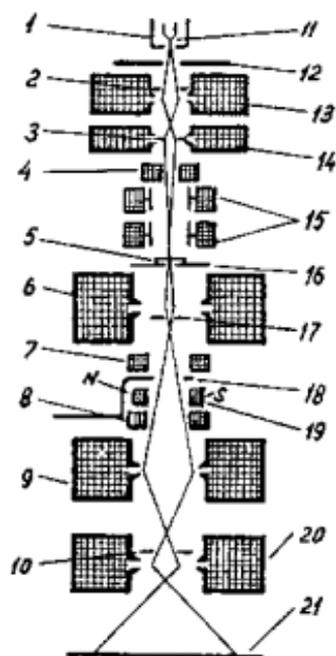


Рис.4.16. *Электронно-оптическая система микроскопа УЭМБ-100К (схема): 1 – фокусирующий электрод; 2 – диафрагма первого конденсора; 3 – диафрагма второго конденсора; 4 – стигматор второго конденсора; 5 – объект; 6 – объективная линза; 7 – стигматор объективной линзы; 8 – стигматор промежуточной линзы; 9 – промежуточная линза; 10 – диафрагма поля зрения; 11 – катод; 12 – анод; 13 – первый конденсор; 14 – второй конденсор; 15 – катушка для юстировки осветителя; 16 – столик объектов; 17 – апертурная диафрагма; 18 – селекторная диафрагма; 19 – механизм юстировки объектива; 20 – проекционная линза; 21 – экран*

Электронный микроскоп состоит из колонны, стенда, вакуумной системы, пультов управления и системы питания. Конструктивно колонна, вакуумная система и пульты управления расположены на столе стенда микроскопа. Система питания состоит из двух отдельных блоков: шкафа низковольтного питающего устройства и высоковольтного выпрямителя. Колонна микроскопа включает в себя всю электронно-оптическую систему, состоящую из осветителя (электронная пушка и блок конденсоров), объектива, проекционного блока и фотокамеры, соединенных между собой жестко, что делает прибор более виброустойчивым. Назначение колонны – получение увеличенного изображения объекта на экране микроскопа и фотоснимков этого изображения, а также дифракционной картины объекта (электронограммы). Вакуумная система состоит из одного механического и двух диффузионных насосов, вакуумных ловушек, баллона предварительного разрежения, вакуумных клапанов, реле, трубопроводов и других элементов. Назначение вакуумной системы – создать и поддерживать вакуум $1-2 \cdot 10^{-4}$ мм рт. ст. в колонне микроскопа в процессе его работы, а также после шлюзования камеры объектов и фотока-

меры при замене объекта и фотопластинок. На пультах управления находятся ручки управления линзами, стигматорами, напряжением накала нити, ускоряющим напряжением. Здесь же находятся лампочки, сигнализирующие о плохом вакууме и включении ускоряющего напряжения, а также ряд других элементов управления и контроля. Кроме пультов управления, на стенде крепится распределительный щит. На его панели выведены все вспомогательные ручки управления, которыми оператор пользуется редко. Блоки питания обеспечивают электрическое питание всех узлов электронного микроскопа от сети трехфазного переменного тока с напряжением 220 или 380 вольт.

Приведенное краткое описание показывает, что электронный микроскоп представляет собой сложный прибор, нормальная эксплуатация которого требует квалифицированного обслуживания. Последние модели электронных микроскопов обладают более высоким разрешением и большими возможностями в исследовании объектов.

Практика показывает, что при современных методах контрастирования биологических макромолекул оптимальные ускоряющие напряжения для их исследования находятся в диапазоне 70-100 кВ. При напряжении ниже 70 кВ образец быстрее разрушается под воздействием электронов. При напряжении выше 100 кВ детали исследуемых структур выявляются хуже из-за уменьшения рассеивания электронов [5].

Растровые электронные микроскопы (РЭМ) дают возможность получать самую различную информацию об объекте: о топографии его поверхности (нередко связанной с протеканием внутриклеточных процессов), химическом составе объекта, его кристаллографических характеристиках и др. В биологических исследованиях наиболее часто используется уникальная возможность РЭМ давать объемное изображение объекта в диапазоне увеличений до 100 000 крат и разрешении до 3 нм и менее.

Принцип действия РЭМ (рис. 4.17) состоит в следующем. Электроны, генерируемые пушкой, проходят через систему электромагнитных (магнитных) линз, которые фокусируют узкий (диаметром 5-10 нм) пучок электронов (электронный зонд) на поверхность исследуемого объекта. На своем пути электронный зонд подвергается действию полей, контролируемых генератором развертки, в результате чего зонд осуществляет сканирование поверхности объекта в форме квадратного раstra. Генератор развертки одновременно связан с электронно-лучевой трубкой (кинескопом), благодаря чему светящееся пятно на экране кинескопа синхронно повторяет движение острия электронного зонда, строка за строкой «рисует» изображение поверхности объекта.

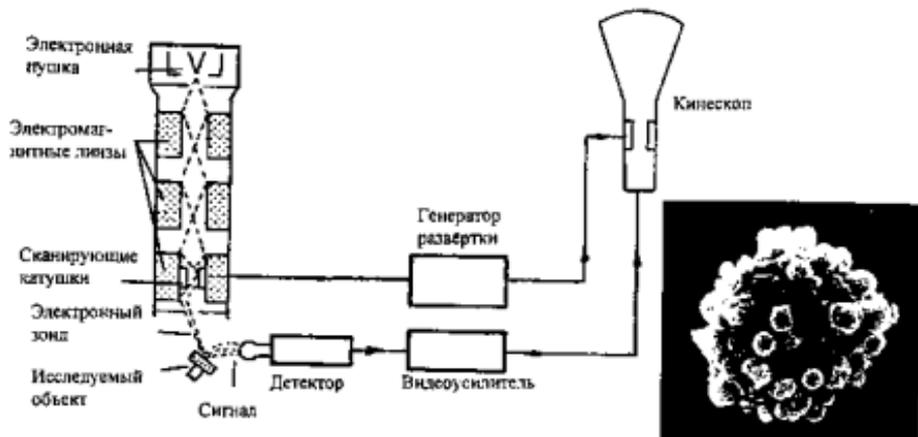


Рис. 4.17. Упрощенная схема растрового электронного микроскопа и полученное на нем изображение поверхности эмбрионального фибробласта мыши [8]

Не менее сложной процедурой, чем микроскопирование, является подготовка образцов к микроскопированию, которая осуществляется с использованием специальной установки для напыления в вакууме при работе с молекулами белков, нуклеиновых кислот, вирусами или ультрамикротомом при исследовании гистологических срезов.

Биологические объекты состоят из веществ с малым атомным номером (водорода, углерода, азота, фосфора, кислорода и др.), которые слабо рассеивают электроны и не обеспечивают контраст, требуемый для детального изучения электронно-микроскопического изображения объекта. По этой причине с целью повышения качества изображения биологические объекты искусственно контрастируют.

Молекулы белков, нуклеиновых кислот и вирусы обычно контрастируют *оттением*. Эти объекты исследования в электронном микроскопе размещают на тончайших пленках-подложках, опорой для которых служат специальные металлические сетки. Коллодиевая или углеродная пленка, полученная с использованием специальной технологии в условиях лаборатории электронной микроскопии, особым способом помещается на металлическую сетку. На подложку наносится объект исследования (например, раствор нуклеиновой кислоты); после высыхания растворителя осуществляют *оттнение* молекул кислоты. Для этого сетку с подложкой помещают под стеклянный колпак и откачивают из-под него воздух. Под определенным углом к объекту производят напыление металла (платина, палладий, сплав платины с палладием, вольфрам, реже – уран) путем испарения нагретой электрическим током до температуры плавления проволоки из этого металла. В результате косо напыления на пленке появятся участки, покрытые металлом и свободные от него, которые на микрофотографии дадут

«тени». Облучение электронами в микроскопе осуществляется под прямым углом к поверхности подложки, поэтому по длине тени, зная угол θ , под которым осуществлялось напыление, можно вычислить высоту объекта (рис. 4.18 А) по формуле: $D = l \operatorname{tg} \theta$.

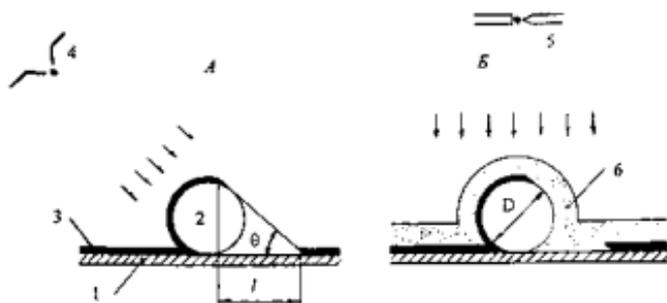


Рис. 4.18. Схематическое изображение оттенивания металлом (А) и получения углеродных реплик (Б): 1 – подложка; 2 – объект; 3 – слой напыленного металла; 4 – источник испаряющегося металла; 5 – графитовые стержни; 6 – слой углерода

На этой же установке в вакууме с помощью электрического тока, нагревающего графитовые стержни, под прямым углом к подложке производят напыление на предварительно оттенинный объект углерода: получают предварительно оттенинную реплику (рис. 4.18 Б). Часто при исследовании молекул нуклеиновых кислот их наносят в виде раствора с летучим растворителем (путем пульверизации) на тонкие пластинки слюды. Затем, после оттенивания и нанесения углеродной реплики, углеродно-металлическую пленку снимают со слюды и помещают на металлические сетки, постепенно понижая уровень воды в воронке (рис. 4.19). Сетки с объектами после высушивания готовы к микроскопированию. Существуют и другие способы подготовки макромолекул и вирусов, в частности путем негативного или позитивного контрастирования, описанных в специальной литературе.

Ультратонкие срезы используют в тех случаях, когда необходимо исследовать внутреннюю структуру биологических объектов (в отличие от рассмотренного выше случая, когда изучается преимущественно их форма). Подобно тому как это делается при гистологических исследованиях тканей с помощью оптических микроскопов, вначале биологический объект (например, кусочек ткани объемом ориентировочно 1 мм^3) подвергается фиксации с помощью формалина, глутарового альдегида, четырехоксида осмия или перманганата ка-

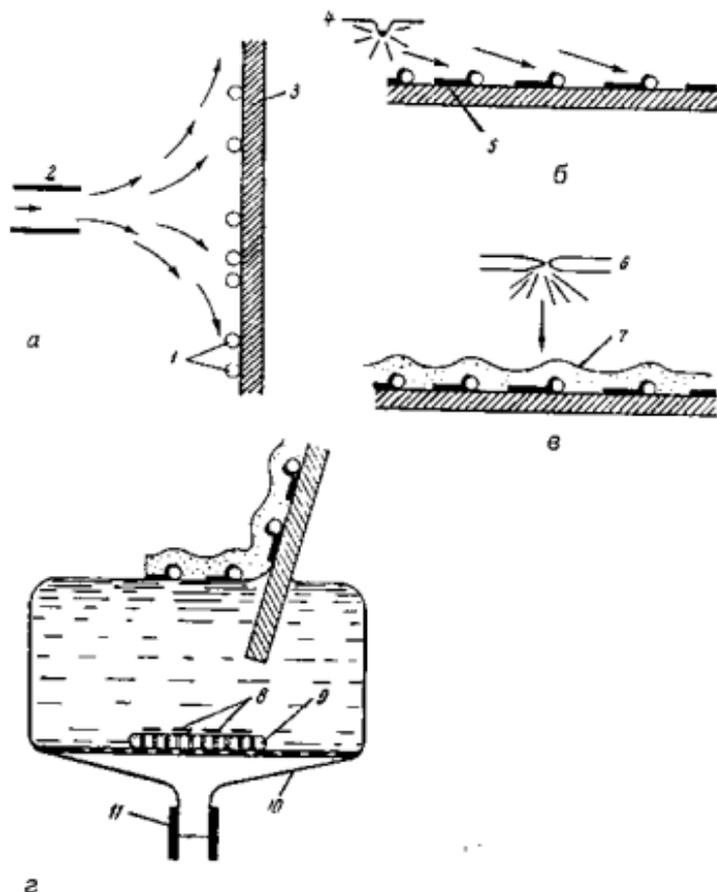


Рис. 4.19. Методика приготовления предварительно оттененных реплик с препаратов нуклеиновых кислот (вирусов, фагов, рибосом и др.) с использованием в качестве подложки свежего скола слюды: а) нанесение препарата на поверхность слюды; б) оттенивание металлом; в) нанесение слоя углерода; г) отделение углеродно-металлической пленки от поверхности слюды; 1 – частицы препарата; 2 – выходное отверстие pulverизатора; 3 – пластинка слюды; 4 – источник испаряющегося металла; 5 – слой металла; 6 – графитовые стержни; 7 – слой углерода; 8 – сетки; 9 – диск с отверстиями; 10 – воронка; 11 – трубка с зажимом [5]

лия. Затем производят обезвоживание фиксированной ткани путем «проводки» ее через растворы спирта или ацетона с возрастающей концентрацией (последовательной смены этих растворов). В процессе фиксации и обезвоживания ткани теряют до 40-60% своего *сухого* веса, поэтому данные процедуры необходимо проводить по возможности быстрее. Обезвоженную ткань подвергают пропитке и заключению в пластмассы или другие среды. Самыми доступными для заключения объектов в электронной микроскопии являются метакрилаты – эфиры метакриловой кислоты (*n*-бутилметакрилат, *n*-метилбутакрилат), а также эпоксидные смолы (эпон, аралдит и др.). Полимеризацию удобно осуществлять в желатиновой капсуле, заполненной мономером, куда переносится пропитанный им кусочек ткани. После завершения полимеризации участок пластмассы, где находится кусочек ткани (донышко желатиновой капсулы), затачивается с помощью безопасной бритвы (ему придается форма маленькой пирамиды). Заточенный блок зажимают в держатель ультрамикротомы и с помощью стеклянного или алмазного ножа осуществляют его резку. Широко распространенные стеклянные ножи имеют форму равнобедренного треугольника. Их нарезают из зеркального стекла толщиной 4-6 мм с катетами обычно размером 2,5×2,5 см и используют вскоре после приготовления, так как режущая кромка (на стыке катета и гипотенузы) быстро теряет остроту. Это обусловлено тем, что стекло представляет собой своего рода переохлажденную жидкость и «течет», а режущая кромка затупляется. В районе режущей кромки к ножу крепят ванночку (рис. 4.20), которую во время резки заполняют жидкостью. На поверхность этой жидкости попадают сре-

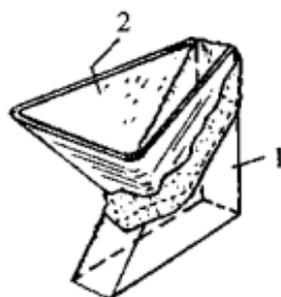


Рис. 4.20. Стеклянный нож (1) с ванночкой (2)

Толщину среза измерить инструментом нельзя, ее измеряют приблизительно по цвету в отраженном свете. Желательно получать серебристо-серые срезы, их толщина 500-600 ангстрем. Серебристые срезы имеют толщину 600-900, а золотистые 900-1200 ангстрем. Их тоже можно использовать, но не для работы с высоким разрешением. Остальным цветам (темно-золотистому, пурпурному, синему, зеленому) соответствуют толстые, не пригодные для работы срезы. В световой микроскопии толщина срезов может колебаться от одного до нескольких десятков мкм.

Ультрамикротомы, с помощью которых получают срезы для электронной микроскопии, представляют собой довольно сложные устройства, предъявляющие серьезные требования к условиям эксплуатации. Толщина срезов в них задается за счет теплового расширения нагреваемого металлического стержня или пьезострикции. В последнем случае при подаче объекта на нож используются склеенные в столбик специальные керамические элементы, к которым подведено электрическое напряжение. Удлинение этих пьезострикционных элементов пропорционально приложенному к ним электрическому напряжению, что позволяет плавно регулировать толщину среза.

Если после фиксации в четырехокиси осмия контрастность оказывается недостаточной, срезы дополнительно контрастируют. Соединения, содержащие тяжелые металлы, избирательно контрастируют, «окрашивают» субклеточные структуры. Так, четырехокись осмия интенсивно связывается с белками, но слабо связывается с РНК и почти не реагирует с ДНК. Для выявления мембранных структур клетки, основным компонентом которых являются липопротеины, с успехом применяется перманганат калия. Уранилацетат контрастирует все структуры, но более быстро и прочно связывается с гранулами рибонуклеопротеидов и с волокнами соединительной ткани. Хорошо контрастирует мембранные структуры клетки фосфорномолибденовая кислота, но особенно четко она окрашивает гликоген. Широкое распространение при контрастировании получили соли свинца (ацетат, гидроксид и монооксид свинца). Они хорошо контрастируют любые структуры, особенно мембранные. Контрастирование можно проводить не только на срезах, но и на кусочках тканей до их заключения в пластмассу.

Для выявления мест локализации ферментов в клеточных структурах ткани необходимо фиксировать в формалине и других альдегидах, которые не разрушают ферменты. Фиксированные, а затем отмытые кусочки ткани переносят в инкубационные среды, где ферменты реагируют с субстратами, и на месте их активности откладываются или тяжелые металлы (результат реагирования продукта реак-

ции, например фосфата, в случае со щелочной фосфатазой, с добавляемыми ионами свинца), или гистохимические реагенты (соли тетразолия). После проведения инкубации ткани необходимо снова подвергнуть фиксации, но уже в осмиевых растворах, чтобы повысить контрастность. Такие ткани затем заключают в пластмассы и из них готовят срезы.

Готовый к микропированию срез помещают на металлическую сетку, сетку с образцом вкладывают в объектодержатель (срезы в колонне должны быть обращены вниз), а объектодержатель вводят в камеру объекта микроскопа.

11.3. Применение электронной микроскопии

По своим возможностям электронная микроскопия является пограничной областью между морфологией и химией внутриклеточных структур. Высокая разрешающая сила электронного микроскопа позволяет воочию наблюдать не только мельчайшие структуры клетки, но и отдельные макромолекулы. Разрешение электронного микроскопа вплотную подошло к размеру атома (1 ангстрем), и не приходится сомневаться, что придет время, когда электронный (а может быть – протонный) микроскоп позволит увидеть расположение атомов в молекуле.

Электронная микроскопия начинала свой путь в биологии с более детального, чем оптическая микроскопия, изучения морфологии субклеточных структур. После решения проблемы получения ультратонких срезов с помощью созданных конструкторами совершенных ультрамикротомов и разработки технологии подготовки объектов к микропированию, особенно методов избирательного контрастирования структур и химических соединений, в электронную микроскопию пришла гистохимия, успешно применявшаяся в оптической микроскопии. Электронная гистохимия позволила изучать химический состав субклеточных структур на более детальном уровне. Электронно-микроскопическое исследование клеток, находящихся на разных стадиях развития (или деления), методами гистохимии позволяет решать вопросы динамической биохимии клетки [12].

Еще большие возможности в изучении динамики биохимических процессов на тонком (молекулярном) уровне возникли после слияния метода электронной микроскопии с радиоизотопным методом, следствием чего явилось создание перспективного направления – электронно-микроскопической радиоавтографии. Это направление можно

рассматривать как распространение ранее существовавшего в гистохимии метода радиоавтографии на субклеточный уровень [14,15].

В молекулярной биологии электронная микроскопия позволила визуализировать «работу» макромолекул, в частности ДНК, сделать видимыми в натуре процессы, которые доселе ученые изображали в виде схематических рисунков на бумаге.

Как исторический факт следует отметить работы М. Бира с сотрудниками по визуализации последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты путем избирательного присоединения к определенным нуклеотидам тяжелых металлов (золота), то есть по сути внутримолекулярного контрастирования.

Представляют интерес работы И.Г. Стояновой с сотрудниками по электронно-микроскопическому исследованию живых микроорганизмов в специально сконструированных газовых камерах. Их конструкция позволила исследовать влажные объекты при практически атмосферном давлении с возможным разрешением 100 ангстрем и увеличением до 30 000 крат, что на порядок превышает возможности оптической микроскопии. Не исключено, что это направление «вита́льной» электронной микроскопии, прежде всего применительно к непосредственному наблюдению внутриклеточных процессов под электронным микроскопом, может получить продолжение на новом техническом уровне.

ГЛАВА ДВЕНАДЦАТАЯ

ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Гидродинамические методы исследования биологических макромолекул широко применяются для измерения молекулярного веса и изучения конформации и структурных превращений макромолекул в растворе. Исследуемые макромолекулы могут находиться при этом в условиях, приближающихся по ряду параметров к условиям их существования *in vivo*. Параметры, исследуемые этими методами, тесно связаны с гидродинамическими характеристиками молекул и, следовательно, с их формой, размерами, молекулярным весом, деформируемостью. Очень большие значения молекулярных весов, свойственные подавляющей части белков и нуклеиновых кислот (10^5 - 10^8 Да), исключают применение обычных способов определения молекулярного веса (криоскопию, осмометрию и др.).

К числу применяемых для исследования биомолекул гидродинамических методов относятся: ультрацентрифугирование, вискози-

метрия и двойное лучепреломление в потоке. Анализ результатов ультрацентрифугирования требует знания коэффициента диффузии, который даже сам по себе несет определенную информацию о массе и форме макромолекул. Поэтому вначале кратко рассмотрим некоторые закономерности процесса диффузии биологических макромолекул.

12.1. Диффузия макромолекул в растворах

Термином диффузия обычно обозначают движение отдельных молекул при броуновском движении, обусловленном их тепловой энергией. Для нас будет представлять интерес поступательная диффузия, представляющая собой процесс спонтанного уменьшения градиентов концентрации в растворе, приводящий в конечном счете к равномерному распределению молекул (исчезновению градиента).

Макроскопическая направленная диффузия в растворе описывается двумя уравнениями Фика. Она возникает при наличии градиента концентрации dC/dx растворенного вещества в направлении оси x . Первое уравнение Фика констатирует, что поток вещества за единицу времени через площадь 1 см^2 L прямо пропорционален градиенту его концентрации:

$$L = -D \frac{dC}{dx},$$

где D – коэффициент диффузии ($\text{см}^2/\text{с}$); знак « $-$ » указывает на то, что направленный поток частиц идет в сторону уменьшения концентрации.

Второе уравнение Фика, в отличие от первого, выведено для нестационарного процесса диффузии. Оно выражает скорость изменения концентрации dC/dt , которая связана со скоростью изменения градиента концентрации d^2C/dx^2 :

$$\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2}$$

Эксперимент по определению коэффициента диффузии D осуществляется с использованием системы, состоящей из трубки, разделенной вначале на две половины, причем в нижней части находится раствор частиц, а в верхней – растворитель. В точно определенный момент времени раствор и растворитель приводят в соприкосновение,

причем исходная граница, разделяющая их, должна быть весьма резкой. Затем определяют зависимость концентрации или градиента концентрации от x для разных моментов времени (рис. 4.21).

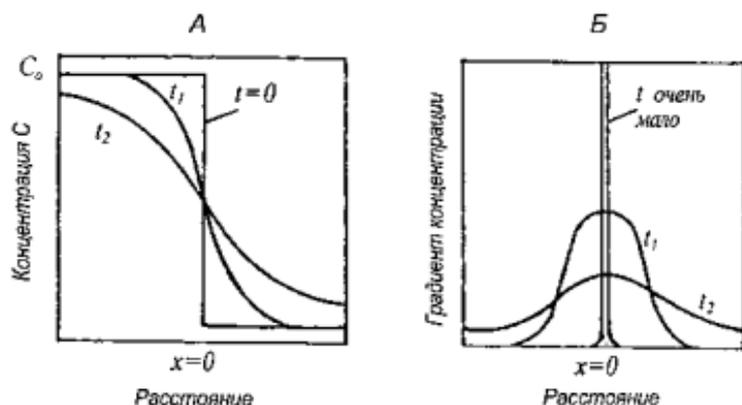


Рис. 4.21. Изменение концентрации (А) и градиента концентрации (Б) в процессе диффузии с первоначально резкой границей при $x=0$ в разные моменты времени t ($t_2 > t_1$) [17]

Решение второго уравнения Фика позволяет найти выражения для концентрации C и градиента концентрации dC/dx :

$$C = \frac{C_0}{2} \left[1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^Z e^{-z^2} dz \right],$$

где $Z = x / 2\sqrt{Dt}$;

$$\frac{dC}{dx} = -\frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4Dt}}.$$

Последнее выражение показывает, что при $x=0$ градиент dC/dx будет максимальным и равным $-C_0 / \sqrt{4\pi Dt}$.

Обычно ход диффузии контролируют измерением показателя преломления и его градиента. Между концентрацией и показателем преломления, равно как между градиентом концентрации и градиентом показателя преломления, существует линейная зависимость с коэффициентом пропорциональности K : $n = KC$; $dn/dx = K(dC/dx)$.

Тогда, например, для t_1 (см. рис. 4.21 Б) максимальное значение dn/dx будет равно $KC_0 / \sqrt{4\pi Dt}$, а площадь под этой кривой (в пересчете с C на n) – KC_0 . Отношение площади к максимальному значению градиента dn/dx

$$KC_0 / (KC_0 / \sqrt{4\pi Dt}) = \sqrt{4\pi Dt}.$$

Из этого выражения находится значение D .

Было доказано, что с увеличением молекулярной массы белков (и нуклеопротеидов) коэффициент диффузии уменьшается. Это значение также зависит от конформации биомакромолекул. Если молекулы имеют сходную конформацию (например, представляют собой частицы с небольшой степенью вытянутости), то для них $\lg D$ снижается с увеличением $\lg M$ по линейному закону (M – молекулярная масса).

12.2. Аналитическое ультрацентрифугирование

Осуществляется на аналитических ультрацентрифугах по конструкции, числу оборотов и фактору разделения в целом сходных с рассмотренными ранее препаративными ультрацентрифугами. Различие заключается в использовании специального аналитического ротора и оптической системы, позволяющей определять распределение концентраций седиментирующих молекул в любой момент времени без остановки центрифуги (при вращающемся роторе) (рис. 4.22).

Аналитический ротор обычно имеет два отверстия-гнезда для аналитической кюветы и противовеса (дюралюминиевого цилиндра). Аналитическая кювета (ячейка) разборная, состоит из дюралюминиевого корпуса, вкладыша, имеющего сквозной секториальный резервуар, и кварцевых окошек. В сечении полость вкладыша представляет собой равнобедренную трапецию, стороны которой совпадают с радиусами окружности вращения ротора, что предотвращает осаждение центрифугируемого материала на стенках вкладыша (рис. 4.23).

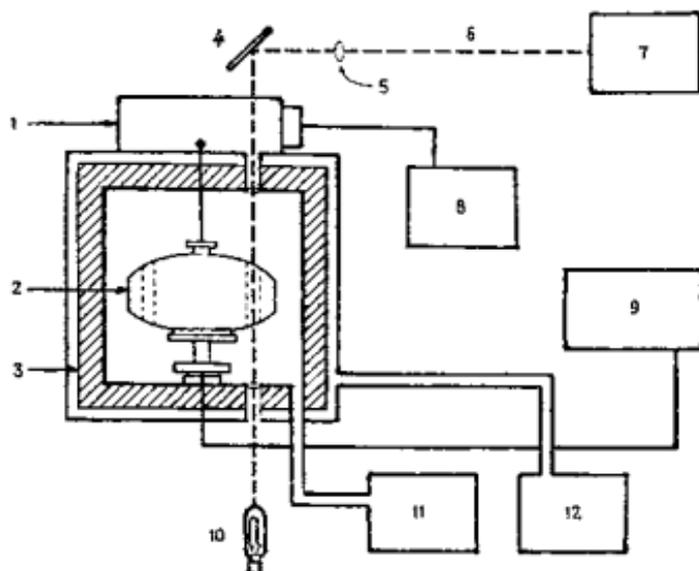


Рис. 4.22. Схема аналитической ультрацентрифуги фирмы Вестгал: 1 – мотор; 2 – ротор; 3 – бронированная камера; 4 – зеркало; 5 – камерная линза; 6 – путь света; 7 – держатель фотопленки; 8 – панель контроля скорости; 9 – контроль температуры; 10 – источник света; 11 – вакуумный насос; 12 – охлаждение [19]

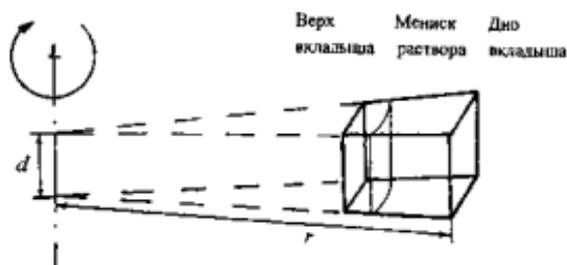


Рис. 4.23. Схематическое изображение вкладыша аналитической ячейки [20]

Бывают двухсекторные кюветы; их вкладыш имеет два независимых резервуара, в один из которых заливают исследуемый раствор, в другой – чистый растворитель. Исследуемый раствор вносят через отверстие, находящееся в верхней части ячейки. Ориентировочный объем ячейки 1 мл. При заполнении ячейки исследуемым раствором в ее рабочем пространстве остается небольшой пузырек воздуха. Для наблюдения за процессом седиментации в современных центрифугах используются три различные системы: шлиреновская, интерференционная и абсорбционная. Шлиреновский метод (Филлота-Свенсона) позволяет регистрировать производную dn/dx коэффициента преломления n , которая пропорциональна производной концентрации dC/dx . Интерференционный метод позволяет определить показатель преломления раствора в любой точке кюветы, а каждая интерференционная полоса является кривой зависимости показателя преломления от расстояния. Он более чувствителен и точен, чем шлиреновский метод. Абсорбционный метод основан на специфическом поглощении света седиментируемыми молекулами. Так, для наблюдения за нуклеиновыми кислотами используется длина волны 253,7 нм (интенсивная линия в излучении ртутной лампы, применяемой в качестве источника света). Если ячейку сфотографировать в этом свете, то степень почернения пленки будет уменьшаться с увеличением концентрации нуклеиновой кислоты (негатив). Если пленку после этого профотометрировать, можно будет получить зависимость концентрации от расстояния. В настоящее время, чтобы полнее использовать возможности этого самого чувствительного метода, стали, минуя фотографирование, напрямую измерять количество проходящего света с помощью фотоэлементов. Такая система фотоэлектрического сканирования, работающая по принципу двухлучевого спектрофотометра, позволяет сравнить оптическую плотность раствора и растворителя вдоль длины кюветы и строить с помощью самописца график зависимости концентрации от расстояния. Благодаря наличию монохроматора имеется возможность выбора длины волны, соответствующей максимуму поглощения исследуемыми молекулами.

Существует несколько методов аналитического центрифугирования.

Метод скорости седиментации. В этом методе ячейку заполняют исследуемым раствором и устанавливают высокую (максимальную или близкую к ней) скорость вращения ротора. При центрифугировании происходит седиментация растворенных веществ, в результате чего образуется граница между чистым растворителем и раствором, которая постепенно смещается ко дну ячейки. Поскольку происходит диффузия макромолекул из раствора в растворитель, то граница всегда не-

сколько размыта. Ее находят по результатам измерения показателя преломления. Очевидно, что наибольшее значение градиента рефракции приходится на середину зоны раздела, то есть на тот участок, где должна была бы пройти идеальная граница раздела. Основной измеряемой величиной в рассматриваемом методе является коэффициент седиментации S , который зависит от формы макромолекулы в данном растворе и от молекулярного веса.

Коэффициент седиментации применительно к осаждению молекул, как и в случае с фракционированием субклеточных структур (о чем говорилось ранее), равен отношению скорости оседания молекул к центробежному ускорению:

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \frac{d \ln x}{\omega^2 dt},$$

где ω - угловая скорость ротора.

Для нахождения S измеряют в моменты времени t_1 и t_2 расстояния границы седиментации от оси вращения ротора x_1 и x_2 и подставляют эти данные в формулу:

$$S = \frac{\ln(x_2/x_1)}{(t_2 - t_1)\omega^2}.$$

Значение S для данного вида молекул зависит от вязкости, плотности и температуры раствора, в котором осуществлялась седиментация. Будучи приведенной к стандартным условиям определения она становится индивидуальной характеристикой молекул, зависящей от их молекулярной массы и конформации. Значение S увеличивается с возрастанием массы молекулы и степени ее компактности. Изменение конформации молекулы, например вследствие денатурации, сказывается на значении S . В связи с этим измерение значения S производят при исследовании различного рода конформационных перестроек макромолекул.

Метод скорости седиментации позволяет найти и молекулярную массу исследуемого соединения. Для вывода уравнения, позволяющего вычислить молекулярную массу, найдем значения взаимно уравновешивающих сил:

- центробежная сила равна $V\rho_M\omega^2x$, где V - объем молекулы;

ρ_M - ее плотность;

- архимедова сила выталкивания молекулы из раствора

$V\rho_p\omega^2x$, где ρ_p – плотность растворителя;

- сила сопротивления движению частицы $f\frac{dx}{dt}$, где f – молярный коэффициент трения; для разбавленных растворов он связан с коэффициентом диффузии D соотношением Эйнштейна: $f = RT/D$, где R – газовая постоянная; T – абсолютная температура (°K).

В расчете на 1 моль результирующая центробежной и архимедовой сил равна $N_A V(\rho_M - \rho_p)\omega^2x$, где N_A – число Авогадро. Вынесем за скобки ρ_M и запишем выражение в новом виде:

$N_A V\rho_M(1 - \rho_p/\rho_M)\omega^2x$. Поскольку $N_A V\rho_M = M$, $1/\rho_M = \bar{V}$ (удельному парциальному объему), результирующая этих двух сил равна $M(1 - \bar{V}\rho_p)\omega^2x$. При оседании молекулы ее скорость будет практически постоянной, поэтому

$$M(1 - \bar{V}\rho_p)\omega^2x = f\frac{dx}{dt} = \frac{RT}{D} \cdot \frac{dx}{dt},$$

$$\text{откуда } M = \frac{RT}{(1 - \bar{V}\rho_p)D} \cdot \frac{dx/dt}{\omega^2x} = \frac{RTS}{(1 - \bar{V}\rho_p)D}.$$

Способы нахождения S и D рассмотрены выше; плотность растворителя ρ_p определяют обычно с помощью пикнометра. Удельный парциальный объем молекулы исследуемого вещества находят как отношение $\Delta v/\Delta m$, где Δv – увеличение объема раствора после добавления к растворителю навески Δm безводного вещества.

Метод седиментационного равновесия. Если ротор центрифуги вращается достаточно долго со скоростью 8-15 тыс. оборотов в минуту, то скорость переноса вещества за счет седиментации будет мала и соизмерима со скоростью переноса за счет диффузии. В результате достигается равновесие концентраций во всей ячейке. Для этого случая

$$M = \frac{2RT \ln(C_2/C_1)}{\omega^2 (1 - \bar{V}\rho_p)(x_2^2 - x_1^2)},$$

где x_2 и x_1 – расстояния от центра ротора до какой-либо пары точек внутри ячейки с концентрациями соответственно C_2 и C_1 .

Седиментационное равновесие устанавливается в течение от нескольких суток до нескольких недель при непрерывной работе центрифуги. Помимо неудобств, возникающих от столь длительной работы ультрацентрифуги, имеется опасность изменения структуры нестойких молекул (например, денатурация белков). Поэтому данный метод, хотя и базируется на строгой теоретической основе, используется значительно реже, чем метод скорости седиментации.

Для преодоления недостатков метода седиментационного равновесия Арчибальдом были предложены теоретические расчеты для вычисления молекулярной массы по скорости приближения к седиментационному равновесию, не дожидаясь действительного равновесия. Этот метод также связан с определенными экспериментальными трудностями и применяется сравнительно редко.

12.3. Вискозиметрия

Определение свойств молекул вещества по вязкости его растворов занимает очень важное место среди других методов изучения макромолекул. Это связано прежде всего с технической доступностью метода и относительной простотой интерпретации результатов вискозиметрического исследования. Вискозиметрия позволяет определить характеристическую вязкость макромолекул, связанную с их размерами, формой и жесткостью. Этот параметр, в частности, широко используется для определения молекулярной массы нуклеиновых кислот. Вискозиметрический метод определения молекулярной массы, однако, не является независимым, поскольку требует калибровку при помощи абсолютных методов, в частности, электронной микроскопии.

Если какое-либо тело движется по неподвижной поверхности, то этому движению препятствует трение. Когда этим телом является жидкость, трение вызывается эффектом, называемым вязкостью. Например, при движении жидкости вдоль неподвижной поверхности ее слой, непосредственно прилегающий к поверхности, будет полностью заторможен. Однако соседний с ним слой будет иметь некоторую (небольшую) скорость, а более удаленный слой – еще большую скорость. Таким образом, слои жидкости будут скользить друг по

другу, испытывая при этом сопротивление движению. Ньютон показал, что сила (f) этого сопротивления между слоями пропорциональна площади слоев (F) и градиенту скорости между ними (dv/dx) для слоистого (ламинарного) течения жидкости

$$f = \eta F (dv/dx),$$

где коэффициент пропорциональности η называют коэффициентом вязкости (или просто вязкостью). Он измеряется в пуазах (1 пуаз = 1 г/см·с). В частности, вязкость воды при 20° равна 0,01 пуаза.

Добавление макромолекул к растворителю с вязкостью η_0 приводит к увеличению вязкости раствора за счет увеличения трения между прилегающими друг к другу мономолекулярными слоями жидкости. Дело в том, что макромолекулы, будучи более крупными, чем молекулы растворителя, одновременно находятся в нескольких мономолекулярных слоях растворителя, перемещающихся с разными скоростями, и тем самым оказывают дополнительное сопротивление движению жидкости. Изменение вязкости раствора (η) по отношению к вязкости растворителя (η_0) выражают с помощью безразмерных показателей: относительной вязкости $\eta_{\text{отн}} = \eta/\eta_0$ или удельной вязкости $\eta_{\text{уд}} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 = \eta_{\text{отн}} - 1$.

Чтобы исключить влияние межмолекулярных взаимодействий растворенного вещества, используют показатель, называемый характеристической вязкостью ($[\eta]$), который определяют для нулевой концентрации растворенного вещества:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{\text{уд}}/C).$$

Его находят графически как отрезок, отсекаемый от оси ординат графиком зависимости $\eta_{\text{уд}}/C$ от C (рис. 4.24).

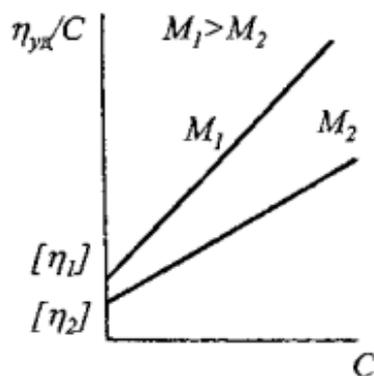


Рис. 4.24. Графики зависимости $\eta_{\text{вн}}/C$ от C для растворов двух молекул ДНК с молекулярными массами M_1 и M_2

Форма крупных молекул, особенно молекул нуклеиновых кислот, в потоке нередко зависит от градиента скорости. Поэтому для того, чтобы с помощью вискозиметрии определить неизменные движением молекулярные параметры, находят значения $[\eta]$ при градиенте скорости $dv/dx = 0$.

Особый интерес представляет изучение с помощью вискозиметрии цепных макромолекул, принимающих в растворе всевозможные конформации. В соответствии с теорией, гибкая цепная макромолекула, находящаяся в растворе, имеет форму случайным образом свернутого клубка (гауссов клубок). В среднем это асимметричный клубок (рис. 4.25), который можно аппроксимировать эллипсоидом вращения с отношением главных осей, равным 2.



Рис. 4.25. Клубкообразная молекула

При вращении такой клубкообразной молекулы в потоке жидкости часть жидкости, пропитывающей клубок, вовлекается в поток вместе с ним. Это делает макромолекулу частично непротекаемой для молекул растворителя. Для макромолекул одного гомологического ряда получено эмпирическое соотношение

При вращении такой клубкообразной молекулы в потоке жидкости часть жидкости, пропитывающей клубок, вовлекается в поток вместе с ним. Это делает макромолекулу частично непротекаемой для молекул растворителя. Для макромолекул одного гомологического ряда получено эмпирическое соотношение

$$[\eta] = KM^a,$$

где K и a – постоянные величины.

В логарифмических осях этому выражению

$$\ln[\eta] = \ln K + a \ln M$$

соответствует прямая линия. Измерив характеристическую вязкость нескольких стандартных препаратов с известными молекулярными массами, строят в логарифмических осях график, с помощью которого затем находят значение молекулярной массы исследуемого биополимера (если он относится к тому же гомологическому ряду) по измеренному значению $[\eta]$. Для того, чтобы превратить молекулу нативного белка в статистический клубок, ее нужно подвергнуть денатурации, например с помощью 6M раствора хлорида гуанидиния (он разрывает все водородные связи). Дисульфидные мостики разрушаются при восстановлении 2-меркаптоэтанолом. Зависимость вязкости раствора от жесткости молекулы и молекулярной массы используется в качестве чувствительного теста при изучении действия радиации на ДНК, способной осуществлять разрыв как одной цепи (уменьшается жесткость молекулы), так и обеих цепей в расположенных рядом участках (фрагментация молекулы). В бескислородной среде, напротив, возможна «сшивка» молекул ДНК между собой через «липкие» поврежденные участки. Все эти изменения структуры ДНК отражаются на вязкости облученного раствора.

По формуле Симха

$$\frac{[\eta]}{\bar{V}} = \frac{14}{15} + \frac{f^2}{5} \left(\frac{1}{3(\ln 2f - 1,5)} + \frac{1}{\ln 2f - 0,5} \right)$$

можно найти соотношение большой (a) и малой (b) полуосей $f = a/b$ вытянутых эллипсоидальных макромолекул.

Измерение вязкости осуществляют с помощью вискозиметров. Наибольшее распространение по причине дешевизны получил капиллярный вискозиметр Оствальда (рис. 4.26).

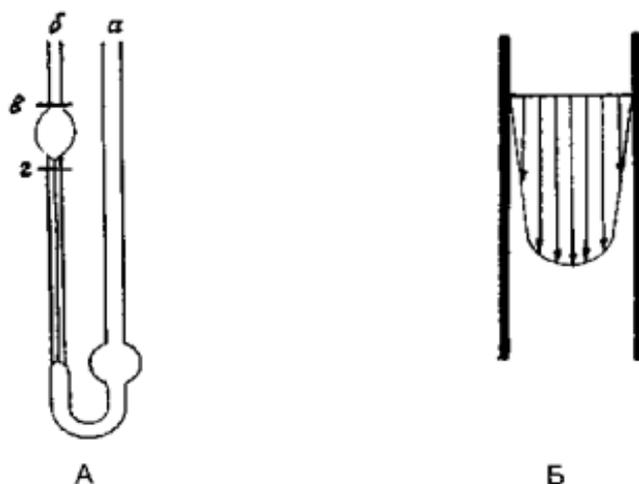


Рис. 4.26. Капиллярный вискозиметр Оствальда (А) и эпюра скоростей в сечении капилляра (Б)

Он представляет собой U-образную трубку с двумя расширениями, между которыми располагается капилляр. Раствор заливается через трубку *a*, а через трубку *б* он засасывается выше метки *в*. Замеряется время, в течение которого раствор опустится от метки *в* до метки *з*. Вискозиметр термостатируется с помощью жидкостного ультратермостата (погружается в воду). Определение вязкости основано на законе Пуазейля, согласно которому

$$\eta = \pi r^4 P / 8lV,$$

где *t* - время истечения через капилляр объема жидкости *V* (от метки *в* до метки *з*); *r* - внутренний радиус капилляра; *l* - длина капилляра; *P* - давление (определяется высотой столба жидкости).

Поскольку большинство параметров в формуле задается конструкцией вискозиметра, то можно записать

$$\eta = Ct\rho,$$

где *C* - некоторая постоянная величина; *t* - время истечения жидкости; *ρ* - плотность жидкости. Часто вместо вязкости *η* (ее называют динамической вязкостью) используют так называемую кинематическую вязкость

$$v = \frac{\eta}{\rho} = Ct.$$

За единицу кинематической вязкости принят стокс (Ст); 1 Ст равен $1 \text{ см}^2/\text{с}$.

Если η_0 – вязкость воды, а η – вязкость испытуемого раствора (например, белка), то относительная вязкость

$$\eta_{\text{отн}} = \eta / \eta_0 = \frac{Ct_p \rho_p}{Ct_e} = \frac{t_p}{t_e} \rho_p,$$

где ρ_p – плотность раствора (плотность воды равна единице); t_p и t_e – время истечения соответственно раствора и воды.

Удельная вязкость, согласно приведенному выше уравнению, $\eta_{\text{уд}} = \eta_{\text{отн}} - 1$.

Помимо капиллярных вискозиметров применяют ротационные вискозиметры. Они состоят из коаксиальных (соосных) цилиндров или конусов, зазор между которыми заполняют исследуемой жидкостью (рис. 4.27). Наружный цилиндр (или конус) вращается и поворачивает внутренний цилиндр (или конус), подвешенный на упругой нити, на определенный угол, тем больший, чем больше вязкость жидкости. Угол поворота отсчитывают по шкале напротив стрелки, укрепленной на внутреннем цилиндре (или конусе).

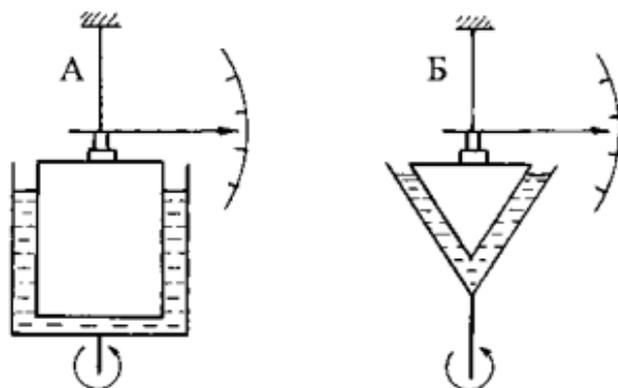


Рис. 4.27. Ротационные вискозиметры с вращающимся цилиндром (А) и конусом (Б)

12.4. Двойное лучепреломление в потоке

Метод двойного лучепреломления (ДЛП) в потоке сочетает в себе оптический и гидродинамический подходы к изучению формы макромолекул. Явление двойного лучепреломления возникает при изучении анизотропных веществ, свойства которых (в частности скорость распространения света) зависят от направления приложенного воздействия. К ним относятся вещества, обладающие оптической активностью. Анизотропия может быть создана и в телах исходно изотропных, свойства которых одинаковы во всех направлениях. Для этого необходимо асимметричные по своей форме частицы, например белковые молекулы в растворе, с помощью определенного воздействия ориентировать в одном направлении. Ориентирование частиц можно осуществить с помощью электрического или магнитного поля, а также направленного потока жидкости. В этом случае применительно к оптической анизотропии говорят о двойном лучепреломлении формы.

Двойное лучепреломление в потоке наблюдают в специальном приборе, напоминающем ротационный вискозиметр с вращающимся цилиндром, с помощью оптической системы, содержащей ориентированные под прямым углом (скрещенные) поляризатор и анализатор. Узкий зазор между двумя соосными цилиндрами заполняют исследуемым раствором асимметричных молекул. Внутренний цилиндр неподвижный, наружный – вращается с определенной скоростью. В результате этого в зазоре создается практически линейная эпюра (распределение) скорости v с постоянным градиентом

$$G = \frac{dv}{dx} = \frac{2\pi D_n n}{(D_n - D_e) \cdot 60} \approx 0,1nD_n / (D_n - D_e),$$

где D_n и D_e – соответственно диаметры наружного и внутреннего цилиндров; n – скорость вращения наружного цилиндра в об/мин; x – расстояние от стенки внутреннего цилиндра до соответствующего слоя жидкости в зазоре.

Наличие градиента скорости в зазоре создает момент, стремящийся повернуть асимметричную молекулу длинной осью вдоль направления движения жидкости (по касательной к окружности). По мере увеличения скорости вращения наружного цилиндра (в связи с увеличением градиента скорости) расположение длинной оси приближается к касательной, но не достигает его, так как существует вращательная диффузия молекул, непрерывно отклоняющая часть молекул от положения, совпадающего с направлением скорости пото-

ка жидкости. Величина этого отклонения оценивается углом экстинкции χ , который связан с коэффициентом вращательной диффузии θ выражением

$$\chi \approx 45^\circ - \frac{G}{12\theta} \text{ или}$$

$$\operatorname{tg} 2\chi \approx 6\theta / G.$$

Эта зависимость справедлива для ламинарного (слоистого, без перемешивания) течения жидкости.

Соосные цилиндры располагаются между скрещенными поляризатором и анализатором. Плоскополяризованный свет после выхода из поляризатора проходит через жидкость, находящуюся в зазоре между цилиндрами, и попадает на анализатор. Исследователь наблюдает картину на выходе из анализатора. Если бы ориентация асимметричных молекул совпадала с направлением движения жидкости в зазоре, исследователь наблюдал бы четыре крестообразно (под прямым углом) расположенных по окружности темных пятен: два – на пересечении плоскости пропускания поляризатора, другие два – на пересечении плоскости анализатора с окружностью (зазором). В одном случае – при совпадении плоскости поляризации луча с оптической осью ориентированных в потоке молекул – свет полностью задерживается скрещенным анализатором, в другом – когда оптическая ось молекул совпадает с плоскостью пропускания анализатора, но ориентирована под прямым углом к плоскости поляризатора – молекулы предельно ослабляют плоскополяризованный свет. Однако в связи с существованием вращательной диффузии, обусловленной тепловым (броуновским) движением молекул, расположение оптических осей молекул, параллельных плоскостям поляризатора и анализатора, окажется смещенным на угол χ . Соответственно и крест-изоклин (четыре темных пятна) будет повернут на тот же угол χ (рис. 4.28).

Обычно угол χ находят, пропуская узкий пучок плоскополяризованного света через зазор. После сообщения внешнему цилиндру определенной скорости вращения пару скрещенных призм Николя (поляризатор и анализатор) поворачивают совместно до тех пор, пока в поле зрения не появится небольшой участок креста-изоклина. Затем то же самое повторяют, изменяя направление вращения цилиндра на противоположное, но с той же скоростью. Разница в углах поворота скрещенных призм Николя равна 2χ .

По заданному значению градиента G и найденному значению χ

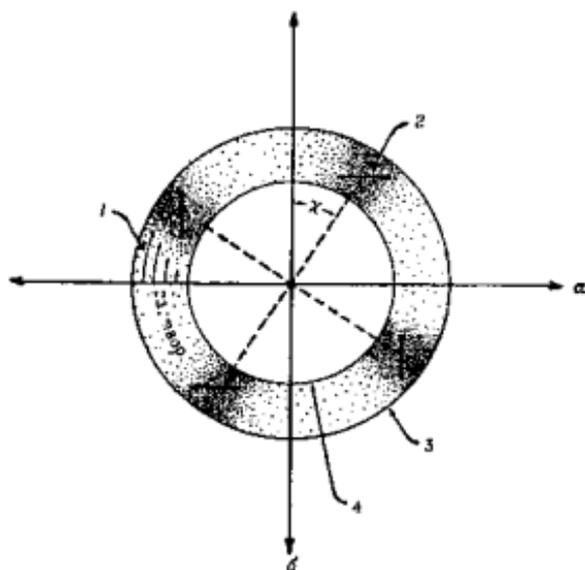


Рис. 4.28. Вид вдоль оси прибора для измерения ДЛП: 1 – линии потока; 2 – палочкообразная молекула; 3 – вращающийся цилиндр; 4 – неподвижный цилиндр; а – ось поляризатора; б – ось анализатора [19]

с помощью одной из приведенных выше формул вычисляют значение коэффициента вращательной диффузии θ , которое связано с соотношением большой (a) и малой (b) полуосей молекулы уравнением

$$\theta = \frac{3kT}{16\pi\eta_0 a^3} [2 \ln 2f - 1],$$

где k – константа Больцмана; T – абсолютная температура; η_0 – вязкость растворителя; $f = a/b$.

На основании измерений ДЛП в сочетании с вискозиметрией могут быть определены и абсолютные размеры молекул. Считается, что этот метод пригоден для изучения линейных размеров сильно вытянутых молекул и для определения их состояния при деструкции и денатурации. Для молекул с линейными размерами менее 200 ангстрем этот метод считается непригодным.

ИЗОТОПНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сущность изотопных методов. В подавляющем большинстве случаев изотопные методы исследования основаны на использовании метки, роль которой выполняют определенные стабильные или радиоактивные изотопы. Метки в биологии применяют для придания отдельным экземплярам биообъектов особого свойства, по которому их можно обнаружить среди совокупности немеченых экземпляров данной категории. В частности, птиц, летучих мышей метят кольцеванием; копытных (в том числе в животноводстве), хищников и некоторых грызунов – ушными метками; тюленей и морских черепах – кнопками, прикрепляемыми обычно на ласт, и т. д. При исследовании метаболических процессов исходные молекулы метили химическими метками. Например, в середине XIX века Бертанини, чтобы проследить превращение бензойной кислоты, введенной с пищей, в гиппуровую кислоту, выводимую с мочой, метил бензойную кислоту нитрогруппой ($-NO_2$). Меченая бензойная кислота (нитробензойная кислота) после превращения выводилась с мочой в виде нитрогиппуровой кислоты. В начале XX века Ф. Кнооп для исследования процесса окисления жирных кислот в организме метил их бензольным кольцом.

Однако химическая метка не универсальна и при некорректном использовании может изменить ход естественного процесса. Изотопные метки, хотя и не лишены определенных недостатков, являются более универсальными, более соответствующими качествам идеальной метки. В состав меченой молекулы входит один (или более) меченый химический элемент. Немеченым элементом называется химический элемент с его природным, естественным составом. Меченым называется химический элемент с искусственно измененным изотопным составом.

Меченые элементы можно получить повышением в данном элементе относительного содержания малораспространенного стабильного изотопа или введением в состав данного химического элемента не существовавшего в нем до этого радиоактивного изотопа. Благодаря этому появляется возможность использовать малораспространенные стабильные и радиоактивные изотопы в качестве изотопов-индикаторов (меченых атомов). Различают стабильные и радиоактивные изотопные индикаторы и, соответственно, две разновидности метода меченых атомов (в дальнейшем будем их называть отдельными методами): метод стабильных изотопов-индикаторов и метод радиоактивных индикаторов. Если меченый элемент введен в состав какого-либо химического соединения, то оно называется меченым.

При работе с мечеными соединениями в биохимии необходимо по возможности выдерживать определенные условия (условия индикаторности). Три из них относятся как к радиоактивным, так и к стабильным изотопам, два последних в рассматриваемом ряду – только к радиоактивным элементам.

Условия индикаторности [21]:

1. Изотопные эффекты должны быть пренебрежимо малы, то есть поведение меченого и немеченого элементов в исследуемом явлении должно быть практически одинаковым.

2. Количество вещества, вводимого в биосистему в качестве индикатора, должно исключать влияние последнего на скорость и положение равновесия исследуемого процесса.

3. Превращения одноименных молекул не должны зависеть от способа введения их в биосистему.

4. Излучение и «горячие атомы», сопровождающие распад радиоактивных индикаторов, не должны заметно изменять ни направления и скорости исследуемых процессов, ни химического и физического состояния системы.

5. Промежуточные и устойчивые конечные продукты радиоактивных превращений не должны влиять на исследуемый процесс и состояние системы.

Первое условие касается возможного влияния различия в массах изотопов конкретного элемента на протекание процессов, связанных с участием в них меченых соединений. Различия в свойствах и поведении изотопных атомов принято называть *изотопными эффектами*.

Отношения масс изотопов с крайними массовыми числами, как правило, с увеличением атомного номера элемента уменьшаются (водород – 3:1=3; углерод – 14:11 ≈ 1,3; натрий – 24:22 ≈ 1,1; йод ≈ 135:126=1,07 и т.д.). Поскольку средняя кинетическая энергия свободных корпускул при одной температуре одинакова и не зависит от их массы, то $m_1 \bar{v}_1^2 / 2 = m_2 \bar{v}_2^2 / 2$, где m_1, \bar{v}_1 и m_2, \bar{v}_2 – соответственно масса и средняя скорость двух изотопов. Отсюда соотношение их скоростей (влияющих на диффузию, теплопроводность, внутреннее трение) выражается в виде следующего уравнения:

$$\bar{v}_1 / \bar{v}_2 = \sqrt{m_2 / m_1}.$$

Так как отношение крайних значений масс изотопов убывает с увеличением порядкового номера химического элемента, то и различия изотопов в средних скоростях будут убывать. При использовании изотопных индикаторов, как правило, изотопными эффектами пренебрегают (за исключением случаев, когда применяют изотопы водоро-

да), поскольку изотопные эффекты лежат в пределах погрешности измерений.

Степень выраженности изотопного эффекта в определенной мере зависит от сложности биообъекта. Так, исследованиями зарубежных ученых было установлено, что многие одноклеточные водоросли и бактерии в определенных условиях могут размножаться при практически полном замещении в среде H_2O на D_2O («тяжелая», дейтериевая вода). Однако при прямом переносе некоторых из представителей родов хлорелла и сценедесмус, кишечной палочки, цианобактерий, имеющих естественный изотопный состав, из обычной воды в высококонцентрированную (70-100%) D_2O сначала наблюдается своеобразный полный или частичный «анабиоз». В первом случае на десятки и сотни часов у клеток полностью прекращается рост и деление. Во втором случае некоторая часть клеток во время «анабиотического периода» продолжает расти, не делясь, достигая порою гигантских размеров (объем некоторых клеток может превышать нормальный в десятки и сотни раз); часть клеток при этом погибает. Тем не менее, по прошествии определенного периода, неодинакового для разных организмов, происходит адаптация к неестественной среде, а выжившие клетки вновь начинают нормально расти и делиться. Потомство гигантских клеток после нескольких делений вновь приобретает нормальные размеры. Аналогичные процессы наблюдаются и при реадaptации (при перенесении клеток, адаптированных к среде с D_2O , вновь в среду с H_2O).

Второе условие связано с «залповым» нарушением внутренней среды биообъекта (например, многоклеточного организма) и не требует комментариев.

Третье условие предполагает, что, например, низкомолекулярное меченое соединение, введенное в организм животного путем инъекции (внутримышечной, внутривенной, внутрибрюшинной) или перорально, попав в клетку, поведет себя независимо от способа введения.

Четвертое условие обусловлено радиационными эффектами, к числу которых относятся: радиоактивное излучение, появление «горячих» атомов и разрушение соединения, в состав которого входил распавшийся радиоактивный изотоп. Радиоактивное излучение вызывает ионизацию и химические изменения окружающих молекул. Ядро, испустившее электрон, позитрон или гамма-квант, одновременно приобретает энергию отдачи, которая намного меньше энергии испускаемой частицы или кванта, но обычно превышает энергию химической связи. Энергия отдачи соответствует температуре десят-

ков-сотен тысяч градусов. Поэтому ядра отдачи, двигающиеся со своей электронной оболочкой или с ее частью, иногда называют «горячими» атомами. В момент образования они обычно ионизированы и обладают высокой химической активностью. «Горячие» атомы, выходя из состава исходной меченой молекулы, химически изменяют ее.

Пятое условие касается последствий описанного распада меченого элемента. Образующиеся первичные продукты, а также соединения, возникающие при взаимодействии первичных химически активных продуктов друг с другом и с доселе неизменными молекулами, как правило оказывают негативное физиологическое действие на изучаемый объект, поэтому необходимо стремиться, чтобы их содержание не превышало некоторый предел.

Наряду с рассмотренными условиями индикаторности при работе с изотопными индикаторами необходимо учитывать возможное, искажающее истинную картину влияние *изотопного обмена*. Если меняются своими местами меченый и немеченый (например, H и D) атомы в пределах одной молекулы, обмен называют внутримолекулярным. Межмолекулярный обмен может быть гомомолекулярным (обмениваются меченым и немеченым изотопами одинаковые молекулы) или гетеромолекулярным (аналогичный обмен изотопами одного элемента происходит между разными молекулами). Кроме того, возможен обмен изотопами между одинаковыми и разными фазами (соответственно гомофазный и гетерофазный обмен), например: твердое тело – твердое тело; осадок – раствор; раствор – газ и т. д.

Введенное меченое соединение или то, во что оно превратилось в процессе метаболизма, обычно обнаруживается одним из трех способов. Если меченый атом стабильный, то анализируемую пробу переводят в газообразное состояние и наличие в ней изотопа-метки выявляют с помощью рассмотренного ранее масс-спектрального анализа. Радиоактивную метку в пробе обнаруживают в момент ее распада радиометрическим или фотографическим (радиоавтография) методами. Перспектива для развития метода радиоактивных индикаторов появилась в 1934 г. после открытия Ирен и Фредериком Жолио-Кюри искусственной радиоактивности, которая наблюдается у изотопов, полученных в результате ядерных реакций.

Получение изотопов и изотопных соединений. Стабильные изотопы получают из естественной смеси изотопов в соответствующих веществах окружающей среды. Поскольку по химическим и физическим показателям изотопы одного химического элемента различаются обычно мало, выделение в достаточных количествах интересую-

щего (редкого) изотопа является непростой задачей. Для лабораторных целей стабильные изотопы можно выделять с помощью универсального, электромагнитного метода, основанного на разделении изотопов, находящихся в ионном пучке (подобно масс-спектрометрии). Однако этот метод экономически нецелесообразен. Изотопы тяжелых химических элементов (например, урана) разделяют с помощью диффузионных методов (диффузия газов через пористую перегородку) и центрифугирования. Для разделения изотопов легких элементов наиболее выгодны ректификация, химический обмен и электролиз.

Радиоактивные изотопы получают одним из трех способов. Первый – выделение из отходов ядерной энергетики, в которых вследствие стохастического характера деления ядра урана образуется богатый набор химических элементов, в том числе радиоактивных. Второй метод – облучение стабильных изотопов нейтронами в реакторах (n, γ -реакция), например $^{58}\text{Fe} + n \rightarrow ^{59}\text{Fe}$. Третий метод – облучение нерадиоактивных элементов на циклотронах; этот метод дорог.

Существует несколько способов введения метки в молекулу (получения меченого соединения). Если соединение, которое необходимо пометить, имеет достаточно простое химическое строение, введение метки в нужное положение можно осуществить путем направленной химической реакции. Если соединение, в которое необходимо ввести метку, сложное, можно использовать биосинтез, например выращивая растения в присутствии радиоактивного углекислого газа ($^{14}\text{CO}_2$), фосфата, меченого радиоактивным фосфором (^{32}P), или добавляя в корм животному меченую аминокислоту. Белки можно метить радиоактивным йодом (йодирование белков по Мак-Ферлану). Этот метод занимает промежуточное положение между радиоизотопным методом и химическим мечением. Он состоит в том, что химическим путем *in vitro* в остатке тирозина один или два атома водорода замещаются на радиоактивный йод, который практически не сказывается на обмене белков. Радиоактивный йод выводится в дальнейшем из организма на 98% с мочой (2% выводится с калом).

Задачи, решаемые изотопным методом. Изотопный метод позволяет успешно решать великое множество задач, которые недоступны другим методам. Все многообразие задач условно можно разделить на пять типов [21].

Первый тип связан с перемещением объектов в пространстве. Применительно к молекулярному уровню изотопная метка является практически единственно возможной. К этому типу относятся пассивное и активное перемещение ионов и молекул через мембраны, транспорт ве-

ществ по кровеносной системе, всасывание компонентов пищи в кишечнике, накопление йода в щитовидной железе и т.д.

Второй тип объединяет исследование биохимических превращений в биосистемах (метаболизм). Это достаточно сложный и обширный круг задач, которые биохимики продолжают решать начиная с XIX века.

Третий тип включает исследование процессов, не сопровождающихся ни видимым перемещением объектов наблюдения в пространстве, ни изменением их состояния. Процессы этого типа характерны для множества квазистационарных состояний самого различного характера. Эти задачи *в принципе* не могут быть решены без использования меток. К числу квазистационарных процессов относятся такие, которые поддерживают на постоянном уровне химический состав биосистем и клеточный состав многоклеточного организма. Квазистационарность живых организмов обусловлена тем, что они представляют собой открытые системы, которые пропускают через себя большую массу продуктов питания, содержащих материалы и энергию, необходимые для биосинтезов. Несмотря на этот поток самых разнообразных продуктов, поступающих в организм, он сохраняет относительно постоянной свою биохимическую и морфологическую организацию. Это, однако, не значит, что организм не претерпевает никаких изменений. В нем непрерывно идут процессы диссимиляции и ассимиляции, постоянного возобновления биологических структур, распадающихся в ходе обмена веществ. Этот процесс возобновления идет на разных уровнях сложности – от целой клетки до молекул индивидуальных белков, нуклеиновых кислот и других химических соединений, входящих в состав организма.

С помощью изотопных методов была исследована интенсивность обновления белков, липидов, нуклеиновых кислот, полисахаридов, воды и других веществ в разных частях при различных физиологических состояниях, в разном возрасте.

Четвертый тип связан с процессами обмена информацией в биосистемах. Сам акт передачи информации, как правило, не связан ни с протеканием биохимических процессов, ни с перемещением вещества. Именно это обстоятельство (отсутствие вещественного обмена), которое может быть констатировано изотопным методом, является критерием принадлежности исследуемого явления к категории информационных процессов. К ним, помимо передачи информации по нейронам, относятся процессы матричных синтезов (редупликация, транскрипция, трансляция), гормональной регуляции, работа иммунной

системы, индукция синтеза экзоферментов бактериями, соответствующих изменившемуся составу питательной среды.

Пятый тип, в отличие от четырех рассмотренных, объединяет задачи, связанные с исследованием статических характеристик объектов. Сюда относятся: изучение химического строения биологически важных веществ, активного центра ферментов, определение количественного содержания различных веществ в организме, исследование их локализации.

В качестве примера рассмотрим метод изотопного разбавления. Его основное назначение – количественное определение компонентов смеси без полного выделения их из биосистемы. Так, введение в кровоток определенного количества меченой плазмы позволяет определить общий объем ее в организме. Для этого достаточно измерить радиоактивность плазмы, взятой из кровотока после прохождения времени, достаточного для полного перемешивания меченой плазмы с немеченой. Объем плазмы в организме во столько раз больше введенного объема меченой плазмы, во сколько раз удельная (в расчете на единицу объема, например 1 мл) радиоактивность плазмы после перемешивания меньше удельной радиоактивности введенной плазмы.

Другой пример – прижизненное измерение распределения радиоактивности в организме. Исследуется локализация радиоизотопов, как непреднамеренно попавших в организм, так и сознательно введенных (например, с целью диагностики), являющихся источником гамма-излучения. Для этого производится сканирование тела с помощью одного или нескольких чувствительных сцинтилляционных счетчиков (детекторов), снабженных коллиматорами (узкими отверстиями на входе радиации в счетчик). Электрический сигнал со счетчика поступает на регистрирующее устройство, которое штрихами различной жирности изображает результаты «построчного» обследования тела (или отдельного органа).

На более мелких объектах аналогичная задача может быть решена с помощью радиоавтографии.

Радиоавтография. Этот метод основан на образовании скрытого изображения в эмульсионном слое фотопленки после контакта ее с содержащим радиоактивный изотоп объектом. Фотографическое действие радиации, благодаря которому случайно в 1896 году французский физик А.А. Беккерель открыл само явление радиоактивности, нашло широкое применение в биологии. Сущность этого метода заключается в том, что цельный организм (например, растение) или срез органа, содержащие радиоактивный изотоп, на определенное

время в темной камере контактируют со специальной фотопленкой или фотопластинкой. После завершения этой экспозиции фотоматериал подвергают химической обработке (проявлению, закреплению) и анализируют. Для количественной обработки полученной радиоавтограммы используют фотометрирование отдельных ее участков, поскольку степень их почернения на негативе прямо пропорциональна содержанию радиоизотопа, находящегося в соответствующих частях радиоавтографируемого объекта.

Аппаратура изотопных методов. Содержание стабильных изотопных индикаторов в биологических пробах после специальной обработки последних определяют с помощью масс-спектрометрического метода. Количественное содержание радиоизотопов в биологических объектах или биопробах определяют с помощью радиометров. Подготовка проб к анализу более простая, чем в случае со стабильными индикаторами. Излучение объекта непосредственно воспринимается детектором (газоразрядным или сцинтилляционным счетчиком), который в ответ на попавший в него компонент радиоактивного излучения (бета-частица, альфа-частица, гамма-квант) посылает в регистрирующий блок радиометра электрический сигнал.

В радиоавтографии для получения изображения специальная аппаратура не требуется. При нанесении фотоэмульсии на гистологические срезы применяют специальные приспособления. Количественная оценка радиоавтограмм осуществляется с использованием фотометров. Большого внимания заслуживает метод фотометрирования окрашенных радиоавтографов, позволяющий получать в результате одного измерительного цикла данные о количестве вещества (например, ДНК) и меченых соединений для одной и той же клетки.

Более детально вопросы радиометрии и радиоавтографии рассмотрены в Приложении (малый практикум по дисциплине «Радиоизотопные методы в биохимии»).

Активационный анализ. Этот метод решает иные задачи, нежели рассмотренные выше изотопные методы. При облучении материалов элементарными частицами или потоками ядер с высокими энергиями в них в результате протекания ядерных реакций образуются радиоактивные изотопы. Каждый радиоизотоп, образующийся в исследуемом образце, генетически связан с определенным химическим элементом, находящимся в образце. Регистрация активности радиоизотопов, измерение их периода полураспада, определение вида и энергии излучения позволяют осуществить качественный и количественный элементный состав исследуемого вещества.

Как правило, в активационном анализе используют относительный (эталонный) метод количественного анализа. Он заключается в том, что в одинаковых условиях облучают известную массу определенного элемента ($m_{ст}$) и навеску анализируемого вещества. Активность эталона ($A_{ст}$) и анализируемого вещества (A_x) измеряют в одинаковых (стандартных) условиях. Масса элемента в навеске анализируемого вещества $m_x = m_{ст} (A_x / A_{ст})$. Для увеличения точности анализа производят химическое разделение элементов, входящих в состав исследуемого материала, на более узкие группы.

Прибор для активационного анализа включает источник активирующего излучения; устройство, в которое помещают исследуемый материал; системы ядерноспектроскопических и радиометрических установок для анализа состава излучения радиоактивных изотопов и определения их активности; электронно-вычислительную систему для автоматической обработки информации, поступающей от ядернофизических и радиометрических установок, и выдачи готовых результатов анализа.

Наибольшее распространение получил нейтронный активационный анализ. В нем для активации ядер пробы обычно используются тепловые (медленные) нейтроны.

Важнейшим достоинством активационного анализа являются высокая чувствительность, позволяющая определять ультрамикрочастицы вещества; экспрессность; возможность анализа определенных элементов в присутствии других элементов; возможность полной автоматизации анализа.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Для более полного использования возможностей инструментальных (физических и физико-химических) методов нередко их дополняют химическими методами.

К специальным методам мы условно относим варианты использования при исследовании биологических объектов инструментальных методов в сочетании с биологическими процедурами, выполняющими лишь методическую роль. В качестве примера рассмотрим метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), радиоиммунологический анализ (РИА), иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунофлуоресцентный анализ. К специальным методам относятся также рассмотренные ранее иммуноэлектрофорез и иммунологический метод оценки чистоты субклеточных фракций после центрифугирования. В конце раздела дано краткое описание методов получения иммунных сывороток.

ГЛАВА ЧЕТЫРНАДЦАТАЯ

МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Теоретические основы метода. Идея открытия метода ПЦР принадлежит американскому ученому К.Б. Мюллису, который в 1983 году предложил, а затем и осуществил в эксперименте процесс получения огромного количества копий генов в одной пробирке, названный им методом полимеразной цепной реакции.

Само по себе использование репродуктивной функции биологических объектов для получения их массы, достаточной для проведения биохимических анализов или для надежной диагностики уже имеющимися методами, не ново. Так, выращивают из отдельных клеток в чашках Петри колонии (клоны) микроорганизмов, культивируют бактерии на селективных средах, вирусы в эмбрионах или культурах тканей. В методе ПЦР осуществляют амплификацию (умножение, копирование) в условиях *in vitro* отдельных генов или их фрагментов с целью получения достаточного для дальнейшего анализа количества материала. Для этого в небольшом объеме создают условия, необходимые для своего рода локальной многократной репликации специальным образом ограниченного участка молекулы ДНК. К числу таких условий относятся: наличие в буферном раство-

ре ДНК-матрицы, дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (АТФ, ТТФ, ЦТФ, ГТФ), ДНК-полимеразы, олигонуклеотидных затравок (праймеров) и создание соответствующих температурных режимов, способствующих расплавлению молекулы ДНК (денатурации, разрыву водородных связей между ее цепями), последующему присоединению к цепям праймеров (отжиг) и амплификации.

Выделение ДНК. Метод ПЦР включает в себя выполнение трех основных процедур: подготовку исследуемой пробы, собственно ПЦР и детекцию продукта ПЦР (амплифицированной нуклеиновой кислоты).

Подготовка исследуемой пробы в большинстве случаев сводится к выделению ДНК. При отсутствии в пробе ингибиторов *Taq*-полимеразы (гемоглобина и др.) и наличии десятка копий ДНК-матрицы в объеме, вносимом в пробирку со смесью всех реагентов ПЦР, подготовка пробы может быть полностью исключена. Например, вирус гепатита В в сыворотке крови и многие возбудители инфекционных менингитов в спинномозговой жидкости можно выявить методом ПЦР без всякой подготовки, без предварительного выделения из них ДНК. В случаях, когда не требуется достижения высокой чувствительности анализа, например при идентификации микобактерий туберкулеза после первичного культивирования, достаточна их обработка, позволяющая лишь разрушить микробную стенку (нагревание в лизирующем буфере, ультразвуковая обработка или использование ферментов, в частности, лизоцима без последующего выделения ДНК).

Однако в большинстве случаев во избежание ложноотрицательного результата следует тем или иным способом выделить ДНК. При этом происходит концентрирование исследуемой ДНК-матрицы в малом объеме и удаление ингибиторов *Taq*-полимеразы.

В настоящее время используют несколько способов подготовки образца для проведения ПЦР. Процедура подготовки пробы включает лизис стенки микроорганизма и экстракцию нуклеиновой кислоты. Для разрушения клеточной стенки, в зависимости от ее природы, используют простое кипячение, замораживание-оттаивание в присутствии лизоцима, а также специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу.

Для экстракции ДНК используют два основных способа. Во-первых, применяют классическую процедуру фенольно-хлороформной экстракции, при которой достигается хорошая очистка ДНК, особенно от ингибиторов *Taq*-полимеразы, но неизбежны большие потери нуклеиновой кислоты. Другой способ, применяемый для очистки нуклеиновой кислоты, основан на использовании сорбентов. Подготовка

материала с его использованием занимает меньше времени и более проста в исполнении, но не всегда гарантирует удаление возможных ингибиторов.

Полимеразная цепная реакция. Она состоит из циклически повторяющихся трех стадий, протекающих при различных температурах: денатурации молекулы ДНК, отжига праймеров и достраивания цепи ДНК. Все реактивы, необходимые для протекания этих стадий, включая ионы магния, вводят в буферный раствор одновременно.

Фермент *Taq*-полимераза при оптимальных условиях ПЦР содержится в 50-100 мкл реакционной смеси в количестве 0,5-2 единицы. Она синтезирует цепь ДНК со скоростью до 1000 пар нуклеотидов в минуту. Большой избыток *Taq*-полимеразы увеличивает образование неспецифических продуктов ПЦР. Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицированные фрагменты ДНК-матрицы, то в реакционной смеси они присутствуют в избытке (концентрация их составляет 0,5-1,0 мкМ). Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты в реакционной среде содержатся в эквивалентных концентрациях от 200 до 500 мкМ, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов при ПЦР. Ионы магния (Mg^{2+}) необходимы для функционирования фермента *Taq*-полимеразы. Среднее содержание их около 2-3 мМ. Буфер должен обеспечить оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен трис-НСI-буфер, который удерживает рН во время ПЦР в диапазоне 6,8-7,8. Он содержит желатин (или бычий сывороточный альбумин) и деионные детергенты для стабилизации фермента, а также 50 мМ KCl. На поверхность реакционной среды наслаивается минеральное масло для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

Первая стадия протекает при температуре 93-95°, которая разрывает слабые связи между комплементарными цепями молекулы ДНК и производит их разделение. Цепи молекулы ДНК становятся доступными для присоединения к ним праймеров.

Вторая стадия начинается с охлаждения реакционного объема до температуры 72°, которая является оптимальной для присоединения праймеров. Последние представляют собой синтетические олигонуклеотиды, содержащие 20-30 оснований, и в методе ПЦР являются концевыми последовательностями интересующего фрагмента ДНК. Праймеры присоединяются по одному к комплементарным участкам цепей ДНК.

Третья стадия (удлинение цепи) происходит при той же температуре (72°) с участием ДНК-полимеразы. В методе ПЦР используется *Taq*-полимераза, выделенная из штамма термостабильных бактерий вида *Thermus aquaticus*, живущих в горячих источниках. Она высоко

стабильна и сохраняет активность до конца процесса амплификации. Ранние варианты метода ПЦР требовали добавления новых порций не-термостабильных ДНК-полимераз после стадии денатурации ДНК; термостабильная ДНК-полимераза вводится в реакционную среду однократно.

После завершения первого цикла в реакционной смеси образуются цепочки вновь синтезированной ДНК, комплементарно связанные с цепями ДНК-матрицы (рис. 5.1).

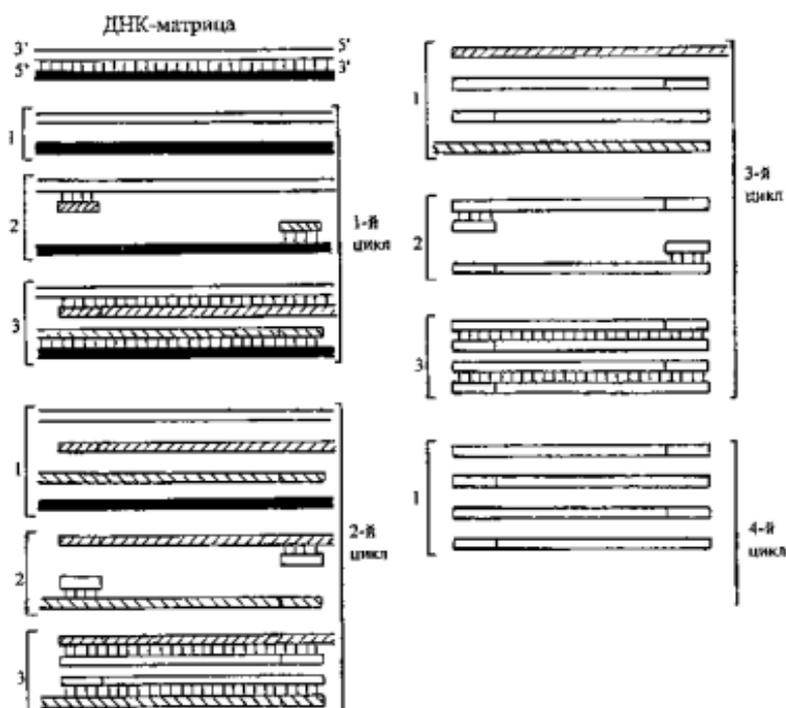


Рис. 5.1. Схема протекания полимеразной цепной реакции: 1 – стадия денатурации; 2 – стадия отжига; 3 – стадия удлинения цепи

Синтезированные цепочки ограничены с 5'-конца праймерами, а с другого конца четкой границы не имеют. Вторая граница у них появляется лишь после завершения 2-го цикла, когда образуются связанные с комплементарными цепями ампликоны, ограниченные по длине двумя праймерами (рис. 5.1). С 3-го цикла начинается их копирование. Именно этот продукт реакции используется для последующей стадии (детекции), выполняемой обычно с помощью инструментальных

методов. С образованием ампликонов начинается экспоненциальное (целное, по геометрической прогрессии) нарастание их числа, хотя продолжается и синтез фрагментов ДНК, четко ограниченных лишь с одного конца. Весь цикл образования ампликона продолжается менее 3 минут, поэтому через 2 часа можно получить приблизительно один миллиард копий интересующей последовательности ДНК. В действительности кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20-25 циклов), затем начинается выход на плато (после 40-45 циклов) в силу истощения субстрата (дезоксирибонуклеотидтрифосфатов), праймеров, нарастающего температурного повреждения *Taq*-полимеразы и конкуренции за фермент ампликонов, когда их число начинает превышать количество молекул *Taq*-полимеразы. При содержании в пробе около 10 молекул ДНК-матриц, как правило, достаточно 35 циклов.

Детекция ампликонов. Присутствие ампликона обычно детектируют электрофоретическим разделением полученного в ходе ПЦР продукта на окрашенном бромистым этидием агарозном или полиакриламидном гелях. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение, которое проявляется в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. Специфичность полосы ампликона подтверждается ее положением по отношению к маркерным фрагментам и ДНК-стандарту.

Дополнительные доказательства специфичности ампликона можно получить путем расщепления его специфическими рестриктазами или путем гибридизации со специфическим радиоактивным или флуоресцентным олигонуклеотидным зондом.

В тест-системах фирмы «Хоффманн-Ла Рош», являющейся мировым лидером применения метода ПЦР в медицине, используются праймеры, меченые биотином. Соответственно меченым оказывается и продукт реакции амплификации – ампликон. При детекции биотин прочно связывается с авидином, входящим в состав конъюгата с пероксидазой хрена. Далее так же, как при иммуноферментном анализе, добавляется хромоген тетраметилбензидин (ТМБ) и субстрат (перекись водорода) для проведения ферментативной реакции, протекающей с изменением окраски раствора. Реакцию останавливают добавлением серной кислоты. Интенсивность окраски измеряют при 450 нм. Данный метод детекции дает объективную оценку анализа в виде значений оптической плотности, что позволяет использовать его не только для качественного, но и для количественного определения ампликона.

Аппаратура метода ПЦР. Основным прибором для проведения реакции амплификации (ПЦР) является термоциклер (амплификатор). Для выделения образца ДНК (или РНК) в лаборатории необходимо иметь центрифугу для микропроб с фактором разделения до 13 000, водяные бани, встряхиватель, ламинарные шкафы или боксы. Для детекции, выполняемой с использованием электрофореза, надо иметь электрофоретическую камеру, источник питания и денситометр.

Промышленностью выпускаются автоматические ПЦР-анализаторы, которые позволяют в автоматическом режиме выполнять амплификацию, детекцию и регистрацию результатов анализа. В состав такого прибора входит компьютер.

Применение метода ПЦР. Основное применение метод находит в медицине – это диагностика и мониторинг лечения инфекционных заболеваний, наследственных и онкологических болезней, типирование тканей.

По медицинской классификации метод ПЦР входит в группу методов, позволяющих обнаруживать последовательности нуклеиновой кислоты, специфичной для определенного вида возбудителя инфекционного заболевания. Эти методы являются реальным воплощением нового раздела диагностики, именуемой генодиагностикой.

Метод ПЦР обладает очень высокой чувствительностью, способной достигать теоретически возможного предела – детекции одной копии ДНК-матрицы. Другие достоинства метода ПЦР – высокая специфичность, универсальность процедуры выявления различных возбудителей, высокая скорость получения результата анализа и др. Универсальность метода ПЦР обусловлена сходством состава всех нуклеиновых кислот. Унифицированный метод обработки материала и детекции продуктов реакции в сочетании с автоматизацией процесса амплификации позволяют провести полный анализ за 4-4,5 часа.

ГЛАВА ПЯТНАДЦАТАЯ

ИММУНОИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

К их числу относятся методы, сочетающие применение меченных радиоизотопами, ферментами или флуоресцирующими красителями высокоспецифичных участников иммунной реакции (антител, антигенов) с инструментальными методами.

15.1. Радиоиммунологический анализ

Теоретические основы. Начало развития радиоиммунологических исследований положила работа Р. Ялоу и С. Берсона, опублико-

ванная в 1960 г. и посвященная иммунологическому определению эндогенного инсулина в плазме человека.

В радиоиммунологическом анализе (РИА) сочетается специфичность, присущая реакциям антиген-антитело (АГ-АТ), с чувствительностью и простотой, которые свойственны методам, использующим радиоактивную метку, введенную в состав антигена (или антитела).

В настоящее время существует большое число вариантов РИА, рассмотрение которых не входит в нашу задачу. Сущность РИА заключается в том, что если к раствору, содержащему в очень малой концентрации меченый АГ и немеченый АГ, добавить специфические АТ, обладающие по отношению к этим антигенам значительной аффинностью (сродством), то после установления равновесия количества связавшихся с АТ меченых и немеченых АГ будут прямо пропорциональны исходным концентрациям их в растворе. Замеряют радиоактивность комплекса АГ-АТ, которая зависит от концентрации немеченого АГ (при неизменной исходной концентрации меченого АГ). Если построить график зависимости радиоактивности АГ-АТ от концентрации стандартных растворов немеченых АГ, то по нему можно найти концентрацию немеченого АГ в опытном образце на основании замеренной радиоактивности образовавшегося комплекса АГ-АТ.

Техника выполнения РИА. Включает ряд операций, к числу которых относятся получение антител, меченых антигенов, выделение комплекса АГ-АТ и измерение его радиоактивности.

Идеальным вариантом было бы использование истинно моносpezifических АТ, но их трудно выделить, и это препятствует их широкому применению. Тем не менее в ряде случаев используются моноклональные антитела или АТ, полученные аффинной очисткой. Чаще же применяют антисыворотки, полученные путем иммунизации лабораторных животных исследуемым АГ. Вещества, являющиеся гаптенами (стероиды, медикаменты и продукты их метаболизма, простагландины, циклические нуклеозидмонофосфаты и др.), можно легко перевести в иммуногенное состояние, например путем присоединения к ним альбумина. В ряде случаев вместо антисыворотки используют неиммунологическое связывание антигенов транспортными белками плазмы крови, хотя их специфичность связывания и стабильность не всегда удовлетворительны.

Получение меченых АГ осуществляют в условиях *in vivo* путем включения радиоактивных изотопов ^3H , ^{14}C , ^{35}S в процессе биосинтеза или в условиях *in vitro* путем присоединения к АГ (белкам) изотопов йода (^{125}I , ^{131}I). Изотопу ^{125}I отдают предпочтение ввиду большего

периода полураспада (60 суток) вместо 8 суток у изотопа ^{131}I и большей пригодности для радиоавтографических исследований. ^{125}I дает γ -излучение с энергией порядка 35 КэВ. Из получивших признание методов йодирования следует отметить метод Макферлана с использованием хлористого йода в качестве окислителя; применение хлорамина Т по Хантеру и Гринвуду (окислителем является хлорноватистая кислота, отщепляемая от хлорамина Т; метка вводится с $\text{Na } ^{125}\text{I}$) и электрохимическое йодирование по Роза, при котором белок реагирует с атомарным йодом, освободившимся в результате электрохимического окисления на аноде (метка вводится с $\text{Na } ^{125}\text{I}$). Меченые АГ реагируют с АТ почти так же, как соответствующие немеченые вещества.

Отделение связанного с АТ меченого АГ от свободного меченого АГ является ответственной операцией, определяющей точность анализа. В зависимости от способа отделения связанного АГ от свободного различают несколько методов разделения.

Разделение в растворе. В случае проведения РИА в растворе разделение связанного и свободного антигенов осуществляют путем осаждения комплекса АГ-АТ, когда свободный АГ остается в растворе; осаждения свободного АГ, когда в растворе остается АТ и комплекс АГ-АТ; разделения свободных и связанных с АТ молекул АГ в растворе по размеру с помощью гель-фильтрации. Последний способ слишком трудоемок, что практически исключает его применение при исследовании большого количества образцов.

Наиболее широко используются методы, в которых осаждаются АТ (свободные и связанные с АГ). Если молекулы АГ по массе значительно меньше, чем АТ, осаждение осуществляют с помощью сульфата аммония или полиэтиленгликоля (ПЭГ). Если молекулы АГ велики (значительно больше 30 000-40 000 Да) или не имеют формы глобулы, то вместо ПЭГ используют вторые АТ, полученные путем иммунизации животного исходными АТ, принимающими участие в образовании комплекса АГ-АТ. В результате преципитации при инкубации со вторым АТ образуется преципитационная сетка и агрегаты, которые можно осадить. Другой метод разделения заключается в адсорбции свободного АГ на поверхности сорбента (уголь, тальк), при этом АГ, связанный с АТ, остается в растворе.

Разделение на твердой фазе. Вначале «пришивают» антитела к твердой поверхности, например к гранулам сефарозы, на стенки пробирки или пластиковой лунки. После того, как антитела сорбируются на названной поверхности, осуществляют инкубацию их с меченым и немеченым антигенами. Затем поверхность отмывают от несвязавшихся с ней АГ и измеряют радиоактивность. Метод связыва-

ния со стенками лунок пластикового планшета особенно полезен для обработки большого количества образцов. В этом случае перед измерением радиоактивности нужную ячейку вырезают из пластикового планшета.

Существуют и другие варианты проведения РИА, в частности метод двойной системы антител, неравновесный РИА. Сущность последнего из названных методов заключается в том, что меченый и немеченый антигены добавляются к антителам не одновременно, а последовательно: вначале вносится немеченый АГ, который свободно взаимодействует с АГ, а затем добавляется меченый АГ, после чего через небольшой, точно фиксируемый промежуток времени (чтобы не успело установиться равновесие) производят измерение радиоактивности. Этот метод обладает повышенной чувствительностью.

Кроме того, для определения различных антигенов (вирусов, гормонов и др.) в ряде случаев применяют меченые АТ, которые легко получить с помощью описанных выше методов использования радиоизотопа ^{125}I .

Применение РИА. Радиоиммунологический анализ обладает высокой чувствительностью и является простым и надежным методом определения многих биологически активных веществ. Антитела являются высокоспецифичными реагентами, которые иммунная система животного способна выработать практически на любое интересующее исследователя вещество. Это обстоятельство делает РИА универсальным методом определения в биологических пробах различных соединений. РИА применяется для количественного определения гормонов, ассоциированных с опухолями АГ, канцерогенных производных ДНК, фармацевтических препаратов. Этот метод анализа используется при изучении вирусных АТ, в диагностике аутоиммунных заболеваний, циркулирующих иммунных комплексов и т.д. Более подробные сведения о РИА изложены в ряде монографий иностранных авторов, переведенных на русский язык [4-6].

15.2. Иммуноферментный анализ

Теоретические основы. Иммуноферментный метод анализа (ИФА) основан на том же принципе, что и ранее рассмотренный РИА, только вместо радиоактивной метки применяется каталитическая (ферментная) метка. Этот метод был предложен в начале 70-х годов тремя независимыми группами исследователей Швеции, Нидерландов и США. Для получения иммуноферментного реагента антитела или антигены с помо-

щью бифункциональных соединений ковалентно связывают с подходящим ферментом. В качестве ферментной метки (фермента-маркера) используют пероксидазу, цитохром с, щелочную фосфатазу, глюкозооксидазу, D-β-галактозидазу, кислую фосфатазу и др. О количестве вступившего в иммунную реакцию конъюгата (АТ или АГ, меченные ферментом) судят по скорости превращения субстрата в продукт с помощью фермента-маркера.

Техника выполнения ИФА. Различают гомогенный и гетерогенный варианты ИФА. В основе гомогенного ИФА, применяемого для определения низкомолекулярных веществ (гаптенов), лежит ингибирование активности фермента при соединении его с гаптеном, которая восстанавливается после присоединения к конъюгату антитела, либо, наоборот, потеря активности маркерного фермента в результате реакции АГ-АТ.

При гетерогенном (твердофазном) ИФА АГ или АТ фиксируются на твердой фазе (например, в лунке пластикового планшета). Существует ряд вариантов гетерогенного ИФА. В качестве примера рассмотрим две схемы ИФА – конкурентную и неконкурентную со связыванием с твердой фазой антитела. В случае конкурентного ИФА (рис. 5.2) вначале осуществляют присоединение АТ к носителю (твердой фазе) за счет химической реакции или чаще путем физико-химического взаимодействия. Избыток АТ удаляют отмыванием и, внося строго определенное количество меченого АГ и различные количества немеченого АТ, строят калибровочный график. После окончания реакции АГ-АТ избыток АГ удаляют отмывкой, добавляют субстрат для фермента, по истечении определенного времени останавливают реакцию и осуществляют колориметрическое определение образовавшегося продукта.

К числу неконкурентных методов относится метод двойных антител («сэндвич-метод») (рис. 5.3). Фиксированные на твердой фазе АТ после отмывки инкубируют с анализируемым АГ. По окончании реакции АГ-АТ производят отмывку и добавляют избыточное количество меченых АТ (специфичных к этому же АГ). Несвязавшиеся АТ отмывают и добавляют субстрат. Продукт ферментативной реакции образуется в количествах, пропорциональных количеству связанного меченого АГ.

Применение ИФА. Метод обладает высокой чувствительностью, позволяющей определять минимальные количества вещества (нанogramмы). Область применения ИФА в целом соответствует области применения РИА. Однако ИФА по сравнению с РИА обладает рядом существенных преимуществ: не используются радиоизотопы; ста-

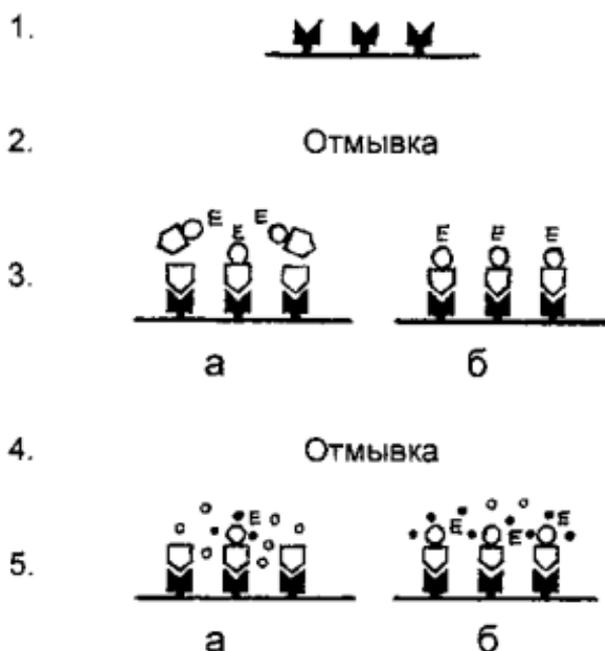


Рис. 5.2. *Схема конкурентного ИФА, антитела сорбированы на твердой фазе; антиген мечен ферментом [5]: 1 – связывание АТ с твердой фазой; 2 – отмывка; 3 – инкубация с меченым ферментом (Е) антигена в присутствии (а) и отсутствии (б) исследуемой пробы (немеченого АГ); 4 – отмывка; 5 – инкубация с субстратом (светлые кружки) и измерение продукта реакции (темные кружки)*

бильность конъюгатов позволяет хранить их в течение длительного времени (до года при температуре 4°); измерение оптической плотности проводят в видимом диапазоне; результаты ИФА можно оценивать полуколичественно без применения аппаратуры (визуально). ИФА очень легко поддается автоматизации и, вероятно, сможет полностью вытеснить РИА.

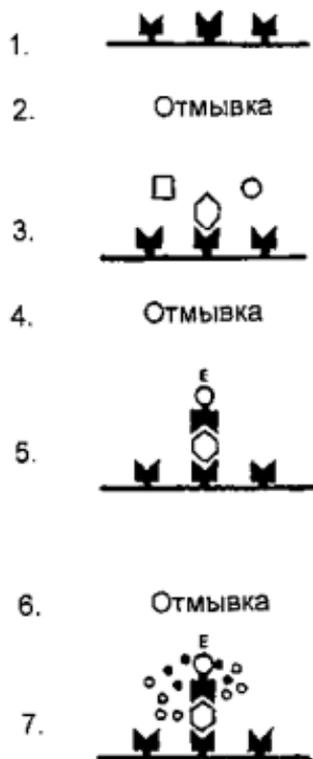


Рис. 5.3. Схема «сэндвич-ИФА» (метод двойных антител) для определения антигена [5]: 1 – связывание АТ с твердой фазой; 2 – отмывка; 3 – инкубация с пробой, содержащей немеченый АГ; 4 – отмывка; 5 – инкубация с конъюгатом АТ-фермент; 6 – отмывка; 7 – инкубация с субстратом (светлые кружки) и измерение количества продукта реакции (темные кружки)

15.3. Иммунофлуоресцентный анализ

Иммунофлуоресцентный метод основан на использовании специфичности иммунологической реакции и чувствительности флуоресцентной микроскопии. В отличие от других методов маркировки точная локализация иммунной реакции на поверхности клетки или ткани происходит довольно быстро. Один из компонентов иммунной реакции, как правило АТ, метится флуоресцирующим красителем. После возбуждения флуоресценции положение АГ становится доступным непосредственному наблюдению. Предложенный в 1941 г. Кунсом, этот метод

после многочисленных усовершенствований прочно вошел в лабораторную практику.

Известны прямой и непрямой методы иммунофлуоресцентного анализа (рис. 5.4).

В прямом методе искомым антигенный субстрат обнаруживают в ткани посредством соответствующей антисыворотки (АС), маркированной флуоресцирующим красителем, в качестве которого часто используют флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). Сам антиген может быть антителом (нижняя часть рис. 5.4). В этом случае конъюгат будет представлять собой меченое анти-антитело (Анти-АТ).

Непрямой метод применяется при определении антител (антигенов) в жидкостях или в тех случаях, когда нет подходящей меченой АС. При непрямом методе сначала дают содержащемуся в исследуемом объекте АГ прореагировать с немеченым специфическим АТ, а затем выявляют последний с помощью меченого Анти-АТ. Специальной формой непрямого метода является фиксация комплемента антителами (нижняя часть рис. 5.4). Антитела к комплементу мечены ФИТЦ. Комплемент представляет собой набор иммунных белков, содержащихся в свежей сыворотке крови животных и человека. Он участвует в бактерицидном действии крови. Препараты комплемента используют для обнаружения комплексов АГ-АТ.

Для одновременного анализа различных АГ в одной и той же ткани применяют АС, меченные двумя различными флуорохромами (метод двойной флуоресцентной метки). В качестве второй метки используют тетраметилпромадинизотиоцианат (ТРИТЦ).

Иммунофлуоресценцию исследуют при помощи флуоресцентных микроскопов, включающих специальные источники света, фильтры, УФ-оптику и т.д. Флуоресценцию ФИТЦ возбуждают голубым светом, ТРИТЦ – зеленым.

Важнейшей областью применения иммунофлуоресцентного анализа является обнаружение аутоантител (ААТ) в сыворотках пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Этот метод занял прочное место в лабораторной диагностике при определении антиядерного фактора, антимитохондриальных антител, АТ к щитовидной железе. Особенно удобными для иммунофлуоресцентного анализа оказались благодаря своей высокой специфичности и отсутствию загрязнения другими сывороточными компонентами моноклональные антитела. Обширную область исследования представляет применение этого метода в микробиологии.

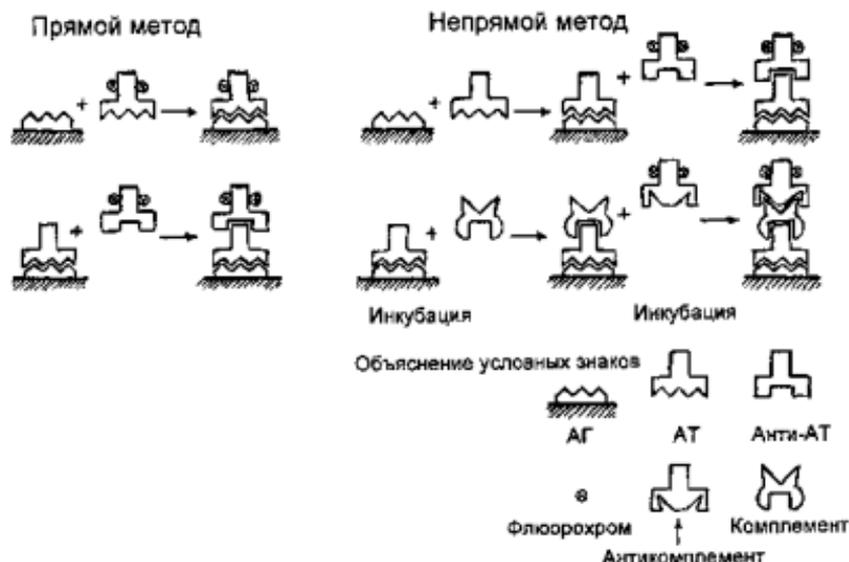


Рис. 5.4. Принцип иммунофлуоресцентного анализа [5]

15.4. Получение иммунных сывороток

Иммунные сыворотки (антисыворотки) являются обязательным реагентом для проведения иммунологического анализа. Антисыворотки к так называемым стандартным антигенам, например человеческому иммуноглобулину G (IgG), имеются в продаже. К нестандартным антигенам антисыворотки приходится получать в лаборатории. Получение АС в этих условиях включает три этапа: приготовление антигенов, иммунизацию животного и получение антисыворотки из отобранной у него крови.

Приготовление антигенов. В качестве антигенов в неинфекционной иммунологии могут использоваться экстракты, приготовленные из различных тканей животных и растений, взвеси клеток, сыворотка крови, чистые белки, выделенные из сыворотки, разных органов, тканей и клеточных компонентов. Антисыворотки могут быть получены к растворимым и нерастворимым антигенам бактерий, грибов и вирусов. Наиболее распространенными АГ являются белки, однако полноценными АГ могут быть и вещества небелковой природы, в частности полисахариды, липиды, нуклеиновые кислоты. Из-за большого разнообразия источников антигенов не-

возможно дать единые рекомендации для получения антигенного материала для иммунизации животных. Экстракты лучше всего получить из тканей только что забитого животного или сорванного растения. Перед забоем животного желательно произвести перфузию под эфирным наркозом теплым физиологическим раствором. Из взятого кусочка органа готовят гомогенат, который иногда используют в качестве антигена. Обычно же гомогенат разбавляют физиологическим раствором из расчета 9 мл на 1 г ткани, полученную суспензию переносят в стерильную пробирку и выдерживают в течение суток при температуре 4°. Затем пробирку тщательно встряхивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость отбирают и используют в качестве антигена. В качестве растворителя, помимо физиологического раствора, могут быть использованы различные солевые буферные растворы. Нерастворимые белки, например некоторые белки митохондрий, выделяют, добавляя в гомогенат неионогенный детергент тритон X-100 до конечной концентрации 0,1%.

Для получения сыворотки крови последнюю собирают из вены или сердца животного в стерильные пробирки, которые помещают на 30 мин в термостат при 37°. После этого сгусток крови отслаивают стерильной пастеровской пипеткой над огнем от стенок пробирки и оставляют на сутки при температуре 4° для ретракции (сокращения объема) сгустка. Затем сыворотку крови отсасывают от сгустка стерильной пастеровской пипеткой также над огнем, переносят в другие стерильные пробирки и центрифугируют в течение 10-15 мин при 850-1000 g с целью отделения от нее клеточных компонентов. После этого сыворотку разливают в стерильные ампулы и хранят до употребления в холодильнике при температуре -20°. Она может быть так же, как и ткани, высушена в замороженном состоянии.

Для получения взвеси клеток крови последнюю собирают в стерильные пробирки, содержащие 5%-ный раствор цитрата натрия в таком количестве, чтобы отношение объемов равнялось 1:1. Затем пробирки центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин, надосадочную жидкость удаляют, а осадок эритроцитов отмывают трижды физиологическим раствором. При этом к 1 объему осадка прибавляют 9-10 объемов стерильного физиологического раствора и центрифугируют в течение 3-5 мин при 1500 об/мин. После этого из осадка эритроцитов готовят 25, 50 или 75%-ную суспензию на физиологическом растворе, которую используют в дальнейших опытах в качестве антигена [7].

Получение иммунных сывороток. Для получения иммунных сывороток можно использовать различных животных, как теплокров-

ных, так и холоднокровных (например, рыб). Однако чаще всего для этой цели используют кроликов, которые отвечают образованием преципитирующих АТ, по-видимому, на наибольшее число различных антигенов, а образование иммунных преципитатов с кроличьей АС происходит в широких пределах колебаний соотношения концентраций АГ и АТ. Кроме того, кролики неприхотливы и не требуют больших помещений для содержания.

Известно, что способность организма вырабатывать АТ находится в определенной зависимости от веса, возраста, пола, состояния нервной и эндокринной систем иммунизируемых животных, а также от условий их содержания и кормления. Получение однотипной иммунной сыворотки производится на нескольких кроликах весом 2,5-3 кг из-за индивидуальности иммунологического ответа у разных особей. Одновременно это позволяет получать большие объемы АС. От одного кролика можно отбирать по 60-80 мл крови через 3-4 недели, не причиняя ему вреда.

Интенсивность образования АТ зависит от иммуногенности и концентрации введенного АГ. При иммунизации чистыми белками (получение моноспецифической АС) вводят малые количества АГ (по данным некоторых авторов, порядка 25 мкг/кг живого веса), тогда как смеси белков приходится вводить в количествах, на порядок больших (получение полиспецифической АС). Антиген можно вводить внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно или подкожно. Если иммунологичность антигенов невелика, их вводят со стимуляторами иммуногенеза, к которым относятся различные адсорбенты и адьюванты, обеспечивающие медленную ресорбцию антигенного материала из введенной эмульсии. К числу часто используемых стимуляторов иммуногенеза относится адьювант Фрейнда (ПАФ - полный адьювант Фрейнда), который выпускается в виде коммерческого препарата. В его состав входят минеральное масло, эмульгатор и убитые микобактерии туберкулеза. Неполный адьювант Фрейнда (НАФ) готовят, смешивая 1 объем ланолина с 2 объемами вазелинового масла.

Существуют различные схемы иммунизации. После первого введения антигенного материала с ориентировочным недельным интервалом иммунизацию повторяют, на что организм отвечает повышенным образованием АТ. Через некоторое время после повторной иммунизации, когда титр АТ в сыворотке животных падает, его можно вновь повысить однократным введением АГ.

На титр и специфичность полученных АС сильное влияние оказывает число инъекций АГ и продолжительность иммунизации. При ра-

боте с очищенными белками рекомендуется ограничивать число инъекций до минимума. Для получения же полиспецифических АС можно проводить многократные инъекции антигенного материала в несколько разных мест в течение длительного периода [8].

Взятие крови и получение АС. Перед взятием крови кролика рекомендуется обернуть куском материи так, чтобы свободной оставалась только голова. Для расширения вен ухо обрабатывают ксилолом и через 1-2 минуты вскрывают лезвием бритвы краевую вену, делая поперечный надрез. Кровь собирают в мерные стаканы по 60-70 мл от одного кролика. Затем ухо тщательно обрабатывают спиртом и физиологическим раствором для удаления ксилола [8].

Антисыворотку из отобранной крови получают так, как это описано выше для сыворотки крови.

Полиспецифическая АС к сывороточным белкам человека применяется для качественного анализа белков в нормальных и патологических состояниях. Из АС можно выделить иммуноглобулины. Для этого используют такие методы, как высаливание сульфатом аммония, осаждение этанолом, хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе или ДЭАЭ-сефадексе и др. Олигоспецифическую сыворотку можно сделать моноспецифической, удалив АТ с нежелательной специфичностью с помощью адекватных сорбентов. Как правило, для этого используют нерастворимые иммуносорбенты, получаемые при соединении антигена с инертным носителем, например, с помощью глutarового альдегида. После соединения АТ с АГ иммуносорбента его отмывают, затем изменением рН или ионной силы разрывают связь, удерживающую АТ на иммуносорбенте.

Существуют и иные способы получения моноспецифических АС [4,5].

РАЗДЕЛ ШЕСТОЙ

МОДЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

ГЛАВА ШЕСТНАДЦАТАЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛЕЙ В БИОХИМИИ

16.1. Модели и их классификация

Глубокое осмысление сущности явлений, прогнозирование судьбы систем, исследование их поведения в ответ на управляющие и возмущающие воздействия, построение фазовых траекторий и многие другие задачи удобнее, легче и дешевле решать с помощью моделей. Более того, существуют такие проблемы, при исследовании которых вообще невозможно экспериментирование на реальных объектах, например в демографии, глобальной экологии, ретроспективных изысканиях и др. Модель исследуемой системы (оригинала) – это какой-то другой объект, обладающий некоторыми свойствами (статическими, динамическими), сходными с оригиналом, или абстрактная мыслительная конструкция, отображенная формальным языком, анализ которой может быть выполнен имеющимися в науке средствами.

Существует большое число классов моделей и не меньшее количество их классификаций. В основу одной из них (рис. 6.1) положен комплекс признаков, что придает ей определенную непротиворечивость и убедительность [1,2].

Прежде всего, модели по способу реализации подразделяют на материальные (реальные) и идеальные (знаковые). В основе работы **реальных** моделей лежат процессы, качественно сходные с протекающими в оригинале (**натурные модели**), или процессы иной физической природы, но описываемые сходными математическими формулами (**аналоговые модели**). Идеальные модели представляют собой описание оригинала с помощью определенного набора символов и операций над ними.

Идеальные модели, в отличие от реальных, не требуют вещественного воплощения. В основе подразделения их на концептуальные и математические лежит степень наглядности, содержательности, возможности анализа и другие. Концептуальные модели обладают высокой наглядностью, гибкостью, универсальностью, однако им

присущи известная статичность, неоднозначность интерпретации и некоторые другие недостатки. Эти модели являются более формализованным вариантом традиционного описания изучаемых явлений.



Рис. 6.1. Схема-классификация моделей

Концептуальные модели делят на вербальные (словесные) и графические. **Вербальные** модели представляют собой четкое словесное описание явления в терминах соответствующей науки, отражающее существенные связи между взаимодействующими элементами системы. В **графических** моделях, которые обычно изображают в виде схем, таблиц, блок-схем и прочего иллюстративного материала, линиями или стрелками обозначаются связи между взаимодействующими элементами системы, направление материальных, энергетических и информационных потоков, благодаря чему графические модели обладают высокой наглядностью.

Математические модели менее наглядны, чем концептуальные, однако они отражают строго количественные взаимоотношения между величинами, характеризующими моделируемое явление. В том случае, если связь между величинами выражена в форме уравнения или системы уравнений, имеет место **аналитическая** модель, важ-

ным достоинством которой является возможность анализа ее с помощью принятых в математике методов. Если же такие уравнения создать не удастся, но явление может быть описано количественно с помощью определенного алгоритма вычислений, модель будет называться **численной**, или имитационной. Анализ ее осуществляется по иным правилам, отличным от таковых для аналитических моделей. В настоящее время для анализа математических моделей часто используются численные методы, технически реализуемые на цифровых ЭВМ. В этом случае процедуры анализа аналитических и численных моделей сближаются. Промежуточный вариант представлен **комбинированными** моделями, включающими аналитические и имитационные блоки. Аналитические модели описывают системы (блоки), для которых получены аналитические зависимости; имитационные модели соединяют аналитические блоки, если не удастся найти уравнения, связывающие их между собой.

Все три вида математических моделей могут быть дискретными и непрерывными, детерминированными и стохастическими, точечными и пространственными, статическими и динамическими. Если исследуемый показатель изменяется скачкообразно, то математическая модель, включающая такой показатель, будет дискретной; если же показатель изменяется плавно, модель будет непрерывной. Математические уравнения в этих случаях различаются между собой. Если процесс абсолютно точно предсказуем, модель будет детерминированной, а если предсказуем с определенной, не 100%-ной вероятностью, модель будет стохастической. Всякое явление протекает во времени и пространстве. Если пространственное распределение объектов системы не рассматривается, то модель называется точечной, или моделью с сосредоточенными параметрами. Если же учитывается пространственное положение элементов системы, создают модель с распределенными значениями. Модель, учитывающая только взаимосвязь между элементами системы, называется статической. Если же она отражает характер изменения параметров системы во времени, то модель называется динамической. Модель, описывающая динамику общей численности популяции, будет динамической с сосредоточенными параметрами, а описывающая эту динамику отдельно для разных возрастных групп и полов (возрастно-половая динамика) будет динамической с распределенными значениями.

Следует несколько слов сказать о месте математики среди естественных наук. Математика обладает предельной степенью абстрактности; она имеет дело с безразмерными величинами (символами),

за которыми в уравнениях, описывающих природные явления, могут стоять конкретные именованные величины, имеющие любую размерность. В этом отношении математика стоит над естественными науками и занимает по отношению к ним такое же место, какое занимает философия с ее абстрактными категориями (за которыми тоже стоят разные конкретные явления) по отношению ко всем проявлениям материального и духовного мира.

С учетом подразделения биосистем по сложности и соподчиненности на уровни организации и среди математических моделей устанавливаются определенная иерархия. А.А. Дородницын [3] выделяет общую математическую модель, частные модели и модели конкретных явлений, причем в развитии науки процесс построения моделей, как правило, идет от нижнего уровня к верхнему.

16.2. Материальные модели

Натурные модели. Биологические системы, даже стоящие на нижней ступени иерархии, например клетки, своего рода кванты живого, настолько сложны, что их изучение предполагает расчленение на относительно простые части и всестороннее исследование структуры и функции этих частей (анализ). В биохимии такая «разборка» клеток на составляющие части осуществляется с помощью гомогенизации, центрифугирования и последующего «разложения» оформленных структур фракций на отдельные виды молекул, которые изучают с помощью инструментальных методов. Эти молекулы, прежде всего биомакромолекулы, оказываются в иных, отличных от нативных условиях. Нативные условия *in vitro* полностью создать невозможно, да они точно и неизвестны. Искусственные же условия, в которых изучается, например, активность фермента, хотя и не являются нативными, но зато могут полностью контролироваться и изменяться по воле исследователя. Поэтому эксперименты с биомолекулами или внутриклеточными структурами, выведенными из состава клетки, лишенными привычного окружения и связей с другими молекулами и структурами, проводимые в условиях *in vitro*, могут быть отнесены к натурному моделированию. Моделируются в этих экспериментах как условия, в которых проявляют свои функции биоструктуры, так и реакция последних на эти условия. Кроме того, исследуется изменение строения биоструктур в ответ на изменение условий.

При создании теории возникновения жизни в лабораториях моделировались предполагаемые условия на нашей планете в тот период, исследовались молекулы, которые могли бы со временем послужить материалом для синтеза биомолекул. Более поздние периоды эволюции

жизни моделировались с помощью искусственно созданных коацерватов, имитирующих поведение многомолекулярных систем.

Наибольшее распространение получило моделирование при исследовании молекулярного механизма ферментативного катализа. Для выявления участков молекулы, принимающих участие в ферментативном процессе, осуществляли химическую модификацию как самого фермента, как и субстрата. В результате этих исследований было установлено, что вместо естественных субстратов, на которые действуют ферменты в клетке, можно применять синтетические субстраты. Так, катепсин А способен гидролизовать синтетический субстрат карбобензоксил-L-глутамил-L-тирозин, а катепсин В – амиды бензоил-L-аргинина и бензоил-L-лизина, β -нафтиламид и др. Активные группы ряда важных ферментов содержат комплексно связанный металл. Поэтому вполне естественно, что одной из задач моделирования было выяснение возможностей использования комплексных соединений в качестве катализаторов. Особенно часто моделировались окислительно-восстановительные ферменты, а излюбленным объектом моделирования была каталаза, активная группа которой является металлопорфирином. Модели активной группы каталазы искали среди комплексных соединений различных металлов. В модельных экспериментах были получены сведения об оптимальных значениях pH, температуры, активаторах, ингибиторах, в частности о субстратном торможении ферментативной реакции. Наряду с истинными биологическими катализаторами (ферментами) моделировался каталитический процесс, осуществляемый с участием искусственных ферментов – абзимов. Они представляют собой антитела, которые специфически связывают молекулы и образуют комплексы, химически близкие переходному состоянию, образующемуся в процессе катализа.

Наряду с ферментами моделировались функции и других макромолекул и макромолекулярных комплексов. В частности, исследовались модели механохимии мышц. В.А. Энгельгардт с сотр. в качестве такой модели использовали актомиозиновые нити. Было установлено, что для работы такой модели необходимы АТФ, ионы кальция. Принцип моделей для изучения механохимии мышц был затем в различных вариантах использован очень многими авторами.

В иммунологии *in vitro* моделировали процессы, связанные с образованием комплекса АГ-АТ, конкурированием различных АГ при образовании комплекса АГ-АТ, специфичностью связывания и прочностью связи между АГ-АТ и др. В клеточной инженерии были проведены

серьезные модельные эксперименты при разработке технологии получения моноклональных АТ. Проводились они и при внедрении в лабораторную практику иммуноферментного метода.

Моделировались и более сложные процессы, например редупликация ДНК. В частности, полимеразная цепная реакция, лежащая в основе одноименного метода, позволяет осуществить в пробирке при помощи термостабильной ДНК-полимеразы амплификацию фрагмента ДНК.

Одной из важнейших клеточных структур, свойства которой изучаются с помощью моделей, является мембрана. Наиболее широко используются два типа модельных систем – плоские фосфолипидные бислои и фосфолипидные везикулы. Простейшая модель мембраны – мономолекулярная пленка липидов на поверхности воды. Плоские мембраны – это бимолекулярные слои липидов, технику получения которых разработали лишь в 1962 году. Наряду со сходством искусственных плоских мембран с биомембранами (электрическая емкость, напряжение разрыва, коэффициент преломления) имеются и различия. Плоские бислои практически непроницаемы для катионов щелочных металлов в противоположность природным мембранам, для которых характерна высокоизбирательная ионная проницаемость. Отсутствуют у искусственных бислойных мембран пассивный и активный транспорт, электрическая возбудимость; электрическое сопротивление плоских фосфолипидных мембран на несколько порядков выше, чем у биомембран. Все это связано с отсутствием белковых структур, включенных в мембрану. Поэтому для моделирования функциональных свойств биомембран возникает необходимость внедрять в искусственные бислои различные мембраноактивные соединения (например, ионофоры) или структуры, присущие природным мембранам (белки, в том числе ферменты). При введении в липидный бислой хлорофилла была получена искусственная фоточувствительная мембрана, в которой свет генерировал поток электронов. Искусственные бислои имеют ряд недостатков и ограничений, от которых свободна другая модельная система – липидные пузырьки (везикулы), часто называемые липосомами. Они могут быть многослойными и монослойными (состоят из одного бислоя). Поскольку липосомы замкнуты, их можно «начинять» различными веществами, что открывает новые возможности для моделирования. Интересные эксперименты были проведены по изучению взаимодействия липосом с клетками.

В настоящее время очевидно, что большая часть внутриклеточных ферментов функционирует в среде, подобной гелю, или же они встроены в мембраны органелл (митохондрий, хлоропластов и др.). Поэтому иммобилизованные ферменты являются хорошими моделями для изучения действия ферментов в условиях клетки. При исследовании ферментов, иммобилизованных на мембране, было выявлено влияние степени ее гидрофобности на их параметры, в частности на значение константы Михаэлиса. Многоэтапные ферментативные процессы исследовали на моделях, представляющих собой разные ферменты, иммобилизованные на сефарозе. Так, например, на цианобром-активированной сефарозе были иммобилизованы гексокиназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, совместным действием которых глюкоза превращалась в 6-фосфоглюконолактон. Реакция протекала быстрее в иммобилизованной системе, поскольку продукт первой реакции – глюкозо-6-фосфат – поступает ко второму ферменту в большей степени, чем в свободной системе из двух ферментов. Аналогичный результат был получен в комбинации из трех иммобилизованных ферментов (β -галактозидаза – гексокиназа – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа), последовательная работа которых превращает лактозу в 6-фосфоглюконолактон. С помощью иммобилизованных ферментов Зигбаном и Мосбахом была создана многоэтапная модельная ферментная система, имитирующая орнитинный цикл. Система включала четыре фермента орнитинового цикла (орнитин-карбамоил-трансфераза – аргининосукцинат-синтетаза – аргининосукцинат-лиаза – аргиназа), иммобилизованных на сефарозе. В этой системе также ферментативный процесс протекал быстрее, чем с ферментами, находящимися в растворе в свободном состоянии.

В модельных экспериментах использовались такие органеллы, как митохондрии, рибосомы и др. При изучении окислительного фосфорилирования использовались препараты митохондрий. В частности, при исследовании митохондрий из дрожжей разрушение последних осуществляли с помощью энзиматического метода, основанного на способности пищеварительного сока улитки переваривать в определенных условиях оболочку дрожжевых клеток с образованием протопластов. Последние разрушаются при очень мягких механических или осмотических воздействиях, так как содержимое клетки в протопластах покрыто лишь клеточной мембраной. Этот способ позволяет выделить дрожжевые митохондрии в наиболее интактном состоянии и с хорошим выходом.

Рибосомы, выделенные из клеток, позволили *in vitro* расшифровать генетический код. Путь к полному раскрытию кода нашел в 1965 г. М. Ниренберг. Он смешивал рибосомы с транспортными РНК, несущи-

ми свои аминокислоты, и синтетической «мини-матрицей», состоящей из соединенных в определенной последовательности всего лишь трех оснований, представляющих один кодон. При пропускании такой смеси через специальный фильтр рибосомы, триплетная матрица и одна из транспортных РНК с присоединенной аминокислотой задерживались на фильтре. Каждый триплет вызывал связывание с рибосомами и, следовательно, задержку на фильтре транспортной РНК, несущей только одну аминокислоту. С помощью этого метода М. Ниренберг выяснил, какие именно триплеты кодируют ту или иную аминокислоту.

В модельных экспериментах, в частности по реконструированию клетки, основанному на получении клеточных фрагментов и их последующем объединении в жизнеспособную клетку, исследовались отдельные препараты цитопластов и кариопластов, выделенные с помощью специально разработанных методов. В отличие от митохондрий и рибосом эти компоненты клетки представляют собой более сложные образования. Кариопласт – это изолированное клеточное ядро, окруженное тонким ободком цитоплазмы и плазматической мембраной, а цитопласт – безъядерная цитоплазма, окруженная неповрежденной плазматической мембраной и содержащая все обычные компоненты, присущие цитоплазме нормальной клетки. Реконструировать клетки можно путем слияния разнородных (полученных от разных объектов) ядер и цитоплазмы. Модельные эксперименты с кариопластами и цитопластами позволили решить ряд важных общебиологических задач.

Вопросы реконструирования биосистем молекулярного, доклеточного и клеточного уровней, то есть воссоздание их из составляющих частей, также решаются в модельных экспериментах. Сюда относятся работы по формированию вторичной, третичной и четвертичной структур белковых молекул, сборке вирусов, цилиндрических структур клетки (жгутиков бактерий, микротрубочек и др.), клеточных мембран, реконструкции рибосом и др.

Аналоговые модели. Наряду с рассмотренными натурными моделями, которые отражают динамику биосистем, существуют статические модели. Среди них следует отметить модели, представляющие собой многократно увеличенные изображения молекул, выполненные по определенным правилам из различного материала, не имеющего ничего общего с химическим составом моделируемой молекулы.

Научная атомистика ведет свое летоисчисление от английского химика и физика Дж. Дальтона (Дултона). Для демонстрации строения моле-

кул в начале XIX века он использовал модели, составленные из деревянных шариков, которые скреплялись между собой металлическими штырями. Эти модели, как и продававшиеся в середине XIX века с деревянными квадратиками-атомами, носили условный характер и предназначались для студентов, изучающих органическую химию. Но большее отношение к реальности имели «роликовые» модели А. Кекуле. В 1865 г. немецкий химик-органик А. Гофман предложил шаростержневые модели, в которых роль атомов играли крокерные шарики, а роль соединяющей их силы – спицы. Они получили распространение под названием глиптические модели (глиптика – искусство резьбы на камне). Модели А. Гофмана были плоскими. Однако вскоре появились новые модели А. Кекуле, в которых гофмановским моделям была придана трехмерность. Нидерландский физикохимик Я.Х. Вант-Гофф, исходя из предложенного им расположения атомов водорода в молекуле метана в виде тетраэдра, использовал модели в виде картонных пирамидок.

Самым удобным представлением структуры молекул является точная молекулярная модель. Она незаменима при постановке любых экспериментов, основанных на знании полной структуры белка, например при поиске центров связывания субстратов и эффекторов. Однако такие модели громоздки и дорого стоят, чем объясняется их сравнительно малая распространенность.

Более широко используются проволочные модели Кэндрию-Уотсона. Они наиболее точны и строятся обычно непосредственно по карте электронной плотности, полученной при рентгеноструктурном анализе кристалла вещества. Положения атомов в моделях специально не обозначены, они соответствуют точкам разветвления и концам проволочек. Валентные углы, длины связей и пептидные звенья (в моделях белков) в этой модели жесткие, но могут быть деформируемы. Поскольку используют только тонкие проволочки и винты, модели хорошо просматриваются. Они строятся в масштабе 1 ангстрем = 20мм.

Другая весьма распространенная модель собирается из вставляемых одна в другую пластиковых деталей, предложенных Николсоном. В такой модели учитываются все атомы: неводородные атомы представлены шариками, а атомы водорода – связями, ведущими к ним. Положительно и отрицательно заряженные группы, гидроксильные группы, ароматические части и сера имеют свою окраску; основная цепь окрашена в белый цвет и хорошо просматривается. Модели Николсона более компактны (1 ангстрем = 10 мм), удобны для знакомства с молекулярной структурой, хотя и далеко не столь точны, как модели Кэндрию-Уотсона.

Объемные модели, предложенные Кори, Полингом и Колтенем (КПК), построены в масштабе 1 ангстрем = 12,5 нм. Поскольку при построении всей модели внутренняя часть молекулы становится невидимой, то модели такого типа иллюстрируют только свойства поверхности. В связи с этим их используют преимущественно при выявлении центров присоединения субстрата или эффектора.

Рентгеноструктурный анализ – единственный метод, который может многое рассказать о пространственном строении макромолекул. Чтобы сделать рентгеновские данные видимыми, то есть перевести в объемную форму молекулы, строят точные молекулярные модели. Для этого берут разноцветные пластмассовые шарики или сегменты, изображающие атомы, и соединяют их между собой проволочками, чтобы конструкция соответствовала химической формуле. Затем вращают отдельные куски конструкции вокруг осей проволочек (химических связей), чтобы конструкция соответствовала рентгенограмме. Так делают до тех пор, пока модель и рентгенограмма не совпадут. Этот метод впервые применил для открытия структуры белков Л. Полинг, а Крик и Уотсон – для расшифровки пространственной структуры молекулы ДНК. По данным рентгеноструктурного анализа Кендрию построил объемную модель миоглобина, а Перутц - гемоглобина.

Аналоговые модели можно применять и для анализа сложных метаболических путей, в частности в учебных целях. Так, автором была разработана конструкция универсальной модели из множества одинаковых триггерных элементов, имитирующих единичные ферментативные реакции. Элемент состоял из логической микросхемы с несколькими входами и выходом, выведенными на плоскую панель. Входы имитировали участников ферментативной реакции (субстраты, коферменты, макроэргические соединения), выход - образующийся продукт. Если имелись все необходимые участники реакции, то на все входы подавалось электрическое напряжение и на выходе логической микросхемы тоже появлялось напряжение, о чем свидетельствовало загорание светодиода, имеющегося в каждом элементе. Конкретная метаболическая схема рисовалась на плотной бумаге, которая накладывалась на панель. В соответствии с этой схемой проволочными переключателями осуществлялась коммутация входов и выходов. Отключением одной из переключателей имитировалось влияние на работу всей метаболической схемы отсутствие одного из участников реакции.

Универсальным прибором для построения аналоговых моделей является аналоговая вычислительная машина (АВМ). В частности, осуществляя коммутирование входов и выходов операционных блоков

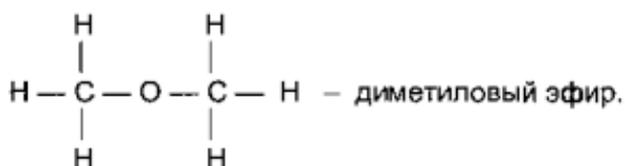
АВМ в соответствии с математической моделью – уравнением ферментативной реакции, можно создать аналоговую модель и с ее помощью в графической форме на экране электронно-лучевой трубки получить картину протекания ферментативной реакции. Решение на АВМ широкого круга задач из различных областей биологии представлено в [7].

16.3. Идеальные модели

Концептуальные модели. Любое понятие, существующее в биохимии, имеет, в зависимости от степени его изученности, более или менее четкое словесное описание, которое и представляет собой вербальную модель. Она строится на основании сведений, полученных в экспериментах или путем наблюдений, и по мере расширения объема этих сведений, а также уточнения их может корректироваться. Мыслительная деятельность человека невозможна без вербальных моделей, они – язык науки и фундамент, на котором строятся математические модели.

Графические модели представляют собой наглядное схематическое выражение сущности, изложенной словами в вербальной модели.

В биохимии, как и в химии вообще, с помощью графических моделей записывают уравнения отдельных реакций, например: $2\text{H}_2 + \text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O}$; изображают метаболические схемы (рис. 6.2), нередко дополняя их численными значениями отдельных параметров (рис. 6.3), а также представляют структурные формулы молекул, в частности:



Легко видеть, что структурные модели – это, по сути, плоские или объемные рисунки рассмотренных ранее аналоговых моделей, у которых атомы-шарики заменили символами химических элементов, а химические связи-проволочки – линиями. В связи с бурным развитием компьютерной техники и программирования появилась возможность манипуляцию с аналоговыми моделями молекул при установлении пространственной структуры последних заменить более оператив-

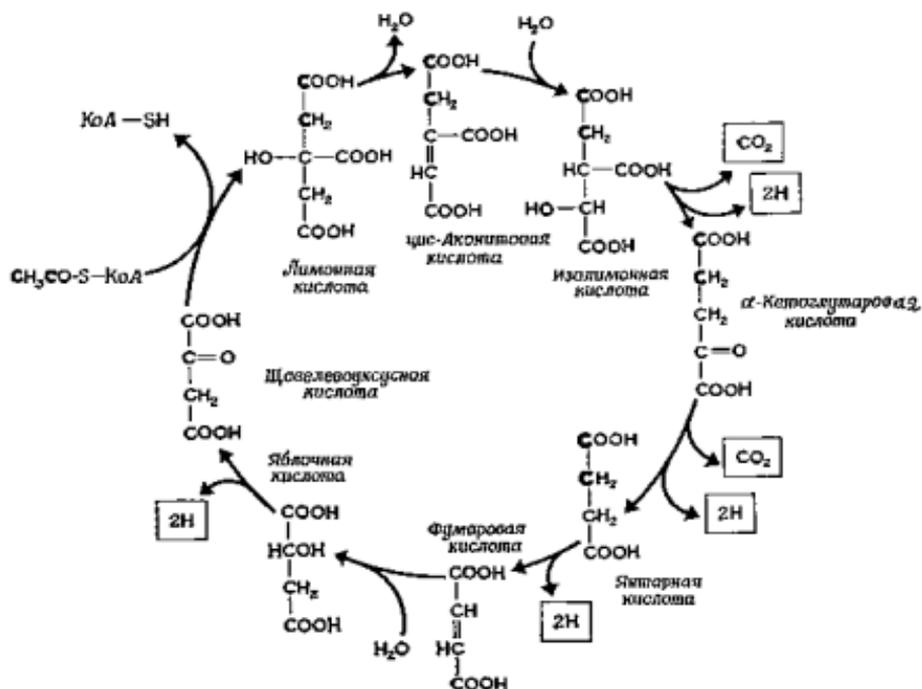


Рис. 6.2. Цикл трикарбоновых кислот [6]

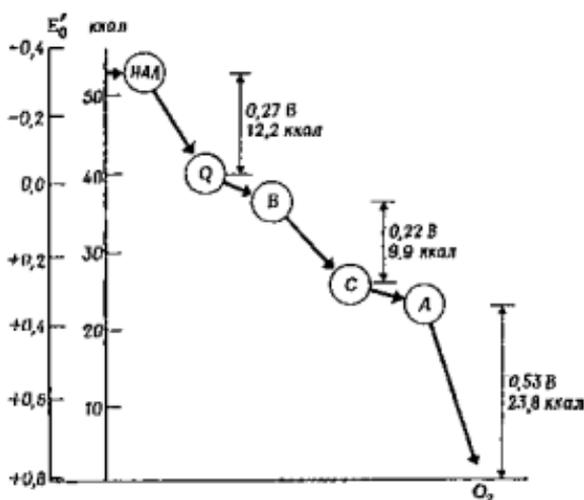
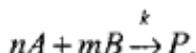


Рис. 6.3. Уменьшение свободной энергии, обусловленное перемещением пары электронов по дыхательной цепи к кислороду [6]

ными процедурами, выполняемыми на экране монитора. При этом используется пакет компьютерных программ для визуализации пространственной структуры молекул, например Nuser Chem. Получаемое на экране изображение является графической моделью структуры молекулы.

Описанные выше аналоговые триггерные модели для анализа сложных метаболических путей также можно заменить графическими моделями, реализуемыми с помощью компьютера. Использование современных визуальных технологий программирования позволяет, например с помощью языка Delphi, осуществлять это на экране монитора.

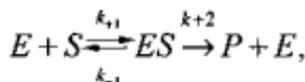
Математические модели. Использование математических моделей является актуальным для решения самых разных биохимических задач. В настоящее время математические модели наиболее широко применяются в кинетике ферментативных реакций. Для нахождения уравнения скорости химической реакции, представляющего собой математическую модель, необходимо закон действующих масс Гультберга-Вааге дополнить уравнением химической реакции (графическая модель):



В соответствии с законом действующих масс, скорость химической реакции (v) прямо пропорциональна произведению молярных концентраций реагирующих веществ (A и B), взятых в степенях, равных стехиометрическим коэффициентам соответствующих веществ (n и m) в уравнении реакции, то есть

$$v = k[A]^n[B]^m.$$

В случае с односубстратной, односторонней реакцией, которой соответствует графическая модель



применение закона действующих масс позволило вывести уравнение скорости образования продукта P (уравнение Михаэлиса-Ментен):

$$v_{+2} = k_{+2}[E_0][S]/(K_m + [S]),$$

где $[E_0]$ и $[S]$ соответственно концентрации фермента и субстрата; K_m - константа Михаэлиса.

Как и в случае с химическими уравнениями в целом, уравнение скорости приведенной ферментативной реакции решает и чисто мето-

дическую задачу: оно помогает спланировать эксперимент по нахождению численных значений констант k_{+2} и K_m . Из уравнения следует, что K_m представляет собой концентрацию субстрата, при которой скорость реакции v_{+2} равна половине максимальной (V), а последняя достигается при насыщающих концентрациях субстрата, когда дальнейшее повышение не ведет к увеличению скорости. Записывая уравнение скорости реакции в обратных значениях переменных с учетом того, что $V = k_{+2}[E_0]$, получим уравнение Лайнуивера-Берка:

$$1/v_{+2} = K_m/V[S] + 1/V,$$

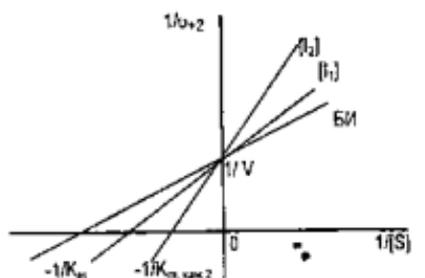
которое позволяет графическим путем определить значение V по точке пересечения графика (прямая линия) с осью ординат ($1/v_{+2}$), а K_m – по точке пересечения с осью абсцисс ($1/[S]$). Поскольку $k_{+2} = V/[E_0]$, то, зная молярную концентрацию $[E_0]$ и максимальную скорость V , можно вычислить значение k_{+2} . Подставив значения k_{+2} и K_m в уравнение Михаэлиса-Ментен, можно вычислить скорость реакции для любого сочетания концентраций фермента и субстрата.

Графики, построенные по уравнениям ферментативных реакций, позволяют как бы видеть (умозреть) поведение молекул в ходе этих реакций, раскрывать их молекулярный механизм. Так, форма графиков и расположение их в поле осей $1/v_{+2} - 1/[S]$ имеют характерные особенности, присущие каждому виду ингибирования (рис. 6.4).

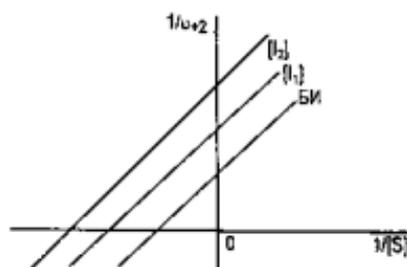
Установив тип ингибирования, можно судить о месте присоединения ингибитора к молекуле фермента. Так, при конкурентном торможении ингибитор присоединяется к зоне связывания фермента, при неконкурентном – к фермент-субстратному комплексу (ES), а при субстратном (один из распространенных вариантов) – каждая из двух молекул субстрата присоединяется к разным участкам зоны связывания («контактным площадкам»).

Аналогичным образом, по расположению графиков в осях Лайнуивера-Берка, можно судить о механизмах связывания субстратов с ферментом в двухсубстратных реакциях. Так, при неупорядоченном механизме с независимым связыванием графики зависимости $1/v_{+2}$ от $1/[S]$ (прямые линии) для одного из субстратов при фиксированных значениях другого субстрата пересекаются в одной точке, расположенной на оси абсцисс, при упорядоченном механизме и неупорядоченном механизме с взаимозависимым связыванием – в точке, расположенной в третьем квадранте, а при механизме «пинг-понга» все графики располагаются параллельно друг другу [4].

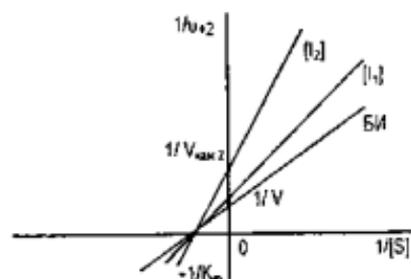
Математические модели кинетики ферментативных реакций относятся к числу детерминированных и динамических, поскольку она изучает



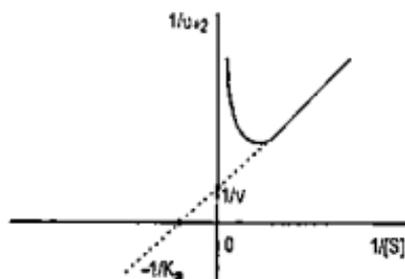
КИ (полный и частичный эффект торможения)



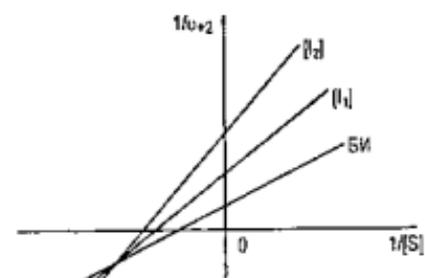
БКИ (полный эффект торможения)



НКИ (полный эффект торможения)



Субстратное торможение



НКИ (частичный эффект торможения)
СИ (один из вариантов)

Рис. 6.4. Зависимость скорости односубстратной односторонней реакции от концентрации субстрата для различных вариантов ингибирования. Обозначения: $[I_1]$, $[I_2]$ – концентрации ингибиторов (в порядке повышения); БИ – без ингибитора; КИ – конкурентное ингибирование; НКИ – неконкурентное ингибирование; СИ – смешанное ингибирование; БКИ – бесконкурентное ингибирование; $V_{каж2}$, $K_{m,каж2}$ – кажущиеся значения V и K_m для концентрации $[I_1]$.

скорости реакций, то есть явления, связанные со временем. Наряду с динамическими моделями для биохимии большой интерес представляют статические модели, особенно те, которые устанавливают связь между строением молекул и их биологическими свойствами. Это связано, с одной стороны, с искусственным синтезом химических соединений, направленно воздействующих на биосистемы, с другой – конструированием белковых молекул с наперед заданными свойствами.

Знание связи между структурой и активностью необходимо для конструирования лекарств, а также многих других видов биологически активных соединений, таких как гербициды, пестициды, обонятельные и вкусовые стимуляторы. На этом пути лежит ключ к пониманию механизмов токсического, мутагенного или канцерогенного действия целого ряда химических соединений. Основная исходная посылка методов конструирования биологически активных соединений заключается в том, что близкие по структуре соединения оказывают сходное действие. Согласно этому представлению, небольшие изменения в структуре должны сопровождаться и соответственно небольшими изменениями в биологической активности. Путем систематического варьирования структуры молекулы может быть получено соединение с требуемыми свойствами. К сожалению, количества возможных изменений даже небольших молекул выражаются астрономическими числами. Выбор направления структурной модификации может быть осуществлен с помощью теоретических моделей, использующих сложный математический аппарат [5].

Еще более сложной задачей, чем драгдизайн (конструирование лекарственных препаратов), является создание пептидов и белков с заданными свойствами. Успехи синтетической пептидной химии, ферментативного синтеза пептидов и особенно генетической и белковой инженерии открыли широкие возможности не только направленной реконструкции белков, но и созданию новых, не существующих в природе белков с нужными человеку свойствами. Для этого необходимо установить связь между первичной структурой белковой молекулы и ее функциональными возможностями. Поскольку биологические функции белковой молекулы проявляются на уровне третичной (нередко и четвертичной) структуры, одновременно необходимо установить механизм формирования этих высших структур и связь конформации белковой молекулы с ее первичной структурой. Большую помощь при решении этой задачи играет моделирование функционально важных участков белков (натурное моделирование) и, конечно, использование математических моделей (детерминированных и стохастических).

Математическими методами биологи традиционно пользуются при статистической обработке экспериментального материала, порядок выполнения которой изложен в соответствующих руководствах, например в книге Г.Ф. Лакина [8]. Однако математическое моделирование биологических процессов, несмотря на наличие монографий, специально написанных для студентов книг [2,9] и рекомендованного Минвузом учебного пособия [10], особого энтузиазма у биологов не вызывает.

Инструментальные методы исследования дают первичную, непосредственно воспринимаемую органами чувств информацию, которая должна быть осмыслена и превращена в научное знание. Этот процесс начинается с построения вербальной модели, которую затем необходимо превратить в математическую, желательна аналитическую модель, количественно отражающую причинно-следственные отношения между явлениями в живой природе. Математический аппарат идеально приспособлен для решения многих проблем биологии, ибо уже в написании алгебраического уравнения с двумя переменными содержатся аргумент (независимая переменная, выполняющая в большинстве случаев роль причины) и функция (зависящая от аргумента переменная, обычно выполняющая роль следствия).

Поскольку живые биосистемы относятся к открытым системам, уравнивание осуществляется по скоростям поступления в них веществ и выхода их наружу, а отсюда – превалирование дифференциальных уравнений над алгебраическими, которые обычно отражают материальный баланс (по веществам) и выполняют вспомогательную роль. Все это наглядно проявляется, в частности, при выводе уравнения Михаэлиса-Ментен ($d[ES]/dt = 0; [E] + [ES] = [E_0]$).

Тем не менее, многие сложные проблемы биологии, прежде всего – морфогенез, требуют создания особого математического аппарата или приспособления уже имеющегося.

Математический стиль мышления помогает выделять в исследуемом явлении существенное и отбрасывать несущественное (частное).

Следует иметь в виду и терминологическую ограниченность вербальных моделей, которая обусловлена типичным для всех млекопитающих, небогатым набором органов чувств, с помощью которых люди воспринимают окружающий мир. Чтобы представить себе все его многообразие на понятном уровне обыденного мышления, человек вынужден все не воспринимаемые органами чувств свойства сводить к воспринимаемым (поэтому, в частности, появился, «цвет» у кварков, а термин «плотность» применяется для характеристики плотности популяции, вероятности, тока, излучения, оптической, весо-

вой плотности и др.). Стремлением перевести такие понятия на привычный, воспринимаемый органами чувств уровень обусловлено появление таких терминов, как потенциальный барьер (яма, ящик), туннельный эффект, магнитная буря, световой поток, вихрь и поток магнитной индукции, волновой фронт (пакет), волновая поверхность, ливень частиц и т.д.

Математический язык снимает эти терминологические трудности и переводит наше мышление на новый, оторванный от непосредственного восприятия действительности, непривычный для человека абстрактный уровень мышления. Это прорыв в области познания мира, выход за ограничивающие рамки наших органов чувств, который в биологии был сделан впервые на количественном уровне в XVII веке А. Левенгуком, открывшим с помощью своего микроскопа ранее неизвестный человеку «параллельный» мир микроорганизмов. Физические приборы переводят на понятный нам язык органов чувств все большее число невоспринимаемых непосредственно нами явлений и позволяют их количественно оценить.

Все эти тенденции в научном познании не обошли стороной и биохимию. Об этом свидетельствует как многообразие ее инструментальных методов, так и достаточно широкое использование математических моделей, позволившее, в частности, перевести кинетику ферментативных реакций из разряда описательных дисциплин на качественно новый уровень – в разряд точных наук.

Малый практикум по дисциплине «Радиоизотопные методы в биохимии»

ПЕРВАЯ ТЕМА

Техника радиационной безопасности

Ионизирующая радиация при действии на биологические объекты обладает рядом особенностей, отсутствующих у других видов физических воздействий. К их числу относятся:

- невосприимчивость радиации в момент облучения, поскольку из-за отсутствия специальных рецепторов она не ощущается организмом;

- высокая эффективность при действии на организм, вследствие чего очень малая в энергетическом выражении доза может вызвать очень серьезное поражение и даже смерть;

- кумулятивность – накопление биологического эффекта от облучения, действовавшего в разное время;

- отсутствие генетически совершенно безвредной дозы.

Радиация оказывает многоканальное действие (рис. 1), которое проявляется в виде:

- лучевой болезни;

- рака;

- наследственных болезней.

Рак связан с повреждением наследственного аппарата соматических клеток и обычно относится к отдаленным последствиям облучения. Наследственные болезни связаны с повреждением генетического аппарата половых клеток в облученном организме и проявляются в последующих поколениях

С учетом названных особенностей биологического действия радиации и расширяющегося применения ее были разработаны нормы, призванные обеспечить безопасность людей, непосредственно работающих с источниками радиации, окружающего населения и природной среды [2].

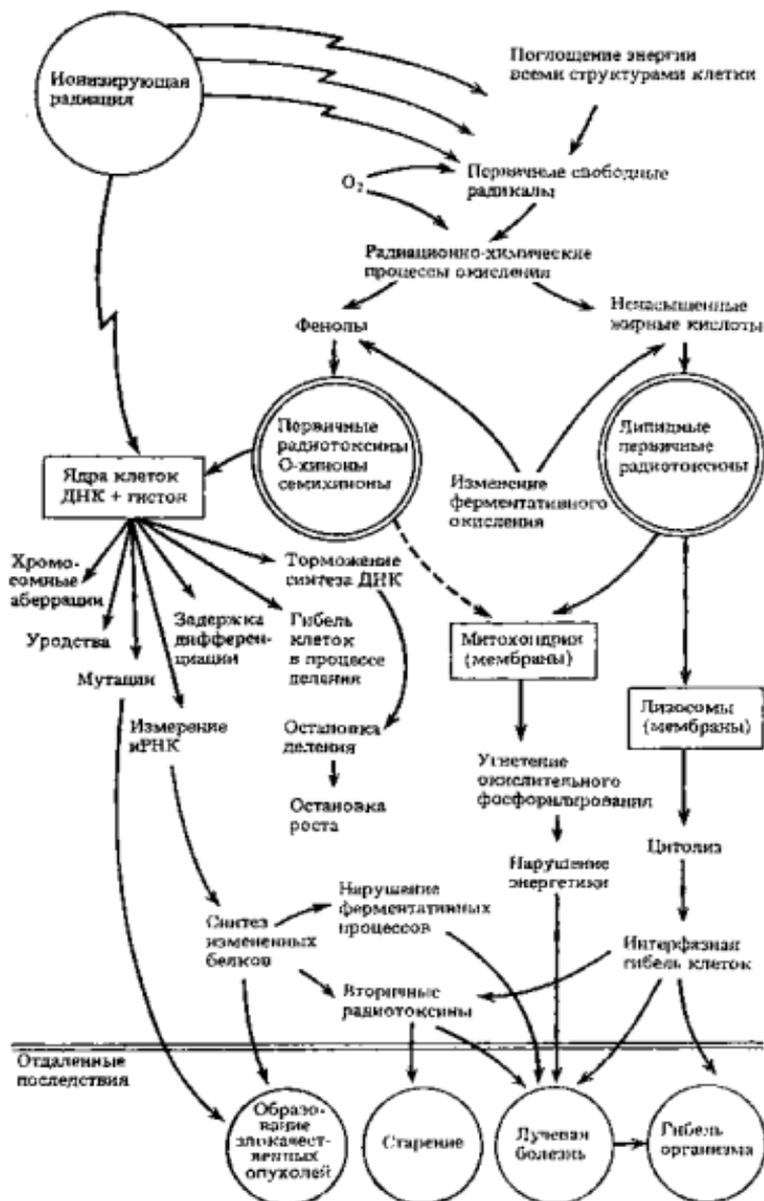


Рис. 1. Схема процессов, возникающих в облученной клетке, и последующее влияние их на состояние организма [1]

Основными документами, соблюдение требований которых гарантирует безопасную работу с источниками радиации, являются:

1. Нормы радиационной безопасности (НРБ-76).

2. Основные санитарные правила работы с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений (ОСП-72/80).

НРБ-76. В этом документе даются:

- подразделение облучаемых лиц на категории А, Б, В;
- подразделение критических органов на группы I, II, III;
- дозовые пределы облучения (ПДД, ПД) для критических органов лиц категорий А и Б;
- значения коэффициента качества Q для различных видов излучения;
- расчетные формулы для определения значения предельно допустимого поступления (ПДП) в организм смеси радионуклидов, эквивалентной дозы H;
- уровни облучения персонала в штатной ситуации и при аварии, лиц категорий Б и В.

В таблицах приводится подразделение радионуклидов на группы радиационной опасности. Для каждого радионуклида дается:

- период полураспада ($T_{1/2}$);
- критический орган (КО);
- допустимое содержание радионуклида в критическом органе персонала ($ДС_A$);
- предельно допустимое годовое поступление (ПДП) радионуклида в организм через органы дыхания персонала;
- допустимая концентрация ($ДК_A$) радионуклида в воздухе рабочей зоны;
- предел годового поступления (ПГП) в организм лиц категории Б через органы дыхания и пищеварения;
- допустимая концентрация радионуклида ($ДК_B$) в атмосферном воздухе и в воде;
- минимально значимая активность (МЗА) на рабочем месте.

Кроме того, в таблицах приводится допустимая концентрация (ДК) радионуклидов благородных газов (РБГ: аргона, криптона, ксенона), содержащихся в воздухе рабочих помещений и на открытой местности; допустимое загрязнение ($ДЗ_A$) поверхности тела, спецодежды, помещений, транспортных средств и др.; дозовые характеристики моноэнергических излучений всех видов и некоторые иные данные.

ОСП-72/80. Составлены с учетом НРБ-76 и содержат следующие сведения и разделы:

- перечень учреждений, освобождающихся от получения разрешения на работу с источниками ионизирующих излучений;
- размещение учреждений, участков и установок, предназначенных для работы с источниками ионизирующих излучений;

- организация работ с применением источников ионизирующих излучений;
- получение, учет, хранение и перевозка источников ионизирующих излучений;
- работа с закрытыми источниками излучений и с радиоактивными веществами в открытом виде;
- вентиляция, лылегазоочистка, отопление, водоснабжение и канализация;
- сбор, удаление и обезвреживание твердых и жидких радиоактивных отходов;
- содержание и дезактивация рабочих помещений и оборудования, предназначенных для работ с радиоактивными веществами;
- меры индивидуальной защиты и личной гигиены;
- санитарные пропускники и саншлюзы, радиационный контроль.

В Приложении даются образцы документов, заполняемых при проведении работ с источниками ионизации, а также приводится перечень противопоказаний, препятствующих приему лиц на работу, связанную с воздействием на них ионизирующих излучений.

Задание 1. Знакомство с содержанием НРБ-76 и ОСП-72/80, умение ориентироваться в этих документах и использовать содержащийся в них материал. Проверка качества знаний по теме осуществляется путем устного опроса.

ВТОРАЯ ТЕМА

Организация радиоизотопной лаборатории и работы в ней

Радиоизотопные лаборатории предназначены для выполнения исследований с использованием радиоактивных изотопов. С учетом особой опасности последних при строительстве радиоизотопных лабораторий соблюдается ряд специфических требований к помещениям, коммуникациям и применяемому оборудованию, отраженных в ОСП-72/80. В этих лабораториях используются различные источники ионизирующего излучения (радиации).

Ионизирующим излучением называется любое излучение, взаимодействие которого со средой приводит к образованию электрических зарядов разных знаков. К ионизирующему излучению относятся электромагнитные излучения (гамма-излучение, характеристическое, тормозное, рентгеновское излучения) и корпускулярные излучения (альфа- и бета-частицы, протоны, нейтроны и др.).

Закрытые источники излучения. Закрытым источником является радиоактивный источник излучения, устройство которого исключает попадание радиоактивных веществ в окружающую среду в условиях применения и износа, на которые он рассчитан.

К закрытым источникам излучения относятся:

- аппаратура для гамма-дефектоскопии;
- терапевтические установки с гамма-излучателями;
- образцовые источники излучения;
- рентгеновские установки;
- ускорители частиц;
- электронные микроскопы.

Все они являются потенциальными источниками внешнего облучения организма.

Открытые источники облучения. Открытым источником является радиоактивный источник, при использовании которого возможно попадание содержащихся в нем радиоактивных веществ в окружающую среду. К ним относятся радиоактивные вещества в твердом, жидком и газообразном состояниях. Радиоактивные вещества в открытом виде являются потенциальным источником как внешнего, так и внутреннего облучения организма.

Санитарная классификация радиоизотопов, видов работ и лабораторий. Радиоактивные вещества как потенциальные источники внутреннего облучения с учетом ряда обстоятельств (вид излучения, период полураспада, скорость выведения из организма, химические свойства, критический орган и др.) по степени радиационной опасности разделяются на 4 группы с индексами А, Б, В и Г в порядке убывания опасности.

Группа А – изотопы с особо высокой радиотоксичностью (Ra^{226} , Ra^{228} , Ac^{227} , Th^{228} , Th^{230} и др.).

Группа Б – изотопы с высокой радиотоксичностью (Sr^{90} , I^{125} , I^{126} , I^{129} , I^{131} , Ce^{144} , U^{230} , U^{233} , U^{235} , U^{238} и др.).

Группа В – изотопы со средней радиотоксичностью (Na^{24} , P^{32} , S^{35} , K^{42} и др.).

Группа Г – изотопы с наименьшей радиотоксичностью (H^3 , C^{14} , Cl^{36} , Fe^{55} и др.).

По степени возможной радиационной опасности работы с открытыми радиоактивными веществами делятся на три класса, в зависимости от активности на рабочем месте, которая для каждой группы радиационной опасности имеют свое значение (см. табл.).

Подразделение работ с открытыми
источниками на классы

Группа радиационной опасности	Активность на рабочем месте, мкКи			МЗА, мкКи
	I класс	II класс	III класс	
А	Более 10^4	$10 - 10^4$	$0,1 - 10$	0,1
Б	Более 10^5	$10^2 - 10^5$	$1 - 10^2$	1
В	Более 10^6	$10^3 - 10^6$	$10 - 10^3$	10
Г	Более 10^7	$10^4 - 10^7$	$10^2 - 10^4$	10^2

В зависимости от годового потребления радиоактивных веществ в открытом виде лаборатории (и другие учреждения) подразделяются на три категории:

- 1 категория – с годовым потреблением более 100 кюри;
- 2 категория – с годовым потреблением от 10 до 100 кюри;
- 3 категория – с годовым потреблением менее 10 кюри.

Помещения и коммуникации. Помещения для работ 1 класса должны размещаться в отдельном здании или изолированной части здания с отдельным входом только через санитарный пропускник. Помещения для работ 2 класса должны размещаться в отдельной части здания изолированно от других помещений. Должны быть санитарный пропускник, душевая. К размещению лабораторий, где проводятся работы 3 класса, специальные требования не предъявляются. Работы этого класса производятся в отдельных помещениях (комнатах). Рекомендуется устройство душевой и выделение помещения для хранения и фасовки растворов. Работы 3 класса, связанные с возможностью радиоактивного загрязнения (операции с порошком, упаривание растворов, работы с летучими веществами и др.), должны проводиться в вытяжном шкафу. Большинство исследовательских радиоизотопных лабораторий принадлежит к 3 категории, и в них обычно проводятся работы 2 и 3 класса.

Если наибольшая активность источника на рабочем месте не превышает МЗА, получение разрешения Государственного санитарного надзора не требуется. В случае превышения значения МЗА оформляется санитарный паспорт на право работы с источниками ионизирующего излучения.

Помещение лаборатории, в котором проводятся работы с радиоактивными веществами, должно иметь:

- пол, покрытый пластиком, с краями, поднятыми на высоту 20 см и заделанными заподлицо со стенами;
- покрашенные масляной краской стены и потолок;
- закругленные углы при сопряжении стены со стеной, потолком и полом;
- скрытую электрическую проводку.

Все это облегчает проведение ежедневной влажной уборки помещения.

Подводящие водяные коммуникации и отопительные батареи должны давать возможность их регулярной дезактивации.

Для работ 2 класса желательно иметь автономную вентиляцию, обязательно – горячее водоснабжение. Спецканализацию (помимо канализации общего назначения) необходимо иметь при ежедневном количестве жидких отходов более 200 л (жидкие отходы считаются радиоактивными, если их активность в 10 раз превышает $ДК_{\text{в}}$ для воды). В хозяйственно-бытовую канализацию допускается сброс радиоактивных сточных вод с концентрацией, превышающей $ДК_{\text{в}}$ для воды не более чем в 10 раз, если обеспечивается их десятикратное разбавление нерадиоактивными сточными водами в коллекторе данного учреждения.

Стандартное защитное оборудование и инструменты. К стандартному защитному оборудованию радиоизотопных лабораторий относятся: радиохимические вытяжные шкафы, защитные камеры и боксы, сейфы, экраны, защитные свинцовые стенки, защитные инструменты и приспособления, контейнеры для транспортировки и хранения радиоактивных веществ, сбора и временного хранения отходов [3]. Лаборатории оборудуются также специальными раковинами и мебелью.

Радиохимические вытяжные шкафы. Все препаративные работы с радиоактивными веществами, сопровождающиеся выделением радиоактивной пыли, паров и газов, выполняются в радиохимических вытяжных шкафах, защитных камерах или боксах. Радиохимические шкафы изготавливаются из некорродирующих слабосорбирующих материалов, оборудуются приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжными фильтрами, имеют прочную столешницу, способную выдержать вес защитной свинцовой стенки. Передняя стенка шкафа изготавливается обычно из толстого оргстекла, имеет вмонтированные защитные перчатки. Шкаф сделан достаточно глубоким, чтобы можно было пользоваться манипуляторами и щипцами.

Защитные камеры и боксы. Они обеспечивают более надежную защиту от рассеяния радиоактивных веществ в окружающую среду. В них создается разрежение не менее 20 мм водяного столба, которое контролируется с помощью манометров. Как и в радиохимических вытяжных шкафах, ручки управления коммуникациями (вода, газ, сжатый воздух, электропитание и др.) из защитных камер выведены наружу. Боксы часто изготовлены из органического стекла и рассчитаны на одно или несколько рабочих мест. Они оборудованы шлюзами для ввода внутрь материалов во время работы.

Сейфы. Гамма-излучающие препараты хранятся в специальных защитных сейфах, облицованных свинцовыми или чугунными плитами, или в контейнерах, которые опускают в специальные колодцы со свинцовыми крышками, располагающимися в хранилище радиоактивных изотопов. Бета-активные изотопы хранятся в так называемых незащитных одно- или многосекционных сейфах, изготовленных из стали, которые нередко встраивают в стенку.

Экраны. Для защиты от жесткого бета-излучения и гамма-излучения во время работы применяют защитные экраны (прямостоячие или наклонные). От жесткого бета-излучения защищают экраны из стекла, оргстекла, алюминия и других материалов с малыми атомными номерами. При работе с гамма-излучающими изотопами используют экраны из материалов с большой плотностью (свинец, свинцовые стекла марок ТФ – тяжелый флинт и ТК – тяжелый крон с плотностью около 4 г/см^3 и др.), снижающие интенсивность излучения в нужное число раз. При работе с альфа-излучателями и источниками мягкого бета-излучения защитные экраны применять нецелесообразно.

Защитные свинцовые стенки. Изготавливаются из профилированных свинцовых (с добавкой сурьмы для твердости) кирпичей. Обеспечивают надежную защиту от гамма-излучения. Для наблюдения за работой при использовании непрозрачных защит, которая осуществляется с помощью манипуляторов, применяют зеркала или специальные перископы.

Защитные инструменты, приспособления. При работе с гамма- и бета-излучениями больших энергий и высоких интенсивностей снижение дозы, кроме экранирования и уменьшения времени пребывания возле радиоактивного вещества, добиваются путем использования дистанционного инструмента – щипцов и манипуляторов. Их конструкция и форма зависят от назначения. Щипцы не имеют запирающей пружины, и зажим объема осуществляется с помощью усилия пальцев. Манипуляторы имеют запирающую пружину и другие приспособления.

Для отмеривания заданных объемов жидкостей применяют различные дистанционные засасывающие приспособления (например, пипетки в сочетании с медицинскими шприцами).

Для предотвращения разливания радиоактивных растворов или рассыпания сыпучих материалов целесообразно посуду с ними помещать в предохранительные коробки.

Во избежание загрязнения лабораторных столов радиоактивными веществами работы с ними рекомендуется проводить в противнях, застланных изнутри фильтровальной бумагой.

Контейнеры. Радиоактивные вещества заключают в хорошо герметизированную стеклянную тару, которую помещают в контейнер, и в таком виде осуществляют их транспортировку. Для транспортировки и хранения бета-излучающих изотопов применяют эбонитовые контейнеры (иногда со свинцовыми вкладышами, защищающими от тормозного электромагнитного излучения). Для транспортировки и хранения гамма-излучающих препаратов используют свинцовые контейнеры. Нейтронные источники заключают в контейнеры, состоящие из стального кожуха, заполненного внутри парафином с добавкой окиси бора (парафин рассеивает и замедляет быстрые нейтроны, бор захватывает медленные нейтроны). Обычно транспортные контейнеры положено через определенный срок возвращать поставщику.

Для сбора и временного хранения жидких и твердых радиоактивных отходов применяют специальные контейнеры из нержавеющей стали, свинца, полиэтилена и других материалов.

Все перечисленное выше оборудование, предназначенное для работы с радиоактивными веществами, имеет знак радиационной опасности:



Раковины и мебель. Умывальники для мытья рук и посуды должны иметь раковину, форма которой исключает разбрызгивание воды, а включение последней должно производиться педальным или локтевым рычагом.

Лабораторная мебель (столы, стулья, шкафы и др.) должны иметь рациональную форму и слабосорбирующую поверхность, облегчающую их дезактивацию.

Средства индивидуальной защиты и гигиена труда

Средства индивидуальной защиты. К ним относятся защитные средства сугубо индивидуального пользования.

Халаты. В них проводятся все работы с радиоактивными веществами. Халаты должны быть сшиты из гладкой хлопчатобумажной ткани белого цвета, иметь закрытый ворот и завязки на спине.

Шалочки. Необходимы для защиты головы и волос от радиоактивных загрязнений. Шьются из той же ткани, что и халаты.

Нарукавники. Предохраняют рукава халата от загрязнения радиоактивными веществами. Делают из хлопчатобумажной ткани или различных пластикатов.

Фартуки. Применяются при мытье посуды и других операциях для защиты от брызг радиоактивных жидкостей. Изготавливаются из пластика.

Перчатки. Все работы с радиоактивными веществами в открытом виде необходимо обязательно выполнять в перчатках. Обычно используют хирургические перчатки. Если возникает опасение, что при работе они могут быть повреждены, применяют анатомические и другие более толстые перчатки. При работе в защитных шкафах и боксах используют перчатки с длинными рукавами.

Респираторы. Применяются для защиты дыхательных путей от попадания пыли и газов. Для защиты от пыли служат респираторы марок Лепесток-5, Лепесток-40, Лепесток-200. От газа защищают респираторы с соответствующими химическими поглотителями.

Щитки. Служат для защиты лица и глаз от бета-излучения.

Обувь. При работе в радиоизотопных лабораториях рекомендуется надевать отдельную обувь на резиновой подошве.

Халат, шалочка, обувь (тапочки), перчатки, щиток относятся к средствам индивидуальной защиты повседневного употребления, а респираторы, фартуки, нарукавники и другие принадлежности (халаты и комбинезоны из пластика, пневмокостюмы и др.) относятся к дополнительным средствам защиты и применяются по мере необходимости.

К средствам индивидуальной защиты относят также приборы дозиметрического контроля, включая индивидуальные дозиметры.

Гигиена труда. С целью защиты работающего и окружающих от радиоактивных загрязнений запрещается:

- курение, прием пищи и воды в лаборатории;
- выход за пределы лаборатории в спецодежде;
- выход в другие помещения лаборатории в резиновых перчатках;

– трогать волосы, лицо, одежду перчатками.

С целью уменьшения получаемой дозы радиации рекомендуется всегда, где это возможно, использовать манипуляторы (защита расстоянием).

Вся посуда, с которой осуществляется работа, должна быть подписана (название реактива, фамилия работающего, дата).

Дезактивация загрязнений и удаление радиоактивных отходов

Дезактивация загрязнений. Любое радиоактивное загрязнение необходимо устранить в кратчайшие сроки, поскольку загрязненное помещение и оборудование являются источниками радиационной опасности непосредственно для работающего на данном рабочем месте; неликвидированное загрязнение является источником распространения загрязнения на чистые помещения и оборудование со всеми вытекающими последствиями для персонала; работа в загрязненном помещении и с загрязненным оборудованием может привести к существенному искажению результатов эксперимента.

В случае радиоактивного загрязнения необходимо принять меры по предотвращению его распространения. Загрязненное место необходимо оградить и вывесить предупреждающие знаки («Грязно»). Если загрязняющее вещество является жидкостью, нужно покрыть его влагоемким материалом (опилки, ветошь и др.). Большие массы пролитых радиоактивных жидкостей или рассыпанных сыпучих материалов можно собрать с помощью переносных вакуумных насосов в склянку, располагаемую между наконечником, через который засасывается загрязненный материал, и вакуумным насосом. Если загрязняющее вещество является порошком, то сразу же после его рассыпания необходимо выключить вентиляцию, закрыть окна и форточки, исключив таким образом возможность его распространения, и лишь после этого приступить к сбору и удалению порошка.

Небольшие капли радиоактивной жидкости можно собрать фильтровальной бумагой, стремясь при этом по возможности не распространять загрязнение на большую поверхность. Размазывание радиоактивной жидкости тряпками недопустимо.

После удаления основной массы загрязняющего вещества остаточная активность с загрязненной поверхности снимается дезактивирующими химическими реагентами, состав которых определяется химической природой загрязняющего вещества. Одним из универсальных дезактивирующих растворов является 1-5%-ный раствор соляной кислоты. Эффективными дезактивирующими средствами являются

растворы различных комплексообразующих веществ (трилона Б, лимонной кислоты и др.), поверхностно-активных веществ (например, входящих в состав синтетических стиральных порошков). Для удаления прочно связанного с материалами загрязнения рекомендуется применять реактив, который бы растворил часть материала поверхности вместе с загрязняющим веществом.

Если обработка дезактивирующими растворами оказывается недостаточной, приходится применять механические средства: щетки, скребки, наждачную бумагу, скальпели и др.

Мелкие объекты (инструмент и др.) можно дезактивировать в камерах для электродиализа.

В случае загрязнения кожных покровов радиоактивными веществами дезактивацию необходимо производить сразу, так как они быстро проникают внутрь организма. Начинают дезактивировать сухим способом (пемзой, лейкопластырем). Затем обрабатывают поверхность кварцевой пылью, слегка смоченной слабым раствором соляной кислоты. При необходимости осуществляют химическую дезактивацию.

Качество дезактивации контролируют с помощью переносного радиометра. Для различных объектов (тело, руки, полотенце, перчатки, оборудование и др.) существуют предельно допустимые уровни загрязненности поверхностей отдельно для альфа- (более низкие) и бета-излучения.

Удаление радиоактивных отходов. Осуществляется следующими способами:

- сливанием низкоактивных жидких отходов в канализацию общего назначения;
- выдерживанием отходов с короткоживущими изотопами с целью снижения их активности вследствие радиоактивного распада;
- вывозом жидких и твердых отходов на пункт захоронения («мгильник»).

В канализацию общего назначения разрешается сливать жидкие радиоактивные отходы с удельной активностью (в расчете на 1 литр раствора), не превышающей 10 ДК_Б для воды, если $T_{1/2} > 60$ суток, или до 100 ДК_Б, если $T_{1/2} < 60$ суток.

Твердые и жидкие отходы, содержащие короткоживущие изотопы ($T_{1/2} \leq 15$ суток), к вывозу на пункт захоронения не принимаются, а выдерживаются необходимое время на распад до указанных выше значений активности, после чего сливаются в канализацию или выбрасываются с обычным мусором.

Высокоактивные жидкие и твердые радиоактивные отходы с большим периодом полураспада ($T_{1/2} > 15$ суток) надлежит собирать в специальные контейнеры и вывозить на пункт захоронения. Для уменьшения объема материала, подлежащего захоронению, можно высокорadioактивное вещество перевести из растворенной формы в осадок и отправлять к месту захоронения только его.

Задание 2. Знакомство с закрытыми и открытыми источниками ионизирующего излучения, классификацией радиоизотопов, видов работ и радиоизотопных лабораторий, особенностями устройства последних, стандартным оборудованием (в натуре и по каталогам), правилами личной гигиены, способами дезактивации загрязнений и захоронения отходов. Приобретение навыка по использованию защитных инструментов и приспособлений (щипцов, манипуляторов, дистанционных пипеток). Расчет времени выдерживания радиоактивного препарата на распад для снижения активности до допустимого уровня (индивидуально каждым студентом). Проверка знаний – путем устного опроса.

ТРЕТЬЯ ТЕМА

Радиометрия

Методы регистрации излучений

Для регистрации излучений используют различные эффекты, возникающие при взаимодействии их со средой. Устройства, в которых возникают эффекты, называются детекторами, а которые регистрируют сигналы, поступающие с детектора, – регистраторами. Совместно работающие детектор и регистратор образуют радиометр, который предназначен для измерения плотности потока излучения. Между активностью радиоизотопа и плотностью излучения, проходящего через детектор и регистрируемого радиометром, имеется прямая пропорциональная зависимость, поэтому радиометры применяют для измерения активности радиоактивных препаратов. Особую разновидность радиометров представляют радиационные дозиметры. Они являются радиометрическими приборами, отградуированными в единицах дозы. Приборы, предназначенные для анализа свойств излучений (состава, энергии и др.), называются анализаторами.

Для регистрации излучения используются трековые камеры, химические, фотографические, ионизационные, оптические и другие методы [4].

Трековые камеры. Они регистрируют следы заряженных частиц. Один из старейших приборов этого типа – камера Вильсона. Принцип работы ее основан на способности ионов быть центрами конденсации паров жидкости. Камера представляет собой плоский цилиндр с поршнем. Сверху камера закрывается стеклом. Камера наполняется насыщенным паром (вода, спирт). При резком опускании поршня происходит адиабатическое расширение газа в камере, и насыщенный пар переходит в пересыщенное состояние. На пути заряженной частицы, попадающей в этот объем, образуются ионы, которые служат центрами конденсации пара. Конденсированный пар (частички влаги) является следом ионизирующей частицы, который можно наблюдать визуально и фотографировать.

Позднее были разработаны конструкции диффузионных, пузырьковых и искровых камер, которые также позволяют регистрировать треки ионизирующих частиц.

Химические методы. Вещества, в которых происходят радиационно-химические процессы, могут быть использованы в качестве интегральных детекторов в радиометрии. Мерой поглощенной энергии является количество продукта радиационно-химической реакции, о котором можно косвенно судить по изменению физических свойств вещества (окраски, прозрачности, электропроводности и др.).

Химическими детекторами могут быть газообразные, жидкие и твердые вещества. Например, в газовом детекторе в качестве реактива используется закись азота (N_2O). При действии на нее излучения образуются молекулы азота, кислорода и двуокиси азота. В жидких детекторах используют органические и неорганические вещества и их смеси. Так, в водных растворах индола, хлороформа, треххлорэтилена происходят радиационно-химические процессы, сопровождающиеся изменением pH, прозрачности, цвета раствора. Примером твердого химического детектора является поливинилхлоридная пленка, в состав которой входит краситель. Излучение вызывает разложение поливинилхлорида с выделением соляной кислоты, которая действует на краситель и изменяет окраску пленки.

Фотографические методы. Являются разновидностью химических методов. Основаны на фотографическом действии ионизирующего излучения, которое проявляется в восстановлении ионов серебра до атомов серебра в микрокристаллах галоидов серебра фотозмульсии электронами, высвобождающимися при ионизации вещества. При проявлении фотозмульсии происходит восстановление всего серебра, содержащегося в кристалле с восстановленным атомом серебра, в результате чего на месте кристалла образуется види-

мое под микроскопом так называемое зерно черного цвета. По расположению зерен серебра в фотоэмульсии можно проследить путь частицы излучения (трек).

В биологических исследованиях фотографический метод позволяет визуализировать распределение радиоактивных изотопов в клетках, тканях, органах и целых организмах (например, растениях). Этот вариант фотографического метода называется радиоавтографией (автордиографией).

Ионизационные методы. Относятся к числу наиболее распространенных. Они основаны на способности радиации образовывать большое число ионов в веществе, которые при определенных условиях могут дать электрический ток (направленное движение зарядов). Простейшим детектором ионизирующего излучения является электроскоп. Более широко применяются ионизационная камера, пропорциональный счетчик, счетчик Гейгера-Мюллера и др., в которых тоже используется газовый разряд. В некоторых случаях применяются жидкостные ионизационные камеры (регистрация ионизации в жидкостях), а также кристаллические и полупроводниковые детекторы (регистрация ионизации в кристаллах и полупроводниках).

Оптические методы. Излучение, проходя через среду, производит ионизацию и возбуждение ее атомов и молекул. Переход атомов и молекул из возбужденного состояния в основное сопровождается инфракрасным, видимым, ультрафиолетовым и даже характеристическим излучением. Испускание излучения веществом под действием проходящего через него другого излучения называется люминесценцией, а вещества, которые дают наибольший выход фотонов люминесценции, – люминофорами (или фосфорами). Это явление используется, в частности, в рентгенографии. Рентгеновское излучение, падая на экран, покрытый люминофором (например, слоем сернистого цинка), возбуждает видимый свет люминесценции.

Частица высокой энергии, проходя через люминофор, может создать довольно интенсивную вспышку излучения люминесценции. Такая вспышка называется сцинтилляцией. Визуальное наблюдение и счет сцинтилляций были одним из первых методов регистрации и счета частиц, используемым до изобретения газоразрядных счетчиков. Метод, основанный на регистрации сцинтилляций, в настоящее время нашел широкое применение в радиометрии благодаря изобретению фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Основными частями сцинтилляционного счетчика являются люминофор-сцинтиллятор и ФЭУ.

Помимо названного сцинтилляционного счетчика, осуществляющего счет отдельных частиц, существуют приборы, в которых используются люминесцентные аккумулирующие детекторы, способ-

ные накапливать поглощенную энергию ионизирующей радиации. С помощью внешнего воздействия (например, нагревания) можно вызвать освобождение накопленной энергии в виде излучения люминесценции, которое регистрируется ФЭУ.

Заряженные частицы, движущиеся в прозрачных средах (вода, оргстекло и др.) со скоростями, превышающими фазовую скорость света в этих средах, можно зарегистрировать с помощью счетчиков Черенкова. Заряженная частица испускает излучение, которое воспринимается ФЭУ.

Помимо рассмотренных методов регистрации радиации могут быть использованы и другие, в частности, основанные на измерении количества тепла, выделившегося при взаимодействии излучения с веществом (калориметрические методы). Каждый метод оказывается оптимальным для решения конкретных задач. В биологических исследованиях применяются ионизационные (газоразрядные счетчики), оптические (сцинтилляционные счетчики) и фотографические (радиоавтография) методы.

Установка для измерения радиоактивности при помощи газоразрядных счетчиков

Устройство и работа установки. В простейшем варианте установка состоит из газоразрядного счетчика частиц (и гамма-квантов), высоковольтного выпрямителя и регистрирующего устройства (рис. 2).

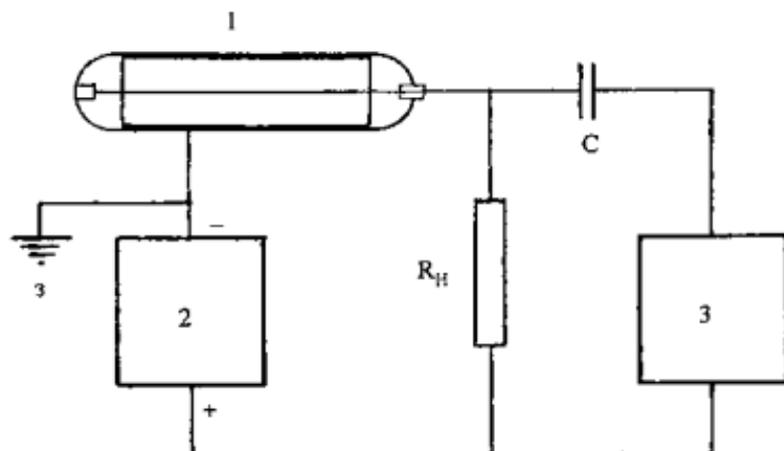


Рис. 2. Принципиальная схема установки для измерения радиоактивности при помощи газоразрядного счетчика: 1 – газоразрядный счетчик; 2 – высоковольтный выпрямитель; 3 – регистрирующее устройство; 3 – заземление

Газоразрядный счетчик. Представляет собой заполненную газом трубку, внутри которой находятся два электрода – катод и анод. К электродам приложено напряжение от высоковольтного источника постоянного тока. Цилиндрический (наружный) электрод является катодом и обычно заземляется.

Высоковольтный выпрямитель. Питается от электрической сети и является источником плавно регулируемого напряжения, выходное значение которого может достигать нескольких тысяч вольт.

Заряженная частица, проникшая в счетчик, создает на своем пути в газе положительные ионы и свободные электроны, которые в соответствии со своим знаком устремляются к катоду или аноду. В высоковольтном электрическом поле электроны ускоряются до такой энергии, при которой сами производят ионизацию встречных молекул газа. Такая картина в промежутке между электродами повторяется многократно (если учесть, что энергия ионизации равна ориентировочно 35 электрон-вольт), в результате чего на нить (анод) обрушивается лавина электронов. Одна пара ионов, образующаяся при ионизации газа заряженной частицей излучения, в результате такого лавинного процесса порождает за время, меньшее 10^{-6} с, до 10^9 электронов, поступающих на анод. Такой механизм усиления обычно называют вспышкой самостоятельного разряда. Поскольку в этот момент электрическое сопротивление газоразрядного счетчика резко снижается, происходит повышение напряжения на высокоомном сопротивлении нагрузки R_H , через которое при разряде протекает ток. Вследствие такого перераспределения напряжения, приложенного к газоразрядному счетчику, на сопротивлении R_H создается кратковременный импульс напряжения, который подается на регистрирующее устройство. Потенциал нити, напротив, резко снижается, и на этом заканчивается так называемая активная стадия разряда. Затем начинается восстановление потенциала нити благодаря утечке электронов через сопротивление R_H . Этот процесс обычно длится в течение 10^{-4} с. Одновременно с ним происходит передвижение более тяжелых (и менее подвижных) ионов к катоду счетчика. После восстановления потенциала нити счетчик готов к регистрации новой частицы.

Регистрирующее устройство. Импульс напряжения, возникший на сопротивлении R_H при прохождении через рабочий объем счетчика ионизирующей частицы, имеет небольшую амплитуду и сложную форму. Чтобы зарегистрировать этот импульс, необходимо его усилить и преобразовать. Радиотехническая схема, включающая в себя импульсный усилитель с формирующим и выходным каскадами, выдает достаточно мощный импульс тока на индикатор регистрирующего

устройства. Существуют различные виды индикаторов. Одни из них показывают в виде светящихся цифр число зарегистрированных на данный момент импульсов. В более старых радиометрах индикация осуществляется с помощью трех декад неоновых лампочек (единицы, десятки, сотни), которые последовательно загораются по мере попадания ионизирующих частиц в газоразрядный счетчик. После регистрации 1000 импульсов поступает сигнал на электромеханический счетчик (с соленоидом), который отсчитывает тысячи импульсов, а на табло с неоновыми лампочками начинается счет с нуля новой тысячи импульсов. Все эти операции осуществляет пересчетная схема, которая входит в состав регистрирующего устройства.

Чтобы определить скорость счета (количество импульсов, сосчитанных в единицу времени, обычно в минуту), с помощью специального тумблера на определенное время включают счет, после чего его останавливают и делят количество зарегистрированных импульсов на время счета.

Помимо рассмотренных основных устройств установки для регистрации частиц нередко включают ряд *дополнительных устройств*, к числу которых относятся таймер, защитный (свинцовый) домик, подставка для препаратов, штатив для крепления газоразрядного счетчика и др.

Таймер предназначен для автоматической остановки счета импульсов через заданный отрезок времени. После прочтения результата с помощью специальной кнопки производят его сброс и при необходимости повторный счет.

Защитный домик с толщиной свинцовых стенок 40 – 50 мм служит для уменьшения внешнего фона счетчика (космическое излучение) и исключает влияние посторонних радиоактивных источников (находящихся за пределами защитного домика).

Подставка для препаратов крепится внутри защитного домика и служит для установки образца под торцовым счетчиком частиц на одном из фиксированных расстояний от его окна.

Штатив для крепления торцового счетчика обычно смонтирован в защитном домике; для крепления цилиндрического счетчика в незащищенном состоянии применяются штативы, в которых он может располагаться горизонтально или вертикально. Цилиндрический счетчик можно крепить и с помощью химического штатива с зажимом.

Порядок работы на конкретной установке с газоразрядным счетчиком приводится в ее техническом описании, которое необходимо предварительно прочесть, обратив особое внимание на правила техники безопасности.

Правила безопасной работы на радиометрических установках

В радиометрах, работающих от электрической сети, используется высокое напряжение, которое опасно для жизни. В связи с этим перед работой на них следует пройти инструктаж по технике безопасности и расписаться в журнале. При работе на радиометре перед включением его в сеть необходимо:

- убедиться в наличии надежного заземления прибора и отсутствии механического повреждения газоразрядного счетчика;
- проверить, нет ли повреждений токоведущих элементов, то есть не нарушена ли изоляция сетевого шнура и кабеля, которым счетчик соединен с регистрирующим устройством; не повреждены ли сетевые вилка и розетка;
- установить сетевой тумблер и тумблер высоковольтного блока в выключенное положение;
- установить ручки регулировки высокого напряжения на минимальные значения (повернув их против часовой стрелки до упора).

После этого можно включить прибор и, пользуясь инструкцией (техническим описанием), осуществлять работу на нем. Высокое напряжение необходимо повышать плавно, не торопясь (у прибора есть инерция), до рабочего значения. В случае появления искрения, запаха горелой изоляции необходимо немедленно выключить прибор, выдернуть вилку из розетки и сообщить о случившемся преподавателю, а при отклонении в работе прибора от штатного режима (предусмотренного инструкцией) нужно проконсультироваться с преподавателем.

Категорически запрещается вскрывать защитные крышки прибора, производить замену газоразрядного счетчика или ремонт при включенной в сеть установке.

Запрещается нарушать целостность защитной оболочки закрытого источника радиации, с которым осуществляется работа на радиометре.

Задание 3. Познакомиться по инструкции на прибор (лабораторный счетчик типа 1872 или 1873 венгерской фирмы Орион) с порядком измерения радиоактивности препарата. Включить прибор и определить скорость счета для образцового закрытого источника – радиоактивного изотопа таллия Tl^{204} .

Вольт-амперная характеристика счетчика. Если на газоразрядный счетчик, подвергающийся воздействию ионизирующего излучения, от источника постоянного тока подавать напряжение, то с его повышении-

ем будет изменяться и значение силы тока в цепи. Вольт-амперная характеристика и есть зависимость силы тока (I), протекающего через счетчик, от приложенного к нему напряжения (V). Не касаясь технических деталей получения этой зависимости, отметим, что иногда ее выражают как зависимость силы тока в импульсе или величины импульса напряжения (ΔV) при попадании ионизирующей частицы в счетчик при разных значениях приложенного к нему напряжения. Форма получаемого графика всюду будет одинаковой (рис. 3).

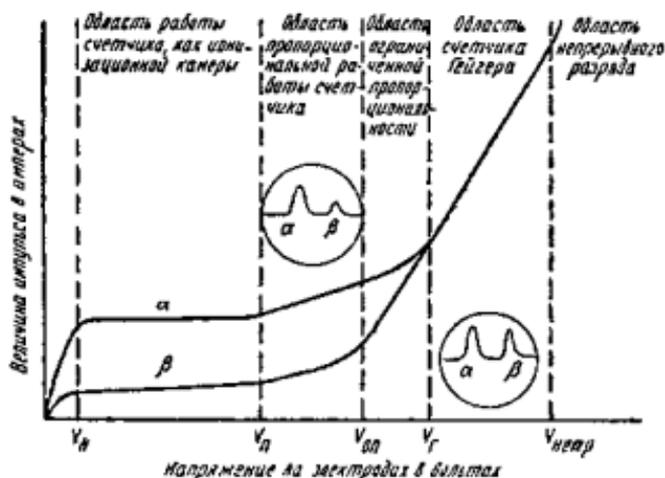


Рис. 3. Вольт-амперная характеристика типичного газоразрядного счетчика при различных режимах работы

При отсутствии напряжения на электродах счетчика положительно заряженные ионы и электроны, образовавшиеся при попадании ядерной частицы (например бета-частицы), будут рекомбинировать, образуя снова нейтральные молекулы газа. Если к электродам подвести небольшое постоянное напряжение, движение ионов станет направленным и в цепи возникнет ток. Он будет невелик, так как лишь небольшая часть заряженных частиц успеет достигнуть электродов, большая же их часть рекомбинирует. При повышении напряжения сила тока возрастает и при напряжении насыщения (V_n) достигает максимального значения, поскольку в образовании тока принимают участие все заряженные частицы. Дальнейшее повышение напряжения до V_p (напряжение пропорциональности) не ведет к увеличению силы тока, которая остается насыщающей. В области V_n - V_p счетчик ра-

ботает как ионизационная камера, а величина тока насыщения зависит от числа ионов, образованных частицей (у альфа-частицы их больше, чем у бета-частицы). При дальнейшем увеличении напряжения на электродах ток вновь начинает расти за счет вторичной (или ударной) ионизации газа заряженными частицами, которые приобрели достаточную для этого энергию. В области напряжений от V_n до V_{on} (напряжение ограниченной пропорциональности) наблюдается определенная пропорциональность между числом первично образованных ионов и силой ионизационного тока. Эта область называется областью пропорциональности, в ней работают пропорциональные счетчики. При дальнейшем увеличении напряжения строгая пропорциональность между числом первично образованных ионов и силой ионизационного тока нарушается, поэтому область $V_{on} - V_r$ (напряжение Гейгера) называется областью ограниченной пропорциональности. В области Гейгера (от V_r до $V_{непр}$) с увеличением напряжения значение силы ионизационного тока растет, причем оно не зависит от числа первично образованных ионов. В области Гейгера работают счетчики Гейгера. Повышение напряжения за верхнюю границу области Гейгера (сверх напряжения $V_{непр}$) вызывает непрерывный разряд, который не позволяет регистрировать истинное число частиц, попавших в рабочий объем счетчика, и ведет к быстрому выходу самогасящегося счетчика из строя.

Типы газоразрядных счетчиков. Газоразрядные счетчики классифицируются по ряду признаков.

По *характеру газового разряда* они разделяются на пропорциональные счетчики; счетчики Гейгера-Мюллера (или просто счетчики Гейгера); искровые счетчики.

По *механизму гашения разряда* их разделяют на самогасящиеся и несамогасящиеся. Деление связано с тем, что начиная с напряжения V_r происходит самостоятельный разряд, для поддержания которого не требуется дополнительного воздействия ионизирующих частиц. Чтобы зарегистрировать новую частицу (или гамма-квант), необходимо прервать (погасить) разряд. В самогасящихся счетчиках это осуществляется путем добавления в объем счетчика некоторого количества многоатомного газа (паров спирта или этана, диэтилового эфира и т. д.), молекулы которого в процессе гашения разряда разрушаются. Вследствие этого срок службы самогасящихся счетчиков ограничен и составляет несколько сот миллионов импульсов. В несамогасящихся счетчиках гашение разряда осуществляют путем применения гасящих радиотехнических схем.

По *назначению* счетчики подразделяются на счетчики мягкого бета-излучения (максимальная энергия $E_M < 0,5 \text{ МэВ}$), жесткого бета-излучения

($E_m \geq 0,5 \text{ МэВ}$), альфа-излучения, гамма-излучения, рентгеновского излучения, космических лучей и др.

По конструкции их разделяют на цилиндрические со стеклянными и металлическими стенками; торцовые с тонким слюдяным окошком; проточные счетчики с открытым окном (2л - счетчики и 4л - счетчики); счетчики с «рубашкой» для определения активности растворов и др.

По газовому наполнению различают счетчики, наполненные благородными газами или их смесью с органическими парами (например, состоящей из 90% аргона и 10% спирта); неон-галогидной смесью (галогенные счетчики); водородсодержащими газами и т. д. Галогенные счетчики обычно заполнены неоном или аргоном с небольшой ($\approx 0,1\%$) добавкой таких газов, как Cl_2 , Br_2 , I_2 , которые снижают потенциал зажигания самостоятельного разряда и делают счетчик самогасящимся. Галогенные счетчики работают при рабочем напряжении (V_p) порядка 300–400 В. Наиболее часто в радиометрии применяются торцовые счетчики (для регистрации альфа-излучения и мягкого бета-излучения) и цилиндрические счетчики (для регистрации гамма-излучения и жесткого бета-излучения). Излучение в торцовые счетчики проникает через их торцовую часть, герметично закрытую тонкой слюдяной пластинкой. Для регистрации жесткого бета-излучения применяются тонкостенные металлические или стеклянные цилиндрические счетчики. Гамма-излучение регистрируют цилиндрическими счетчиками с толстыми стенками из меди, вольфрама или графита, покрывающими внутреннюю поверхность стеклянной трубки (рис. 4).

Задание 4. Знакомство с конструкциями различных типов газоразрядных счетчиков.

Счетная характеристика газоразрядного счетчика. В отличие от вольт-амперной характеристики счетная характеристика выражает зависимость от приложенного к счетчику напряжения не силы тока, а скорости счета N , под которой понимают число импульсов, зарегистрированных в минуту (имп/мин). Счетную характеристику снимают при неизменном положении источника ионизации (радиоактивного препарата) по отношению к счетчику. При повышении напряжения сверх некоторого значения V_n начинают регистрироваться первые импульсы, число которых быстро возрастает при дальнейшем повышении напряжения. Затем рост скорости счета замедлится и с напряжения

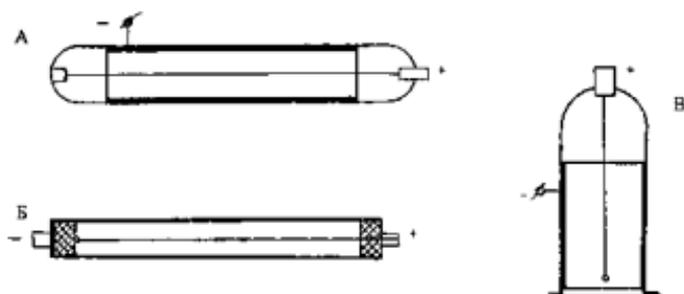


Рис. 4. Конструкции газоразрядных счетчиков: А – для регистрации гамма-излучения; Б – для регистрации жесткого бета-излучения; В – торцовый счетчик

V_A будет происходить практически линейно до значения V_B , после которого вновь начнет быстро нарастать (рис. 5).

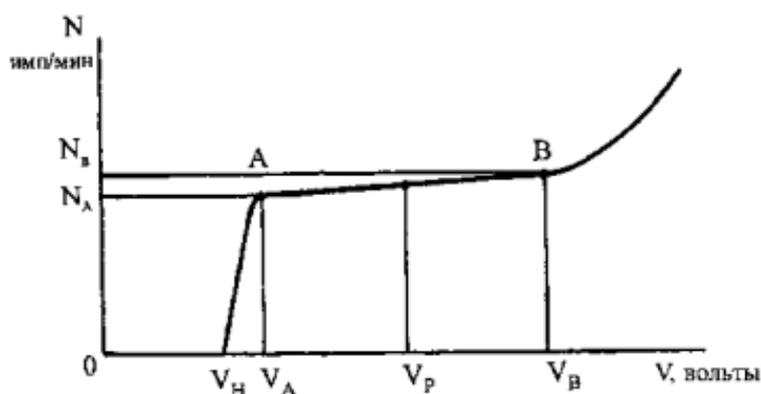


Рис. 5. Счетная характеристика самогасящегося счетчика Гейгера-Мюллера

В диапазоне значений напряжения от начала счета (V_H) до V_A счетчик работает в пропорциональной области или ограниченной пропорциональности, разряд носит несамостоятельный характер, в первую очередь регистрируются частицы с наибольшей энергией. Напряжение V_A соответствует началу работы счетчика в режиме Гейгера (напряжению

V_{Γ} на вольт-амперной характеристике, рис. 3). Напряжение V_B является границей области счетчика Гейгера, после чего он вскоре переходит в режим непрерывного разряда.

Участок счетной характеристики от V_A до V_B называется плато счетчика. Оно является рабочей областью напряжений, при которых производятся измерения. Чем больше *длина плато* $l = V_B - V_A$, тем лучше счетчик. У хороших счетчиков $l > 150-200$ В. Для измерения скорости счета выбирают определенное значение напряжения в границах плато, которое называют *рабочим напряжением* V_p . Обычно в качестве рабочей точки выбирают середину плато, для которой $V_p = V_A + l/2$. В случае очень широкого плато ($l \geq 300$ вольт) рабочую точку выбирают примерно на $1/3$ плато, для которой $V_p = V_A + l/3$.

У идеально работающего счетчика плато должно быть горизонтальным. Однако у большинства счетчиков плато имеет наклон, обусловленный увеличением количества ложных импульсов с ростом напряжения. Происхождение их обусловлено в основном некоторой вероятностью фотоэффекта с катода при высвечивании возбужденных молекул газа. *Наклон плато* (Δ) вычисляют по формуле

$$\Delta = \frac{(N_B - N_A) \cdot 100}{N_A(V_B - V_A)} \cdot 100\%.$$

Он указывает, на сколько процентов изменится скорость счета при увеличении или уменьшении напряжения, приложенного к счетчику, на 100 вольт (естественно, в пределах плато). У хороших счетчиков наклон плато не превышает 3 – 5%.

В процессе эксплуатации длина плато сокращается, рабочее напряжение сдвигается в область более высоких значений, наклон плато растет. По этой причине периодически необходимо снимать счетную характеристику находящегося в эксплуатации счетчика, чтобы найти новое значение рабочего напряжения, оценить погрешность работы (наклон плато) и установить момент, когда необходимо производить замену «состарившегося» счетчика на новый (для которого тоже требуется снять счетную характеристику).

Задание 5. Для конкретного счетчика снять счетную характеристику и найти по ней значения l, V_p и Δ . Для этого зафиксировать в держателе счетчик Гейгера, поместить под ним радиоактивный препарат, найти значение V_A , и, изменяя V с шагом 25 или 50 В, замерить соответствующие ему значения N . В масштабе построить график и с его помощью определить значения l, V_p и Δ .

Измерение радиоактивности с помощью газоразрядного счетчика

Воспроизводимость результатов измерения. Помимо периодического контроля работы газоразрядного счетчика путем снятия его счетной характеристики необходимо регулярно после включения радиометра в сеть проверять стабильность его показаний, которая зависит от ряда причин. Для этой цели применяют *эталон* – долгоживущий изотоп, испускающий излучение, по типу и энергии сходное с излучением исследуемых образцов. Так, для работы с P^{32} можно использовать эталон со скоростью счета 2000-3000 имп/мин, приготовленный из Sr^{90} , испускающий жесткое бета-излучение и имеющий период полураспада свыше 28 лет. Пригодны для этой цели эталоны из C^{14} , Co^{60} и др. изотопов.

К числу причин, вызывающих существенный разброс в значениях скорости счета одного и того же препарата (эталоны), могут быть:

- смещение плато и изменение его наклона при «старении» счетчика;
- нарушение герметичности счетчика, приводящее к повышению V_p и ухудшению характеристик счетчика;
- незаметное изменение взаимного расположения счетчика и образца;
- нарушение стабильности работы электронной схемы радиометра и др.

Систематические измерения эталона фиксируются в журнале. Если результаты отдельных измерений эталона выходят за пределы статистического разброса, то необходимо найти и устранить причину этого отклонения или, в случае невозможности ее устранения, ввести поправку в получаемые результаты.

Относительные и абсолютные измерения радиоактивности. При абсолютных измерениях определяют полную радиоактивность препарата, которая выражается в количестве распадов, произошедших в нем за минуту (расп/мин), или в специальных единицах: кюри ($2,22 \times 10^{12}$ расп/мин), беккерель (1 расп/с) и резерфорд (10^8 расп/с). Однако при исследованиях с «мечеными» атомами обычно достаточно произвести относительные измерения радиоактивности, то есть определить при одинаковых условиях скорость счета препаратов и сравнить между собой полученные значения. Скорости счета разных препаратов можно сравнивать между собой, если они содержат один и тот же изотоп, в противном случае необходимо вводить ряд поправок. Скорости счета препаратов прямо пропорциональны их абсо-

лутным активностям, но измеряются не в количестве распадов в единицу времени, а в импульсах, сосчитанных за минуту (имп/мин).

Для правильного проведения относительных измерений бета-активности препаратов необходимо соблюдать условия стандартизации, главными из которых являются:

- одинаковая форма и размеры (площадь, толщина) препаратов;
- одинаковое расположение препаратов относительно счетчика;
- равномерное распределение радиоактивного вещества по всему объему препарата;
- высушивание препаратов до исчезновения признаков влаги или до постоянного веса;
- использование одинаковых подложек (на которые помещается препарат);
- выполнение всех измерений на одной установке, с одним и тем же счетчиком и на одной и той же подставке;
- систематический контроль воспроизводимости измерений;
- проведение измерений активности препаратов по возможности с одинаковой статистической точностью.

С учетом всех условий стандартизации при относительных измерениях можно ограничиться минимальным количеством поправок и вычислять скорость счета препарата $N_{пр}$ по формуле

$$N_{пр} = NK_{\tau} - N_{\phi},$$

где N – измеренная скорость счета; K_{τ} – поправка на мертвое время; N_{ϕ} – фон счетчика.

Если скорость счета сравнительно невелика (менее 2000 имп/мин), поправкой на мертвое время можно пренебречь (считать $K_{\tau} \approx 1$) и из результата измерения лишь вычесть фон:

$$N_{пр} = N - N_{\phi}.$$

При определении абсолютной активности препарата используют проточные 4л-счетчики, учитывая лишь поправки на фон счетчика и при необходимости на его мертвое время, или метод торцового счетчика с фиксированной геометрией, который требует введения всех возможных поправок.

Прежде чем вести речь о поправках, следует рассмотреть такие понятия, как эффективность счетчиков и эффективность счета. Под эффективностью счетчика ϵ понимают отношение числа частиц или кван-

тов, вызвавших разряд, к их числу, попавшему за то же время в рабочий объем счетчика. Обычный счетчик регистрирует практически все электроны и другие заряженные частицы. Эффективность гамма-счетчиков в сотни и даже тысячи раз меньше эффективности бета-счетчиков ($\varepsilon_{\beta} = 1$; $\varepsilon_{\gamma} \leq 0,01$).

Под эффективностью счета F любого радиоактивного излучения подразумевается отношение числа зарегистрированных импульсов к полному числу частиц или квантов, испускаемых за это же время радиоактивным образцом [5]. Зная эффективность счета и скорость счета, легко рассчитать абсолютную активность препарата.

Поправки. Большинство поправок используется при расчетах абсолютной активности в случае определения ее по методу торцового счетчика с фиксированной геометрией.

Фон счетчика. При отсутствии радиоактивного препарата счетчик регистрирует импульсы, происхождение которых связано с рядом обстоятельств, к числу которых относятся действие космических лучей, радиоактивных загрязнений и наличие так называемого собственного фона счетчика.

Космические лучи зарождаются в глубинах Вселенной и представляют собой поток атомных ядер и ядерных частиц чрезвычайно высокой энергии. При взаимодействии с атомными ядрами атмосферы они генерируют вторичное излучение, состоящее из нуклонов, электронов, других корпускул и гамма-квантов. Один квадратный сантиметр земной поверхности на уровне моря ежеминутно бомбардирует ориентировочно одна космическая частица.

Радиоактивные загрязнения поверхности счетчика, окружающих его предметов, посторонние источники проникающего излучения вносят определенный вклад в фон.

Собственный фон счетчика обусловлен присутствием микроколичеств естественных радиоактивных элементов в материалах, из которых изготовлен счетчик. Сюда же относят самопроизвольные разряды разного происхождения, включая ложные импульсы.

Фон счетчика может быть ослаблен путем помещения его и измеряемого образца в свинцовый домик с толщиной стенок около 5 см, который практически полностью задерживает излучение от внешнего загрязнения и в 2 – 2,5 раза уменьшает космический фон.

Поправка на мертвое время. В связи с тем, что регистрация частицы и возвращение аппаратуры в исходное состояние занимают определенное время, установка обладает способностью регистрировать их

с конечной максимально возможной скоростью. Она называется разрешающей способностью и равна максимальному числу импульсов, регистрируемых в единицу времени. Минимальный интервал времени между двумя последовательными импульсами, при котором они считаются раздельно, называется разрешающим временем τ , которое относится в целом к счетной установке. Разрешающее время отдельных устройств установки называется мертвым временем. Мертвое время имеют электронная схема, электромеханический счетчик (если он имеется) и газоразрядный счетчик. Максимальное мертвое время, которое определяет разрешающую способность установки, имеет газоразрядный счетчик ($\tau = \tau_{cv}$).

Мертвое время самогасящегося счетчика Гейгера-Мюллера $\tau_{cv} = 1 - 3 \times 10^{-4}$ с.

В связи с наличием мертвого времени возможны случаи, когда интервал между последовательно попадающими в рабочий объем счетчика частицами будет меньше τ_{cv} и две таких частицы будут зарегистрированы как одна. Число незарегистрированных частиц при этом будет расти с увеличением скорости счета. Их учет осуществляют путем введения поправки на мертвое время:

$$N_0 = NK_{\tau},$$

где N_0 – «истинная» скорость счета; N – число частиц, зарегистрированных за минуту счетной установкой; K_{τ} – поправка на мертвое время ($K_{\tau} > 1$)

Поправка K_{τ} вычисляется для каждого значения N по формуле

$$K_{\tau} = 1 / (1 - N\tau_{cv}).$$

Значение τ_{cv} находят экспериментальным путем.

Поправка на радиоактивный распад. Если по характеру исследования приходится измерять активность проб в разные моменты времени в интервале, соизмеримом с периодом полураспада $T_{1/2}$ применяемого радиоизотопа, необходимо результаты каждого измерения привести к начальному моменту времени. Для этого скорость счета N_t в момент времени t умножают на поправку K_{λ} , вычисляемую по формуле

$$K_{\lambda} = e^{0,693t / T_{1/2}}.$$

Тогда скорость счета N_0 , привязанная к начальному моменту времени,

$$N_0 = N_r K_\lambda.$$

Значение $K_\lambda > 1$.

Поправка на поглощение. На пути от препарата до рабочего объема счетчика происходит ослабление потока частиц (например электронов) за счет поглощения воздухом и стенкой счетчика, которое подчиняется экспоненциальному закону. Этому же закону подчиняются и скорости счета, соответствующие числу бета-частиц, падающих на поглотитель (N_0') и прошедших через него (N_d'):

$$N_d' = N_0' e^{-\mu' d},$$

где N_d' и N_0' – скорости счета, исправленные на мертвое время и фон счетчика, которые мы раньше обозначали как $N_{np} = NK_\lambda - N_\phi$; d – толщина поглотителя, выраженная в $г/см^2$ ($d = \rho x$, где ρ – плотность поглотителя в $г/см^3$; x – толщина его в см); $\mu' = \mu / \rho$ – массовый коэффициент поглощения, характеризует степень поглощения бета-излучения данного изотопа при прохождении слоя любого вещества толщиной 1 $г/см^2$; μ – линейный коэффициент поглощения, характеризует степень поглощения данного бета-излучения при прохождении слоя вещества толщиной 1 см.

Коэффициент μ' определяется экспериментально, хотя для жесткого бета-излучения (максимальная энергия $E_M > 0,5$ МэВ) может быть рассчитан по формуле:

$$\mu' = 22 \times E_M^{-1,33} \text{ (см}^2/\text{г)}.$$

Его величина приблизительно одинакова для разных веществ.

Максимальная энергия бета-спектров (и период полураспада) некоторых радиоактивных изотопов [6]:

Изотоп	H ³	C ¹⁴	Na ²⁴	P ³²	S ³⁵	Ca ⁴⁵	Sr ⁹⁰	Y ⁹⁰	Tl ²⁰⁴
E_M (МэВ)	0,018	0,155	1,390	1,708	0,169	0,254	0,610	2,27	0,765
$T_{1/2}$	12,4 года	5720 лет	15,1ч	14,3 сут	87,1 сут	163 сут	~ 28 лет	2,54 сут	2,7 года

Применительно к торцовому счетчику суммарная толщина поглощающего слоя Z включает толщину слоя воздуха $x_{\text{возд}}$ между препаратом и окном счетчика и толщину окна (стенки) счетчика

$$d_{\text{см}} = x_{\text{см}} \times \rho_{\text{см}};$$

$$Z(\text{мг/см}^2) = x_{\text{возд}} \times \rho_{\text{возд}} + d_{\text{см}}.$$

Значение $d_{\text{см}}$ обычно указывается на счетчике (или в его паспорте), $\rho_{\text{возд}} = 1,29 \text{ мг/см}^3$, откуда

$$Z = 1,29 \times x_{\text{возд}} + d_{\text{см}}.$$

Поправка на поглощение

$$K_n = N_d / N_0 = e^{-\mu'Z}.$$

Для большей точности вместо Z следует брать эффективную толщину $Z_{\text{эфф}}$, которая зависит от значения геометрического фактора η (см ниже):

η	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
$Z_{\text{эфф}} / Z$	1,05	1,12	1,18	1,27	1,37

Для длинного цилиндрического счетчика в обычных условиях измерения $Z_{\text{эфф}} = 2Z$.

При абсолютных измерениях активности бета-излучающих препаратов поправка на поглощение является одной из наиболее существенных поправок.

Поправка на самоослабление. Частицы, испускаемые препаратом в сторону счетчика, испытывают поглощение материалом препарата и тем большее, чем глубже от поверхности они находятся. При толщине препарата больше максимального пробега R_M частицы из нижерасположенных слоев препарата вообще выходить наружу не могут, поскольку R_M – это толщина поглотителя, которая полностью задерживает бета-частицы данного изотопа. Чтобы учесть поглощение бета-частиц веществом самого радиоактивного препарата, ввели поправку на самоослабление в виде коэффициента S . Он равен отношению числа частиц, испускаемых с поверхности препарата в телесный (объемный) угол Ω счетчика, к числу частиц, испускаемых всем препаратом в этот телесный угол. Истинная скорость счета (N_0') равна замеренной

(N_{np}), деленной на коэффициент самоослабления (S):

$$N_0' = N_{np} / S.$$

Коэффициент S всегда меньше 1, его значение помимо толщины препарата сложным образом зависит от атомного номера материала источника и максимальной энергии бета-частиц. Обычно его находят эмпирически, хотя имеется возможность приближенно рассчитать по формулам. Результаты расчета представлены в таблицах [6]:

$l/d_{1/2}$	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
S'	0,72	0,62	0,54	0,48	0,42	0,34	0,28	0,24	0,21	0,18	0,16	0,14

h/r	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,5	2,0	3,0	7,0
ξ	1,16	1,30	1,40	1,50	1,57	1,67	1,71	1,76	1,80

В таблицах обозначены:

l – толщина препарата;

$d_{1/2}$ – толщина половинного поглощения излучения материалом препарата (измеряется как и l в мг/см², ослабляет начальную плотность потока в 2 раза);

S' – коэффициент самоослабления без учета саморассеяния частиц, обусловленного их неизотропным распределением;

ξ – фактор самоослабления, для торцового счетчика зависит от отношения расстояния препарата до окна торцового счетчика (h) к радиусу окна счетчика (r). Значение коэффициента $S = S' \times \xi$.

Образцы с толщиной $l < d_{1/2}$ называются тонкими.

Если $l < 0,2d_{1/2}$ (очень тонкие образцы), то в первом приближении принимают $S = 1$.

Если $d_{1/2} < l < R_M$ (средние образцы), то используют представленные выше таблицы.

Если $l \geq R_M$ («бесконечно толстые» образцы), то скорость счета перестает зависеть от дальнейшего увеличения толщины l образца.

Поправка на обратное рассеяние. Радиоактивные препараты при радиометрических измерениях помещают на подложки, изготов-

ливаемые из различных материалов (стекла, металла, пластмассы). При этом некоторое количество бета-частиц, исходно летящих мимо счетчика, отражается от ядер материала подложки и попадает в рабочий объем счетчика. В результате получают завышенный результат скорости счета. Чтобы найти истинное значение скорости счета (N_0'), замеренную скорость счета (N_{np}) необходимо разделить на коэффициент обратного рассеяния q , под которым понимают отношение скорости счета от препарата с подложкой к скорости счета без подложки ($q > 1$). Коэффициент обратного поглощения зависит от толщины подложки, атомного номера ее материала, значения E_M бета-спектра и др. С увеличением толщины подложки q растет до определенного значения и после толщины насыщения $d_{нас}$ перестает изменяться. Значение q находят экспериментальным путем. В случае сравнительных измерений активности, если препараты нанесены на одинаковые подложки с толщиной, превышающей $d_{нас}$, поправка на обратное рассеяние может не учитываться.

Геометрический фактор. При измерениях бета-активности с помощью газоразрядного счетчика регистрируются лишь те частицы, которые летят в его рабочий объем. Регистрируемая часть излучения заключена в пределах телесного угла Ω , под которым чувствительный (рабочий) объем счетчика «виден» из центра препарата. Этот угол (в стерадианах) для торцового счетчика может быть рассчитан по формуле, выведенной по чисто геометрическим правилам:

$$\Omega = 2\pi(1 - h / \sqrt{h^2 + r^2}),$$

где h – расстояние от препарата до окна счетчика; r – радиус окна счетчика.

На основании этой формулы может быть найден геометрический фактор η , который определяет, какая доля из общего числа частиц, испускаемых препаратом равномерно во все стороны, направлена в чувствительный объем счетчика. Поскольку полный телесный угол сферы равен 4π , то по чисто геометрическим соображениям

$$\eta = \Omega / 4\pi.$$

Для торцового счетчика

$$\eta = (1 - h / \sqrt{h^2 + r^2}) / 2 = [1 - 1 / \sqrt{1 + (r/h)^2}] / 2.$$

Для цилиндрического счетчика

$$\eta_{\text{цпл}} = (l \arcsin(r/h)) \pi \sqrt{l^2 + h^2},$$

где l – половина длины чувствительного объема счетчика;

h – расстояние от препарата до продольной оси счетчика.

Для нахождения полного числа бета-частиц, испускаемых препаратом, необходимо скорость счета (с учетом всех поправок) разделить на значение геометрического фактора η .

Ошибки измерений в радиометрии. Радиоактивный распад обусловлен внутренними закономерностями, свойственными ядрам и порождается их неустойчивостью. Он подчиняется законам статистики, в соответствии с которыми скорость распада ядер, а следовательно, и скорость счета не остаются строго постоянными. Они изменяются по закону случайных чисел, флуктуируя вокруг среднего значения.

Статистический характер радиоактивного распада приводит к появлению случайных ошибок измерения, называемых статистическими ошибками.

Ошибки измерения. Средняя квадратичная статистическая ошибка скорости счета

$$D_N = \sqrt{N/t},$$

где N – скорость счета; t – время счета.

Относительная статистическая ошибка скорости счета (точность результата)

$$\delta_N = D_N / N = 1 / \sqrt{Nt}.$$

Для фона ошибка

$$D_\phi = \sqrt{N_\phi / t_\phi}.$$

Поскольку $N_{\text{пр}} = N - N_\phi$, то его средняя квадратичная статистическая ошибка

$$D_{\text{пр}} = \sqrt{D_N^2 + D_\phi^2}.$$

Результаты измерения записывают соответственно в виде:

$$N_\phi \pm D_\phi; \quad N_{\text{пр}} \pm D_{\text{пр}}.$$

Относительные ошибки скорости счета фона и препарата

$$\delta_{\phi} = D_{\phi} / N_{\phi}; \quad \delta_{np} = D_{np} / N_{np} = (\sqrt{N_{\phi} / t_{\phi} + N / t}) / (N - N_{\phi}).$$

Выбор времени измерения. Корректное сравнение результатов измерения предполагает, что они получены с одинаковой точностью. Если желательно выполнить эксперимент с заданной точностью, то с помощью приведенных выше формул можно вычислить необходимое для этого время счета. Чтобы это сделать, нужно в предварительном опыте найти значения N_{np} , N , N_{ϕ} , δ_{np} , а затем по формулам определить время измерения общего числа импульсов

$$t = (N + \sqrt{NN_{\phi}}) / (\delta_{np}^2 N_{np}^2)$$

и фона

$$t_{\phi} = (N_{\phi} + \sqrt{NN_{\phi}}) / (\delta_{np}^2 N_{np}^2)$$

Задание 6. Для конкретного газоразрядного счетчика определить значение мертвого времени и рассчитать поправки на мертвое время.

Для этого взять два радиоактивных препарата с большими скоростями счета и разместить их на фиксированное место под счетчиком, по возможности ближе к нему. В течение 20 мин измерить число импульсов для обоих препаратов (n_{12}). Затем один из препаратов убрать и в течение 20 мин измерить число импульсов для оставшегося препарата (n_1).

После этого ранее убранный препарат поставить на старое место под счетчиком, убрать первый препарат и вновь в течение 20 мин определить число импульсов для второго препарата (n_2).

Убрать препараты из-под счетчика и в течение 10 мин измерить фон.

Вычислить скорости счета для двух препаратов (N_{12}), каждого из них по отдельности (N_1, N_2) и фона (N_{ϕ}).

Мертвое время счетчика найти по формуле (в минутах)

$$\tau_{cv} = (N_1 + N_2 - N_{12}) / 2N_1N_2.$$

Чтобы выразить $\tau_{сч}$ в секундах, полученное значение необходимо умножить на 60.

На основании значения $\tau_{сч}$ предлагается рассчитать поправки на мертвое время по формуле:

$$K_{\tau} = 1/(1 - N\tau_{сч})$$

для скоростей счета (имп/мин):

2 000; 3 000; 4 000; 5 000; 6 000; 7 000; 8 000; 9 000;

10 000; 12 000; 15 000; 20 000; 25 000.

Результат представить в форме таблицы и графика в осях $K_{\tau} - N$.

В формулу для вычисления K_{τ} значение $\tau_{сч}$ необходимо подставлять в минутах.

Задание 7. Снять кривую поглощения бета-излучения в алюминии. Для этого в течение 10 мин измерить фон. Затем последовательно измерить скорость счета препарата Tl^{204} (таллий-204) без алюминиевой пластинки, с одной, двумя, тремя и т. д. пластинками, помещая их между препаратом и счетчиком. Измерения производить до тех пор, пока скорость счета не сравняется с фоном. Для большей точности в каждом случае необходимо зарегистрировать не менее 2500 импульсов.

Вычислить значения $N_{np} = NK_{\tau} - N_{\phi}$ и в масштабе построить графики зависимости от d значений N_{np} и $\lg N_{np}$. Значение d откладывать в единицах $г/см^2$, учитывая, что для алюминия $\rho = 2,7 г/см^3$. Толщину пластинки взять как среднее арифметическое, замерив пакет из 10 пластинок.

График зависимости $\lg N_{np}$ от d представляет собой прямую линию, ход которой нарушается при приближении N_{np} к фону. На полученной прямой выбрать две достаточно удаленные друг от друга точки с абсциссами d_1 и d_2 (рис. 6), для них на оси ординат найти значения $\lg N_{np1}$, $\lg N_{np2}$ и определить массовый коэффициент поглощения μ' ($см^2/мг$) по формуле

$$\mu' = 2,3(\lg N_{np1} - \lg N_{np2})/(d_2 - d_1).$$

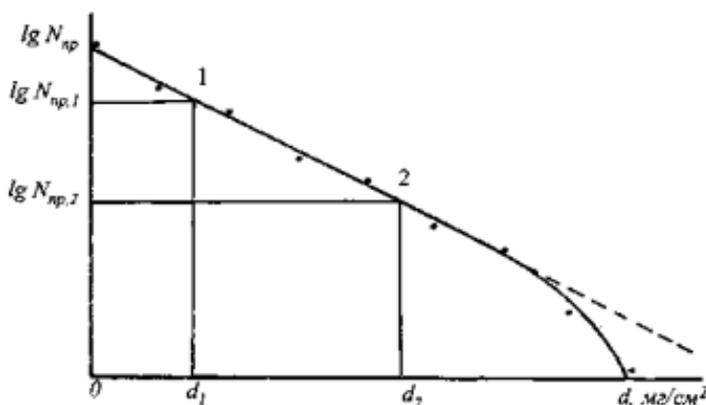


Рис. 6. Экспериментальный график ослабления бета-излучения с помощью алюминиевых пластинок

По формуле

$$d_{1,2} = \ln 2 / \mu' = 0,693 / \mu'$$

вычислить величину половинного поглощения (в мг/см²) для алюминия.

Задание 8. Определить абсолютную активность препарата методом торцового счетчика с фиксированной геометрией. Для этого радиоактивный образец диаметром 2-3 мм помещают на некотором расстоянии (> 20 мм) от окна счетчика на продолжении его оси. Под окном счетчика на строго фиксированном расстоянии от образца помещают точно калиброванную диафрагму, толщина которой превышает значение R_M бета-излучения исследуемого изотопа (рис. 7).

По формуле

$$\eta = 0,5 \left(1 - 1 / \sqrt{1 + (r/h)^2} \right)$$

вычисляют геометрический фактор и с учетом ранее рассмотренных поправок находят значение абсолютной активности A (расп/мин) препарата.

Задание 9. Рассчитать ошибки измерения при регистрации бета-частиц и найти время измерения числа отсчетов для заданной точности. С этой целью измеряют скорость счета препарата Tl^{204} и фон для опре-

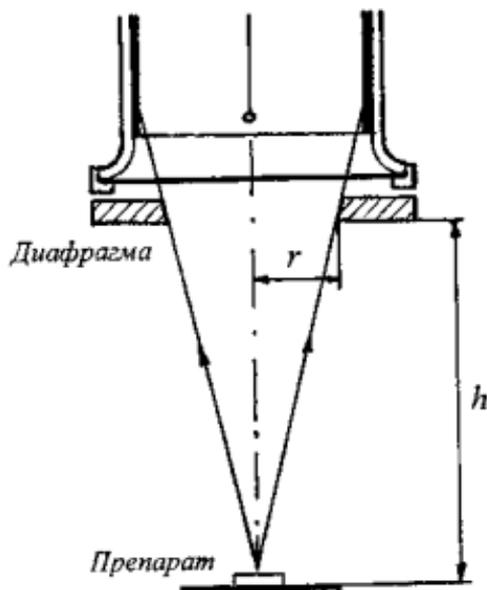


Рис. 7. Схема установки для определения абсолютной активности методом торцевого счетчика с фиксированной геометрией

деленного времени t , после чего вычисляют значения $N \pm D_N$,

$N_\phi \pm D_\phi$, $N_{пр} \pm D_{пр}$, δ_N , δ_ϕ , $\delta_{пр}$ по рассмотренным ранее формулам.

На основании этих значений рассчитывают время измерения общего числа импульсов (t) и фона (t_ϕ) для заданной точности δ (формулы приведены выше).

Сцинтилляционный счетчик

Радиометрическая установка для измерения активности с помощью сцинтилляционного счетчика принципиально не отличается от рассмотренной ранее, работающей с газоразрядным счетчиком. Более того, нередко радиометр имеет входы для подключения как газоразрядного, так и сцинтилляционного счетчиков.

Устройство и работа сцинтилляционного счетчика. Сцинтилляционный счетчик включает сцинтиллятор (фосфор) и фотоэлектронный умножитель, помещаемые в светонепроницаемый кожух.

Сцинтилляторы. Для регистрации ядерных излучений используются органические и неорганические сцинтилляторы.

В органических сцинтилляторах световые вспышки (сцинтилляции) возникают в результате люминесценции (флуоресценции) отдельных молекул, возбужденных ядерным излучением. Вспышка возникает в течение короткого промежутка времени (10^{-9} – 10^{-8} с), что обеспечивает высокую разрешающую способность счетчика. Органические сцинтилляторы в большинстве случаев представляют собой ароматические углеводороды, молекулы которых содержат бензольные кольца. В счетчиках органические сцинтилляторы применяются в виде монокристаллов, а также жидких и твердых растворов.

Наибольшее распространение получили монокристаллы антрацена ($C_{14}H_{10}$), нафталина ($C_{10}H_8$), транс-стильбена ($C_{14}H_{12}$) и *p*-терфенила ($C_{18}H_{14}$).

В качестве жидких сцинтилляторов используются растворы органических фосфуров в жидких органических растворителях, например раствор *p*-терфенила в ксилоле (толуоле, диоксане) в концентрации 5 г/л, раствор 2,5-дифенилоксазола (PPO) в ксилоле или бензоле (4 г/л) и другие.

Пластические сцинтилляторы представляют собой твердые растворы люминесцирующих органических соединений в прозрачной пластмассе, например *p*-терфенила (2%) в полистироле, тетрафенилбутадиена (1%) в поливинилтолуоле.

Неорганические сцинтилляторы представляют собой кристаллы неорганических солей (обычно галоидных солей щелочных металлов) с добавлением небольших количеств примесей, выполняющих роль активаторов люминесценции. Неорганические кристаллы сцинтиллируют в результате возбуждения всей кристаллической решетки как целого. Время высвечивания у них, в отличие от органических сцинтилляторов, более длительное – 10^{-7} – 10^{-5} с.

Спектральный состав света, излучаемого как органическими, так и неорганическими сцинтилляторами, находится на границе ультрафиолетового и видимого диапазонов (приблизительно 350 – 500 нм).

Фотоэлектронные умножители. ФЭУ представляет собой фотоэлемент с многократным усилением, основанным на явлении вторичной электронной эмиссии. Он был изобретен в 1930 г. советским инженером Л.А. Кубецким. ФЭУ состоит из фотокатода, фокусирующего электрода, эмиттеров (динодов) и анода (рис. 8). Все электроды ФЭУ помещены в стеклянный баллон с высоким вакуумом.

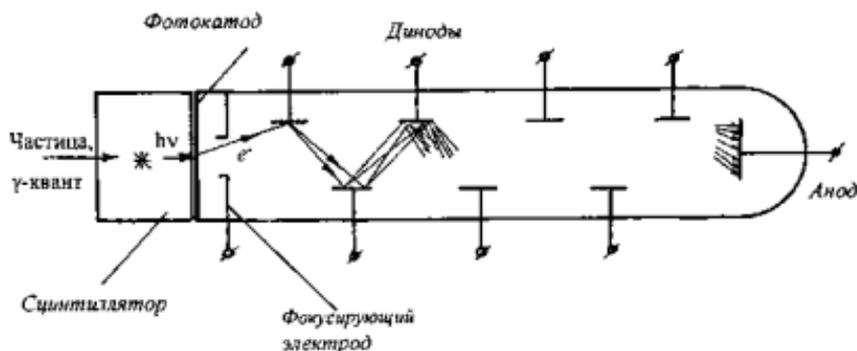


Рис. 8. Принципиальная схема фотоэлектронного умножителя

На внутреннюю торцовую поверхность баллона испарением в вакууме нанесена тонкая (1 мкм) полупрозрачная пленка, состоящая из смеси сурьмы и цезия, которая обладает очень малой работой выхода электронов. Эта пленка является фотокатодом, из которого световые кванты выбивают электроны (фотоэлектроны). Эмиттеры изнутри покрыты тонким слоем сурьмы и цезия и имеют корытообразную форму (для лучшего собирания электронов). Их число в ФЭУ обычно равно 8–15. На эмиттеры подается отрицательный потенциал, возрастающий в направлении к аноду на 100 вольт при переходе от одного динода к другому.

Световые кванты, возникающие при попадании ядерного излучения (частицы или гамма-кванта) в сцинтиллятор, выбивают из фотокатода фотоэлектроны. Они увлекаются и фокусируются электрическим полем фокусирующего электрода, ускоряются электрическим полем первого динода (D_1) и при попадании на него выбивают несколько вторичных электронов, среднее число которых называют коэффициентом вторичной эмиссии σ . Электроны, выбитые с поверхности D_1 , направляются к следующему диноду (D_2), по пути к которому ускоряются и выбивают из него тоже по нескольку вторичных электронов. Так, при переходе от одного динода к другому лавинообразно нарастает число электронов, которые в конце своего пути обрушиваются на анод. Общее число электронов (M), которое попадает на анод под действием одного выбитого из фотокатода электрона, называют коэффициентом усиления ФЭУ. Для ФЭУ с общим числом динодов m коэффициент усиления

$$M = \theta \sigma^m,$$

где θ – множитель, меньший 1, учитывающий неполное соби́рание электронов на динодах. Коэффициент усиления ФЭУ обычно составляет 10^4 – 10^9 (в зависимости от числа динодов).

Наряду с описанным типом сцинтилляционных счетчиков применяются жидкостно-сцинтилляционные счетчики, у которых радиоизотопы, выделенные из проб путем специальной их обработки, вводят в бьюксы с жидким сцинтиллятором. ФЭУ регистрирует вспышки, возникающие в этих бьюксах.

К достоинствам сцинтилляционных счетчиков относятся:

- высокая разрешающая способность по времени;
- высокая эффективность регистрации гамма-излучения, достигающая 100% при использовании кристаллов с «колодцем» (проба помещается в углубление в кристалле);
- универсальность, позволяющая регистрировать подавляющее число видов ядерных излучений;
- возможность применения для измерения энергии ядерных излучений, поскольку в большинстве случаев амплитуда импульса от сцинтилляционного счетчика пропорциональна энергии частицы, вызвавшей в фосфоре вспышку.

Одним из недостатков ФЭУ является наличие шумов (помех счета), обусловленное темновым током. Одна из причин их возникновения – термоэлектронная эмиссия с фотокатода и первых динодов. Снижают термоэлектронную эмиссию путем охлаждения ФЭУ.

Сцинтилляционные счетчики могут работать в режиме счета импульсов и интегральном (токовом) режиме, основанном на измерении величины среднего тока на выходе ФЭУ.

Установка с малым фоном

При измерении уровня радиоактивных загрязнений биосферы, при радиометрическом определении калия в почве и растительных продуктах, а также в ряде биологических исследований с применением метода радиоактивных индикаторов требуется определять активности порядка 10^{-11} – 10^{-12} кюри, которым соответствуют всего лишь десятки-единицы распадов в минуту. Обычные радиометрические установки не позволяют измерять такие малые активности с достаточной точностью даже при большом времени измерения [7]. Чтобы это стало возможным, необходимо радикальным образом снизить фон, поскольку пассивная защита с помощью свинцового домика имеет ограниченные возможности.

Фон, вызываемый жесткой компонентой космического излучения, которая практически не задерживается свинцовой защитой, может быть устранен с помощью метода антисовпадений. Сущность его заключается в следующем.

Рабочий счетчик окружен сплошным кольцом («ковром») защитных счетчиков. Импульсы с анодов рабочего счетчика и защитных счетчиков разделяются на электронную схему антисовпадений (рис. 9).

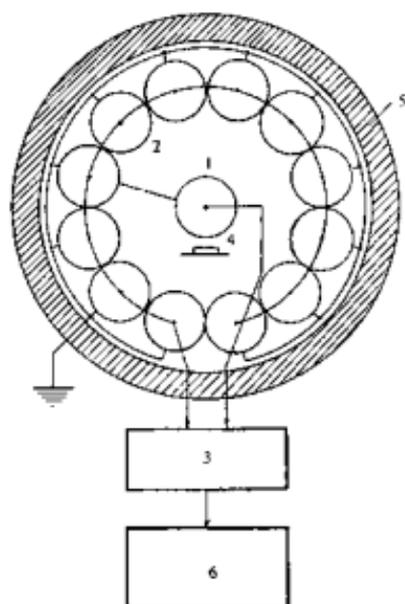


Рис. 9. *Схема включения рабочего и защитных счетчиков в схему антисовпадений: 1— рабочий счетчик; 2 — защитный счетчик; 3 — схема антисовпадений; 4 — проба; 5 —свинцовая защита; 6 — пересчетная схема радиометра*

Схема антисовпадений гасит сигналы, попадающие в нее одновременно с рабочего и защитных счетчиков (космическое излучение) и выдает сигнал на пересчетную схему радиометра (на регистрацию), если импульс возник при разряде только в рабочем счетчике (вызван ядерным излучением из пробы).

Имеются установки, фон которых составляет лишь десятые доли имп/мин.

Радиометрические приборы. Приборы для измерения ионизирующих излучений можно условно разделить на три категории: ра-

Диометры, дозиметры и электронная аппаратура для ядерно-физических исследований.

Радиометры предназначены для измерения активности радиоактивных препаратов и других источников излучений.

Для измерения активности препаратов и потоков частиц в лабораторных условиях применяют стационарные радиометры, которые имеют достаточно большую массу и питаются от электрической сети. Они позволяют с высокой точностью осуществлять дискретный счет попавших в детектор частиц и квантов. Кроме того, имеются стационарные радиометры, которые измеряют не количество зарегистрированных импульсов за определенное время, а среднюю скорость счета в имп/с. Они называются интенсиметрами.

Переносные (полевые) радиометры отличаются малыми габаритами и автономным электрическим питанием. Они, как правило, менее точны, чем стационарные радиометры и работают в режиме интенсиметра.

Дозиметры предназначены для измерения экспозиционной и поглощенной доз излучения или соответствующих мощностей доз, а также для контроля и измерения загрязненности рабочих мест. Проградуированы в единицах дозы. Особой разновидностью дозиметрических приборов являются индивидуальные дозиметры разных конструкций (фотопленочные, термолюминесцентные, конденсаторные). Основные требования к ним – простота измерений, надежность, минимальные размеры и вес.

Аппаратура для ядерно-физических исследований включает усилители, дискриминаторы и анализаторы импульсов, спектрометры, схемы совпадений и антисовпадений и др.

Задание 10. Познакомиться с устройством и работой стационарного интенсиметра (тип 1877). Произвести с его помощью измерение скорости счета радиоактивного препарата. Переключить счетчик на радиометр с дискретным счетом (тип 1872 или 1873) и с его помощью определить скорость счета для этого же препарата. Сравнить это значение с полученным на интенсиметре.

Задание 11. Познакомиться с устройством и работой переносного измерителя излучения (тип 1864) и комплекта индивидуального дозиметрического контроля.

ЧЕТВЕРТАЯ ТЕМА

Радиоавтография

Все ядерные ионизирующие излучения оказывают фотографическое действие на фотозмульсию. Радиоавтография заключается в получении фотографического изображения в результате действия на фотозмульсию излучения радиоактивных элементов, находящихся в исследуемом объекте. Она позволяет установить локализацию радиоизотопов в биологическом объекте.

Сущность радиоавтографии состоит в том, что ядерные ионизирующие излучения оказывают фотографическое действие на фотозмульсию. Они производят ионизацию и возбуждение молекул бромистого серебра, входящего в состав фотозмульсий, при этом образуется скрытое фотографическое изображение. После обработки фотозмульсии проявителем скрытое изображение становится видимым, причем степень почернения изображения прямо пропорциональна дозе излучения, полученной фотозмульсией.

Радиоавтография дополняет радиометрию, по сравнению с которой по некоторым показателям имеет преимущества. К их числу относятся:

1. Возможность обнаружить очень низкую активность. Она основана на способности фотозмульсии накапливать количество экспонированных микрокристаллов в процессе экспозиции, которая может занимать длительное время, а также отсутствие поглощения в промежуточной среде. Фотозмульсия регистрирует до 50% распадов (2π-геометрия), происходящих в объекте, а в случае заключения тонкого объекта между двумя слоями эмульсии – до 100% распадов (4π-геометрия).

2. Возможность установления локализации меченых соединений в биологических объектах.

3. Возможность работы с цитологическими объектами.

4. Радиоавтограмма представляет собой документ, доступный для повторной проверки и удобный для публикации.

К числу недостатков относятся значительный промежуток времени, необходимый для получения результата, и преимущественно качественный характер радиоавтографии.

Макро- и микрорадиоавтография. Макрорадиоавтография применяется для изучения распределения меченого соединения в срезе органа, органе и даже в целом организме. Макрорадиоавтограмма рассматривается обычно невооруженным глазом. Ее, как правило,

получают путем наложения препарата, содержащего радиоактивный изотоп, на фотопленку или фотопластинку и обработки последних после длительной экспозиции с помощью проявителя и закрепителя. Для получения макрофотоавтоматографии наиболее пригодна рентгеновская техническая (РТ) и рентгеновская медицинская (РМ) пленки. Рентгеновская фотоэмульсия крупнозернистая с диаметром зерен 1–2 мкм, обладает высокой чувствительностью к бета-излучению, малочувствительна к темно-красному свету.

Микрофотоавтоматография применяется для изучения локализации меченого соединения в ткани и клетке. Для этого обычно предварительно готовят тонкий срез ткани с помощью микротомы, а затем приводят полученный срез в контакт с фотоэмульсией, обладающей высокой разрешающей способностью. Таким свойством обладают ядерные эмульсии, средний диаметр зерен которых равен 0,3 мкм. Обработка ядерных эмульсий производится при зелено-желтом светофильтре или в темноте.

Связь между интенсивностью облучения фотопленки (фотоэмульсии) и степенью почернения ее после проявления выражают с помощью характеристической кривой (рис. 10).

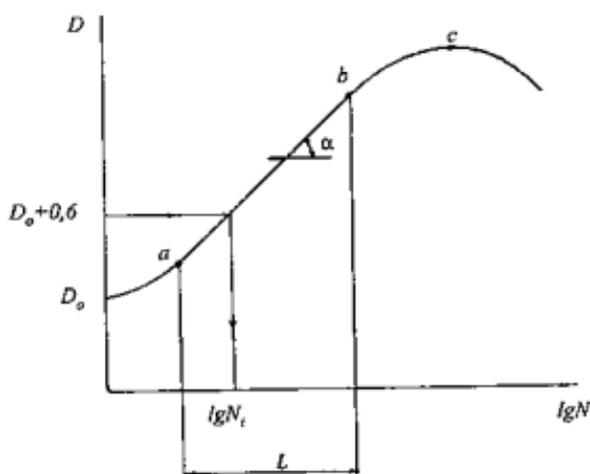


Рис. 10. Характеристическая кривая фотопленки: D_0 – вуаль (для рентгеновских пленок $D_0=0,05-0,15$); $D_0\alpha$ – область недодержек; ab – область нормальных выдержек; bc – область передержек; L – фотографическая ширина эмульсии; $lg\alpha$ – контрастность фотоэмульсии; N_i – чувствительность фотоэмульсии

Чувствительность эмульсии равна числу бета-частиц, которое должно попасть на 1 см^2 эмульсии и создать почернение, оптическая плотность которого будет превышать вуаль D_0 на 0,6 единицы оптической плотности. Для участка нормальных выдержек ab зависимость оптической плотности от $\lg N$ линейная. Чем больше фотографическая ширина эмульсии L , тем больше диапазон значений оптической плотности, в котором достаточно просто осуществлять сравнение количественного содержания радиоизотопов в различных участках радиоавтограммы.

Разрешающая способность метода. Под разрешающей способностью радиоавтографии понимают минимальное расстояние между двумя источниками излучения в объекте, которые на радиоавтограмме видны отдельно. От нее зависит, насколько детально может быть определена локализация радиоизотопа в биологическом объекте. Разрешающая способность повышается с уменьшением толщины фотоэмульсии, объекта (например среза), расстояния от источника излучения до фотоэмульсии, энергии бета-частиц (в этом отношении удобен тритий) и размера зерна фотоэмульсии.

Этапы проведения радиоавтографии. Радиоавтографическое исследование начинают с введения меченого соединения в изучаемый объект. Затем необходимо с помощью торцового счетчика определить скорость счета той части объекта, которая будет контактировать с фотоматериалом, и зафиксировать объект (путем быстрого высушивания, замораживания и т.д.). После этого следует рассчитать время экспозиции для выбранного фотоматериала, осуществить тесный контакт его с исследуемым объектом и оставить их на экспонирование. После истечения срока экспонирования в стандартных условиях осуществляют фотографическую обработку пленки и анализ полученной радиоавтограммы (рис.11).

Расчет времени экспозиции. Время экспозиции

$$t = \frac{T_{1/2}}{0,693k} \ln\left(\frac{1}{1 - 0,693N_i / (T_{1/2}A_0)}\right),$$

где $T_{1/2}$ – период полураспада радиоизотопа (в минутах); N_i – чувствительность фотоэмульсии (бета-частицы/см²); A_0 – число частиц, испускаемых радиоактивным объектом в направлении фотоэмульсии с 1 см^2 площади радиоактивного объекта в минуту; k – фактор эффективности, который отражает долю падающих частиц, участвующих в формировании радиоавтографического изображения. Для альфа-частиц и мягкого бета-излучения $k = 1$, для жесткого излучения можно принять $k = 0,7$.



Рис. 11. Радиоавтограмма, характеризующая распределение фосфора P^{32} в растении (фасоли). Позитивное изображение, полученное после печатания негатива на фотобумаге

Значение A_0 вычисляют по формуле $A_0 = N / FS$, где: N – среднее значение скорости счета объекта, зарегистрированное торцовым счетчиком; F – эффективность регистрации бета-частиц торцовым счетчиком (принять $F = 0,6$); S – площадь окна счетчика (см^2), вычисляется по формуле $\pi D^2 / 4$ (D - диаметр окна счетчика в см). Рассчитанное в минутах время экспозиции переводят в часы (и сутки).

Для того, чтобы перевести десятичный логарифм в натуральный (если нет возможности найти его непосредственно), необходимо значение десятичного логарифма умножить на 2,303.

Задание 12. На основании исходных данных, полученных у преподавателя (радиоизотоп, N_1 , N , D), по приведенной выше формуле вычислить необходимое время экспозиции (индивидуально для каждого студента).

ПРАВИЛА РАБОТЫ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИБОРАХ И ОБОРУДОВАНИИ

Общие правила техники безопасности

подавляющее число лабораторных приборов и оборудования во время работы питаются от электрической сети с напряжением 220 и 380 вольт, которое опасно для жизни. Чтобы эта опасность не стала реальностью, как и в случае с работой на радиометрических установках, запрещается:

- работать без надежного заземления прибора;
пользоваться сетевым шнуром с поврежденной изоляцией, поврежденными вилкой и розеткой;
касаться токоведущих частей включенного в сеть прибора;
- осуществлять ремонт прибора и открывать его защитные крышки, когда он включен в сеть;
включать в сеть незнакомый прибор, не изучив инструкцию по работе на нем. В случае возникновения нештатной ситуации в работе прибора необходимо незамедлительно выключить его и сообщить об этом преподавателю, ведущему занятие.

Ниже представлены правила работы на широко распространенных лабораторных приборах и оборудовании.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЦЕНТРИФУГИ

Общие для центрифуг дополнительные требования по технике безопасности

Запрещается:

- включать центрифугу без установленного ротора;
- работать с открытыми крышками ротора и центрифуги;
- размещать в роторе нечетное число пробирок;
работать с разностью массы заполненных раствором диаметрально противоположных пробирок более 0,5 г;
- работать на частотах вращения и загружать роторы центрифуга-том выше указанных в паспорте значений;
работать со стеклянными пробирками при скорости вращения выше 2000 об/мин (для ЦЛН-2 – более 4000 об/мин) и без резиновых прокладок;

- применять нештатные пробирки;
- открывать крышку центрифуги до полной остановки ротора.

Центрифуга лабораторная настольная ЦЛН-2

Подготовка к работе:

1. Поставить центрифугу на горизонтальную плоскость.
2. Перед началом работы с пробирками из стекла проверить наличие резиновой прокладки в каждой ячейке ротора.
3. Открыть крышку центрифуги, оттянув пружину замка.
4. Плотно насадить ротор на вал электродвигателя.
5. Наполнить и разместить пробирки в роторе. При неполной загрузке каждую пару наполненных пробирок разместить в диаметрально противоположных ячейках.
6. Плотно закрыть ротор крышкой, навинтив ее на выступающий резьбовой конец вала электродвигателя против часовой стрелки.
7. Закрыть крышку центрифуги до щелчка в замке.
8. Поставить ручку-ключик в положение «0».

Порядок работы:

1. Подключить центрифугу к источнику питания.
2. Ручку-ключик вращать в сторону увеличения числа оборотов ротора до требуемых оборотов, выдерживая ее на каждой ступени не менее 40 с.
3. По окончании работы поставить ручку-ключик в положение «0».
4. После остановки ротора открыть крышку центрифуги, отвинтить крышку ротора и вынуть из него пробирки.

Центрифуга лабораторная медицинская ОПн-8

Подготовка к работе:

1. Установить центрифугу на ровную горизонтальную поверхность.
2. Плотно насадить ротор на вал электродвигателя.
3. Установить пробирки, заполненные центрифугатом, в гнезда ротора. Стеклообразные пробирки устанавливаются в роторе с резиновыми прокладками под каждую пробирку. При неполной загрузке центрифуги каждую пару наполненных пробирок размещать в диаметрально противоположных гнездах ротора.
4. Закрепить ротор на валу привода при помощи крышки ротора.
5. Закрыть крышку центрифуги.

6. Подключить сетевой шнур центрифуги к сети переменного тока, установив предварительно выключатель цепи питания в отключенное положение.

Порядок работы

При работе центрифуги с часами:

1. Установить ручкой часовой механизм на требуемое время центрифугирования (с учетом времени разгона).
2. Выключатель часов установить во включенное положение (при этом на клавише станет видна красная точка).
3. Установить задатчиком частоты вращения ротора требуемое число оборотов.
4. Выключатель цепи питания установить во включенное положение (при этом на клавише станет видна красная точка). Ротор начнет вращаться и через 30-45 с автоматически достигнет заданной частоты вращения.
5. По истечении заданного времени произойдет автоматическое отключение напряжения цепи питания электродвигателя, и ротор начнет останавливаться.
6. Выключатель цепи питания центрифуги установить в отключенное состояние.
7. После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги, снять крышку ротора и вынуть из него пробирки.

При работе центрифуги без часов:

1. Выключатель часов установить в отключенное положение.
2. Установить задатчиком частоты вращения ротора требуемое число оборотов.
3. Выключатель цепи питания установить во включенное положение. Ротор разгонится до заданной частоты вращения.
4. По истечении требуемого времени центрифугирования выключатель цепи питания центрифуги установить в отключенное состояние.
5. После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги, снять крышку ротора и вынуть из него пробирки.

Центрифуга лабораторная рефрижераторная ЦЛР-1

Подготовка к работе:

1. Открыть крышку центрифуги.

2. Установить ротор на вал электропривода и надежно закрепить его. Если предстоит работа с механизмом увеличения частоты вращения ротора, установить его на вал механизма увеличения частоты вращения ротора.

3. Наполнить пробирки центрифугатом и разместить их в роторе. При неполной загрузке центрифуги каждую пару наполненных пробирок размещать только в диаметрально противоположных гнездах.

4. Закрыть ротор крышкой и завернуть гайку крышки ротора до отказа.

5. Закрыть крышку центрифуги.

6. Перед каждым запуском центрифуги все ручки управления должны находиться в исходном положении:

ручка РЕГУЛЯТОР ОБОРОТОВ в крайнем левом положении;

- тумблер сети в положении ОТКЛ.;

тумблер ТЕМПЕРАТУРА - ИЗМЕРЕНИЕ в положении ОТКЛ.;

- ручка ТЕМПЕРАТУРА - НИЖЕ - ВЫШЕ в положении ВЫШЕ;

ручка установки времени в нулевом положении;

- ручка переключения диапазонов измерения температуры в крайнем правом положении;

- тумблер КОМПРЕССОР в положении ОТКЛ.;

тумблер ЭЛЕКТРОЧАСЫ в положении ОТКЛ.

Порядок работы

При работе центрифуги с часами:

1. Подключить центрифугу к источнику питания.

2. Установить тумблер сети в положение ВКЛ.

3. Плавно и медленно повернуть ручку РЕГУЛЯТОР ОБОРОТОВ по часовой стрелке до загорания сигнальной лампы СЕТЬ.

4. Включить в работу холодильный агрегат, для чего необходимо:

- тумблер КОМПРЕССОР установить в положение ВКЛ.;

- повернуть ручку ТЕМПЕРАТУРА-НИЖЕ-ВЫШЕ в сторону ТЕМПЕРАТУРА-НИЖЕ до упора, при этом загорится сигнальная лампа КОМПРЕССОР.

5. Установить тумблер ТЕМПЕРАТУРА ИЗМЕРЕНИЕ в положение ВКЛ. и следить за температурой в рабочей камере по указателю температуры. Если стрелка указателя температуры после включения тумблера будет зашкаливать, то необходимо тумблер установить в положение ОТКЛ. и повторить включение через 5-7 мин. При последующем включении тумблера стрелка указателя температуры должна плавно смещаться по шкале до заданной температуры, при этом необходимо следить за своевременным переключением ручки диапазонов измерения температуры.

6. После достижения заданной температуры ручку **ТЕМПЕРАТУРА-НИЖЕ-ВЫШЕ** установить на границе включения и выключения холодильного агрегата. Эта граница находится несколькими поворотами ручки **ТЕМПЕРАТУРА-НИЖЕ-ВЫШЕ** в обе стороны таким образом, чтобы при малейшем движении ее в сторону **ТЕМПЕРАТУРА-ВЫШЕ** холодильный агрегат отключался. Дальнейшее регулирование температуры осуществляется автоматически.

7. Медленно (30-40 с) поворачивать по часовой стрелке ручку **РЕГУЛЯТОР ОБОРОТОВ** до требуемого значения числа оборотов, контролируя по шкале указателя частоты вращения. Верхней шкалой пользоваться при работе без механизма увеличения частоты вращения ротора, нижней – с этим механизмом.

8. Установить ручку электрочасов на заданное время и включить их тумблер.

9. По истечении заданного времени загорится сигнальная лампа **ТОРМОЗ**, ротор автоматически остановится. После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги, ключом отвернуть гайку крышки ротора и вынуть из него пробирки.

10. Все ручки управления и тумблеры на пульте управления установить в исходное положение. Если в течение рабочего дня требуется провести еще один или несколько циклов центрифугирования, рекомендуется не отключать холодильную систему после каждого цикла, а отключить ее только после окончания всей работы. При этом в процессе перезарядки ротора пробирками не рекомендуется на длительное время оставлять рабочую камеру с открытой крышкой.

При работе центрифуги без часов:

1. Выполнить все операции с п. 1 по п. 7 (см выше).

2. По истечении заданного времени центрифугирования нажать на кнопку **СТОП**, при этом загорится сигнальная лампа **ТОРМОЗ**.

3. Установить ручку **РЕГУЛЯТОР ОБОРОТОВ** в исходное положение.

4. Установить тумблер **КОМПРЕССОР** в положение **ОТКЛ.**

5. Установить тумблер сети в положение **ОТКЛ.**, при этом погаснет сигнальная лампа **СЕТЬ**.

6. После полной остановки ротора открыть крышку центрифуги, ключом отвернуть гайку крышки ротора и вынуть из него пробирки.

7. Выполнить п. 10 (см выше).

Технические данные центрифуги

Тип ротора РК4×500:

Количество пробирок – 4

Вместимость пробирки – 500 см³ (или 250 см³)

Частота вращения ротора – 3000 ± 300 об/мин

Расчетная величина фактора разделения (при 3000 об/мин) – 2250

Время непрерывной работы – 60 мин.

Тип ротора РУ8×90:

Соответственно 8; 90 см³; 6000 ± 600 об/мин; 5500; 60 мин.

Тип ротора РУ6×10:

Соответственно 6; 10 см³; 18 000 (+1800; -2700) об/мин; 30 200; 30 мин.

Перерыв после непрерывной работы при всех типах роторов – 15 мин.

Максимальная плотность центрифугируемой жидкости в полимерных пробирках не более 2 г/см³, в стеклянных – не более 1,5 г/см³

Центрифуга лабораторная медицинская РС-6

Подготовка к работе:

1. Открыть крышку рабочей камеры и установить ротор на вал привода таким образом, чтобы выступающие части штифта вала вошли в пазы ротора. Ротор установить до упора в осевом направлении.

2. Заполнить пробирки (или стаканы) центрифугатом и разместить их в роторе. При неполной загрузке ротора каждую пару емкостей размещать только в диаметрально противоположных гнездах ротора. Для угловых роторов пробирки заполнять на 75% максимального объема.

3. Закрыть ротор крышкой.

4. Закрыть крышку рабочей камеры.

5. Установить ручку задатчика частоты вращения в положение ОТКЛЮЧЕНО (сектор 0-60 на шкале ручки).

Порядок работы

При работе центрифуги без часов:

1. Подать напряжение питания на центрифугу нажатием на кнопку СЕТЬ.

2. Нажать кнопку ТОРМОЗ, если по окончании центрифугирования необходимо быстро остановить ротор центрифуги (режим динамического торможения)

3. Ручку задатчика температуры установить на требуемый диапазон температуры.

4. Включить холодильную систему нажатием на кнопку ХОЛОД.

5. Включить электропривод центрифуги нажатием на кнопку ПУСК.

6. После достижения в рабочей камере заданной температуры (контроль осуществляется по индикатору температуры) ручку задатчика частоты вращения установить на требуемое значение частоты вращения. Через некоторое время, зависящее от типа ротора и задаваемой частоты вращения, привод центрифуги автоматически выведет ротор на заданную частоту вращения (контроль осуществляется по индикатору частоты вращения).

7. После окончания центрифугирования отключить привод центрифуги и холодильную систему нажатием на кнопки СТОП и ХОЛОД соответственно.

Если в течение рабочего дня требуется провести еще один или несколько циклов центрифугирования, рекомендуется не отключать холодильную систему после каждого цикла, а отключить ее только после окончания всей работы. При этом в процессе перезагрузки ротора пробирками (или стаканами) не рекомендуется на длительное время оставлять рабочую камеру с открытой крышкой.

8. После полной остановки ротора открыть крышку рабочей камеры, снять крышку ротора (углового) и извлечь пробирки (или стаканы) с центрифугатом.

9. После окончания всей работы отключить подаваемое на центрифугу напряжение нажатием на кнопку СЕТЬ и с помощью автоматического выключателя, через который центрифуга подключена к сети (или с помощью рубильника, выдергивания вилки из розетки и т. д.).

При работе центрифуги с часами:

1. Выполнить все операции с п.1 по п. 6 (см выше).

2. Ручку механизма отсчета времени, поворотом **против** часовой стрелки, перевести из положения ОТКЛЮЧЕНО (сектор 0-60 на шкале ручки) в положение, соответствующее выбранному интервалу времени.

3. По истечении заданного интервала времени механизм отсчета автоматически отключит привод центрифуги, и он начнет тормозиться в соответствии с выбранным режимом торможения (инерционным или динамическим).

4. Выполнить последовательно п. 7-8 (см. выше).

Центрифуга РС-6 может работать с механизмом увеличения частоты вращения ротора, который утраивает число оборотов привода и позволяет получить максимальное число оборотов ротора типа РУ6×10 до 18 000 об/мин (максимальное число оборотов электропривода – 6 000 об/мин). Максимальное время непрерывной работы центрифуги 180 мин. Время перерыва после 180 мин непрерывной работы не менее 60 мин.

Лабораторный рН-метр-милливольтметр рН-673

Отечественные рН-метры, используемые в лабораториях (рН-121, рН-340, рН-673 и др.), имеют много общего в конструкции и порядке проведения измерений рН и ЭДС. Поэтому описание подготовки конкретного прибора (рН-673) и порядка измерения рН на нем с небольшими изменениями может быть распространено на другие рН-метры.

Подготовка прибора к измерениям:

1. Выбрать тип измерительного электрода. Для измерения при температуре раствора в диапазоне 0-40° используют стеклянный низкотемпературный электрод ЭСЛ-43-07, в диапазоне 20-100° – высокотемпературный электрод ЭСЛ-63-07.

2. Подготовить измерительный электрод к работе. Наиболее часто используются низкотемпературные электроды. Если низкотемпературный электрод не был в употреблении, осуществляют его стабилизацию – вымачивание в воде при комнатной температуре в течение 2-3 дней.

3. Подготовить для измерения электрод сравнения (вспомогательный электрод). В качестве такового часто используют хлорсеребряный электрод ЭВЛ-1М. Если электрод не был в употреблении, то необходимо извлечь из него резиновую пробку, удалить транспортировочный раствор, тщательно промыть дистиллированной водой, залить внутрь электрода насыщенный при комнатной температуре раствор хлористого калия. В процессе измерения отверстие для заливки оставить открытым. Внутри электрода сравнения должно всегда находиться небольшое количество кристаллов хлористого калия.

4. Приготовить буферные растворы для настройки прибора. Реактивы «для рН-метрии» выпускаются в виде фиксаналов, рассчитанных на приготовление 1000 мл буферного раствора каждого наименования. Для приготовления буферных растворов применяется дистиллированная вода, предварительно прокипяченная в течение 30-40 минут для удаления растворенной углекислоты.

5. Вставить в отверстие держателя измерительный и вспомогательный электроды, а также ртутный термометр.

6. Подключить оба электрода к рН-метру, а переключатель рода термокомпенсации установить в положение РУЧНОЙ (на задней стороне прибора).

7. Отрегулировать положение столика и держателя. Столик должен быть установлен на такой высоте, чтобы электроды при измерении были погружены в раствор на глубину около 30 мм.

8. Поместить электроды в соответствующий буферный раствор с температурой 20°.
9. Установить на задней стенке прибора переключку в розетку ПОТЕНЦИОМЕТР (если она еще не установлена).
10. Проверить механический нуль показывающего прибора. При необходимости корректором нуля показывающего прибора с помощью отвертки установить стрелку на начальную отметку (нуль).
11. Включить прибор в сеть и дать ему прогреться в течение не менее 25 минут. (Напоминаем: прибор должен быть заземлен.)
12. Ручку потенциометра температурной компенсации (на лицевой панели прибора) установить против температуры 20°.
13. Ручкой БУФЕР установить стрелку показывающего прибора на отметку, соответствующую значению рН буферного раствора при данной температуре (предварительно установив соответствующий диапазон рН на лицевой панели прибора). Значения рН буферных растворов при разных температурах приводятся в Приложении к техническому описанию рН-метра (см. ниже).
14. Проверить показания прибора в остальных трех стандартных буферных растворах. Ошибки измерения в этих случаях не должны превышать 0,05 рН.
15. Ручку потенциометра температурной компенсации установить против температуры 5°.
16. Поместить электроды в соответствующий буферный раствор с температурой 5°.
17. Ручкой рН-КООРДИНАТА установить стрелку показывающего прибора на отметку, соответствующую значению рН буферного раствора при данной температуре (предварительно установив соответствующий диапазон рН на лицевой панели прибора).
18. Проверить показания прибора в остальных трех стандартных буферных растворах.

Измерение рН:

1. После настройки рН-метра по буферным растворам можно производить измерение рН опытного раствора.
2. Перед погружением электродов в раствор необходимо тщательно промыть их дистиллированной водой. Остатки воды с электродов удалить фильтровальной бумагой.
3. Погрузить электроды в испытуемый раствор и измерить в соответствующем диапазоне шкалы значение рН. Отсчет рН по шкале прибора следует производить после того, как показания примут установив-

шее значение. Обычно время установления показания не превышает 3 мин.

4. В первые несколько дней эксплуатации прибора или нового стеклянного электрода проверку прибора по буферам следует производить каждый день, при последующей работе – значительно реже (до 1 раза в 3 дня).

5. По окончании работ с прибором электроды для измерения pH должны оставаться погруженными в воду или 0,1 н раствор соляной кислоты.

6. В случае образования пленок на электродах они могут быть удалены промывкой электродов органическими растворителями, кислотами или щелочами. После такой промывки электроды должны быть особенно тщательно промыты водой, а показания прибора – проверены на буферных растворах.

Значения pH буферных растворов
при температурах 5 и 20° (для настройки прибора):

1. 0,05 М раствор тетраоксалата калия: 5°-1,67; 20°-1,68.
2. Насыщенный при 25° раствор калия виннокислого кислого: 20°-3,56 (используется для настройки с высокотемпературным электродом).
3. 0,05 М раствор калия фталевокислого кислого: 5°-4,01; 20°-4,00.
4. 0,025 М раствор калия фосфорнокислого однозамещенного и 0,025 М раствор натрия фосфорнокислого двузамещенного: 5°-6,95; 20°-6,88.
5. 0,01 М раствор натрия тетраборнокислого: 5°-9,46; 20°-9,22.
6. Буферные растворы желателно хранить в холодильнике в закрытых полиэтиленовых сосудах.

Колориметр-нефелометр ФЭК-56М

Подготовка прибора к измерениям заключается в установке осветителя, выборе светофильтра и кюветы.

1. Установка осветителя. Чтобы правый и левый пучки света полностью проходили через кюветы и попадали на фотоэлементы, необходимо произвести установку осветителя (лампа накаливания РН8-35 или ртутно-кварцевая лампа ДРК-120), для чего открывают крышку кюветного отделения и в трубки измерительных диафрагм вставляют пластмассовые пробки, входящие в комплект прибора. С помощью юстировочных винтов передвигают источник света до полно-

го освещения обоих белых кружков на пробках. После этого пробки извлекают из трубок измерительных диафрагм.

2. Выбор светофильтра. В прибор ФЭК-56М вмонтированы 9 светофильтров со следующими характеристиками:

№ на рукоятке прибора	Длина волны, соответствующая максимуму пропускания, нм	Полуширина пропускания, нм
1	315±5	35±15
2	364±5	25±10
3	400±5	45±10
4	440±5	40±15
5	490±10	35±10
6	540±10	25±10
7	582±10	30±10
8	600±10	
9	630±10	-

Полуширина пропускания светофильтра численно равна диапазону длин волн, в котором пропускание $T \geq 0,5T_{\max}$. Так, для светофильтра №4 границы этого диапазона 420 и 460 нм.

Если значение длины волны, при которой должно производиться измерение, неизвестно, то необходимо в зависимости от цвета раствора предварительно выбрать светофильтр, цвет которого является дополнительным по отношению к раствору (см. раздел 3, табл.3). После этого измеряют оптическую плотность для выбранного светофильтра и двух других, расположенных от него с разных сторон. Окончательно устанавливают тот из них, при котором оптическая плотность окажется максимальной.

3. Выбор кюветы. При определении концентрации окрашенного раствора по величине его оптической плотности минимальная ошибка будет при значении $D = 0,4$. Чем больше отклонение от 0,4, тем больше погрешность в измерении концентрации раствора. В комплект прибора входят кюветы с рабочей длиной 1; 3; 5; 10; 20; 30; 50 мм соответственно с ориентировочным объемом 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 20 мл. Из них необходимо вначале визуально, а затем путем замера на приборе выбрать такую кювету, для которой оптическая плотность лежит в диапазо-

не 0,3-0,5. С этой кюветой производят все измерения, стремясь не выходить за пределы оптической плотности 0,2-0,6. В противном случае необходимо перейти на работу с другой кюветой, для которой строят новый калибровочный график.

4. Выставить с помощью отвертки механический нуль регистрирующего прибора (если стрелка не стоит на нуле). Эта операция производится до включения прибора в сеть или не ранее одного часа после его выключения.

Измерение оптической плотности и коэффициента пропускания:

1. Подключить с помощью вилки заземленный прибор к электрической сети.

2. Переключить тумблер на блоке питания в положение, соответствующее типу установленного осветителя.

3. Включить тумблер сетевого напряжения на блоке питания и дать электрической схеме прогреться в течение 30 мин при закрытой шторке прибора.

4. С помощью рукоятки, расположенной на левой стенке прибора, установить стрелку микроамперметра на нуль (установка «электрического нуля»).

5. Рукоятку чувствительности прибора перевести в среднее положение.

6. Установить нужный светофильтр (рукоятка слева).

7. Заполнить до метки две кюветы растворителем и одну – окрашенным раствором.

Рабочие поверхности кювет должны перед каждым измерением тщательно протираться спиртоэфирной смесью. Наличие загрязнений или капель раствора на рабочих поверхностях кюветы приводит к получению неверных результатов измерения. При работе с кюветами нельзя касаться пальцами рабочих участков поверхностей (ниже уровня жидкости в них).

8. В кюветодержатель левого пучка света поместить кювету с растворителем (или дистиллированной водой, если растворитель не окрашен).

9. В кюветодержатель правого пучка света установить кюветы с растворителем и окрашенным раствором.

10. Открыть шторку прибора.

11. В правый лучок света с помощью рукоятки поместить кювету с исследуемым раствором.

12. Правый барабан установить на отсчет «100» по шкале коэффициента пропускания.

13. Вращением левого измерительного барабана установить стрелку микроамперметра на нуль. Если это сделать не удастся, то в правый световой пучок устанавливают поглотитель (входит в комплект прибора), который позволяет с помощью левого барабана перевести стрелку микроамперметра на нуль.

14. Поворотом рукоятки заменить в правом пучке кювету с раствором на кювету с растворителем, при этом происходит смещение стрелки амперметра, установленной на нуль.

15. Вращением правого измерительного барабана добиться первоначального нулевого положения стрелки и отсчитать по шкале правого барабана величину оптической плотности (или коэффициента пропускания) раствора. Измерение производится несколько раз и берется среднее арифметическое значение. При измерениях барабан измерительной диафрагмы рекомендуется подводить к индексу с одной стороны для исключения погрешности, вызванной люфтом в механизме.

16. После завершения всех измерений необходимо отключить прибор от сети, тщательно вымыть кюветы и осушить их фильтровальной бумагой.

Как правило, при измерениях пользуются лампой накаливания РН8-35. С ртутно-кварцевой лампой ДРК-120 работают при измерении в ультрафиолетовой области спектра. С этой же лампой можно измерять и в видимой области спектра, если имеется необходимость пользоваться очень узкими линиями спектра.

Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2

Подготовка прибора к измерениям:

1. Установить с помощью отвертки механический нуль регистрирующего прибора (если стрелка не стоит на нулевой отметке).

2. Выбрать нужный светофильтр и кювету, руководствуясь рекомендациями п. 2 по колориметру-нефелометру ФЭК-56М (см. выше).

Характеристики светофильтров:

Маркировка светофильтра	Длина волны, соответствующая максимуму пропускания, нм	Полуширина пропускания, нм
315	315±5	35±15
364	364±5	25±10
400	400±5	45±10
440	440±10	40±15
490	490±10	35±10
540	540±10	25±10
590	590±10	25±10
670	670±5	20±5
750	750±5	20±5
870*	870±5	25±5
980*	980±5	25±5

*) Поставляются по требованию заказчика.

3. Выбрать кювету нужной длины, руководствуясь рекомендациями п. 3 по колориметру-нефелометру ФЭК-56М (см. выше). По требованию заказчика изготовитель (Загорский оптико-механический завод) может поставить набор микрокювет, микропробирок и держателей. Микрокюветы имеют рабочую длину 10, 5, 3, 2 мм, которым соответствуют объемы 0,40; 0,20; 0,12 и 0,08 мл.

4. Колориметр включить тумблером СЕТЬ (на задней стенке) за 15 мин до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто (при этом шторка перед фотоприемниками автоматически перекрывает световой пучок).

5. Ввести необходимый по роду измерений светофильтр.

6. Установить минимальную чувствительность колориметра. Для этого ручку ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ установить в положение «1», ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ 100 ГРУБО – в крайнее левое положение.

7. Перед измерениями и при переключении фотоприемников проверить установку стрелки регистрирующего прибора на нуль по шкале Т при открытом кюветном отделении. При смещении стрелки от нулевого положения ее подводят к нулю с помощью потенциометра НУЛЬ, выведенного под шлиц.

Фотоприемники работают в разных областях спектра:

фотоэлемент Ф-26 – в области спектра 315-540 нм (1-6 светофильтры);

фотодиод ФД-24К – в области спектра 590-980 нм.

Переключение фотоприемников осуществляется ручкой ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ.

При измерении фотоэлементом Ф-26 со светофильтрами 315-540 нм, отмеченными на лицевой панели колориметра черным цветом, ручку ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ устанавливать в одно из положений «1», «2», «3», отмеченных на лицевой панели также черным цветом (чувствительность растет от положения «1» к положению «3»).

При измерении фотодиодом ФД-24К со светофильтрами 590-980 нм, отмеченными красным цветом, ручку ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ устанавливать в одно из положений «1», «2», «3», отмеченных также красным цветом.

Измерение оптической плотности и коэффициента пропускания:

1. В световой пучок поместить кювету с растворителем или контрольным раствором, по отношению к которому производятся измерения.

2. Закрыть крышку кюветного отделения (при этом автоматически открывается шторка перед фотоприемниками).

3. Ручками ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ, УСТАНОВКА 100 ГРУБО и ТОЧНО установить стрелку на деление 100 по шкале индикатора. Ручка ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ может находиться в одном из трех положений: «1», «2» или «3».

4. Поворотом ручки (на лицевой панели снизу в центре) кювету с растворителем (или контрольным раствором) заменить кюветой с исследуемым раствором.

5. Снять отсчет по шкале оптической плотности (D) или шкале коэффициентов пропускания (T, в процентах). Измерение проводить 3-5 раз и окончательное значение измеренной величины определить как среднее арифметическое из полученных данных.

6. После завершения работ на колориметре до его выключения ручку ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ установить в положение «1», обозначенное красным цветом (включен ФД-24К), а ручку УСТАНОВКА 100 ГРУБО – в крайнее левое положение и только после этого выключить тумблер СЕТЬ колориметра.

Для справки: в качестве источника света в колориметре используется лампа КГМН 6,3-15.

Фотометр фотоэлектрический КФК-3

Подготовка фотометра к работе:

1. Присоединить фотометр к сети и включить тумблер СЕТЬ (на боковой стенке справа).

2. Нажать клавишу ПУСК – на цифровом табло появляется символ «Г» (градуировка фотометра), соответствующее ему значение и значение длины волны.

3. Выдержать прибор во включенном состоянии 30 мин с открытой крышкой кюветного отделения.

4. Нажатием клавиши НУЛЬ произвести измерение и учет нулевого отсчета. На табло должно высветиться значение не менее 0,005 и не более 0,200. Если высветившееся значение не укладывается в эти пределы, нужного значения можно добиться с помощью резистора УСТ. 0 (на боковой стенке справа). Установка нуля производится при нажатии клавиши НУЛЬ.

Измерение оптической плотности и коэффициента пропускания:

1. Установить в кюветное отделение кюветы с растворителем или контрольным раствором, по отношению к которому производится измерение, и исследуемым раствором. Кювету с растворителем (или контрольным раствором) установить в дальнее гнездо кюветодержателя, а кювету с исследуемым раствором – в ближнее гнездо кюветодержателя.

2. В световой пучок установить кювету с растворителем (рукоятку перемещают влево до упора). Если измерение проводится относительно воздуха, то в этом случае дальнее гнездо кюветодержателя должно быть пустым.

3. Установить нужную длину волны (ручка на лицевой панели слева). Длина волны высвечивается на верхнем цифровом табло. Установку длины волны необходимо выполнять подводкой со стороны коротких волн к более длинным. Если при установке значение длины волны перешло требуемое значение, необходимо процедуру повторить, вернувшись на 20-30 нм к более коротким волнам.

4. При закрытой крышке кюветного отделения нажать клавишу «Г». На нижнем цифровом табло высветится символ «Г». Нажать клавишу «П» (измерение коэффициента пропускания) или «Е» (измерение оптической плотности). Слева от мигающей запятой высветится соответственно символ «П» или «Е», а справа от мигающей запятой – соответственно значения « $100,0 \pm 0,2$ » или « $0,000 \pm 0,002$ », означающие, что начальный отсчет пропускания (100,0%) или оптической плотности (0,000%) установился на фотометре правильно.

Если отсчеты « $100,0 \pm 0,2$ » или « $0,000 \pm 0,002$ » установились с большим отклонением, нужно нажать клавиши «Г», «П» или «Е» повторно, соблюдая паузу 3-5 с.

5. Открыть крышку кюветного отделения и нажать клавишу НУЛЬ,

закрывать крышку, нажать клавишу «П» или «Е».

6. Перевести рукоятку перемещения кювет вправо до упора, при этом в световой пучок будет введена кювета с исследуемым раствором. Отсчет на световом табло справа от мигающей запятой соответствует коэффициенту пропускания или оптической плотности исследуемого раствора.

7. Повторить операции 1-6 три раза, вычислить среднее арифметическое значение измеряемой величины.

Наличие микропроцессора, встроенного в фотометр КФК-3, позволяет с помощью клавиш «С» (измерение концентрации) и «F» (ввод коэффициента факторизации) получать на цифровом табло сразу значение концентрации исследуемого вещества в растворе (если калибровочный график $E = f(c)$ представляет собой прямую линию). Кроме того, задавая определенный промежуток времени, с помощью клавиши «А» можно осуществлять измерение скорости изменения оптической плотности раствора в процессе протекания реакции. Для этого необходимо выполнить пп. 1-6, затем нажать клавишу «А», после чего на цифровом табло высветится символ «А». Ввести в память время t , по истечении которого необходимо определить скорость изменения оптической плотности $A = (D_2 - D_1)/t$, где $D_2 - D_1$ разность оптических плотностей за временной интервал t в минутах. Время t задается в виде целых чисел от 1 до 9 минут. Через время t на цифровом табло высветится значение A . Если требуется продолжить измерение скорости A за такой же следующий промежуток времени t , необходимо вновь нажать клавишу «А».

Для справки: в качестве источника света используется лампа галогенная КГМ 12-10, в качестве приемника излучения фотодиод ФД-2885.

Спектрофотометр СФ-26

Предназначен для измерения коэффициента пропускания и оптической плотности в спектральном диапазоне от 186 до 1100 нм.

Подготовка к измерению:

1. Установить фотоэлемент и источник излучения в рабочие положения, соответствующие выбранному спектральному диапазону измерений.

В спектрофотометре используются два фотоэлемента и два источника излучения сплошного спектра.

Сурьмяно-цезиевый фотоэлемент с окном из кварцевого стекла применяется для измерений в области спектра от 186 до 650 нм, кислородно-цезиевый фотоэлемент – для измерений в области спект-

ра от 600 до 1100 нм. Длина волны, при которой следует переходить от измерений с одним фотоэлементом к измерению с другим фотоэлементом, указывается в паспорте спектрофотометра (655 нм).

Дейтериевая лампа предназначена для работы в области спектра от 186 до 350 нм, лампа накаливания – для работы в области спектра от 340 до 1100 нм. Смена источников излучения производится в диапазоне от 340 до 350 нм путем переключения зеркального конденсора специальной рукояткой (сзади сверху).

2. Закрывать фотоэлемент, поставив рукоятку шторы в положение ЗАКР., и рукояткой, расположенной справа от измерительного прибора, установить ширину щели примерно 0,1 мм.

3. Включить тумблер СЕТЬ, после чего должны загореться сигнальная лампа СЕТЬ и сигнальная лампа D или сигнальная лампа H в соответствии с выбранным источником. Стабильная работа спектрофотометра обеспечивается через 1 час после его включения.

4. Для включения после лампы накаливания дейтериевой лампы необходимо переключить конденсор; после минутного прогрева лампа автоматически загорается, одновременно загорается и соответствующая индикаторная лампа на передней панели.

5. Установить требуемую длину волны, вращая рукоятку (слева от измерительного прибора) в сторону увеличения длин волн. Если при этом шкала повернется на большую величину, то вернуть ее назад на 3-5 нм и снова подвести к требуемому делению.

6. Поставить рукоятку чувствительности (справа сверху на лицевой панели) в положение «1» (рабочее положение). Если поток излучения недостаточен и измеряемый и контрольный образцы значительно поглощают излучение, ручку чувствительности необходимо перевести в положение «2», «3» или «4».

Измерение коэффициента пропускания и оптической плотности:

1. Установить на пути потока излучения контрольный образец, перемещая каретку с держателем образцов. При отсутствии образцов сравнения (например, кюветы с растворителем) величина потока, проходящего через свободное окно держателя фильтров, принимается за 100% пропускания.

2. Установить рукоятку ОТСЧЕТ в положение «1».

3. Установить стрелку измерительного прибора на нуль рукояткой НУЛЬ.

4. Открыть фотоэлемент, поставив рукоятку шторы в положение ОТКР.

5. Установить стрелку измерительного прибора на деление «100%», вращая рукоятку механизма изменения ширины щели.

6. Перемещая каретку, установить в рабочее положение измеряемый образец и снять отсчет по шкале пропускания T или оптической плотности D .

7. Вывести из потока излучения измеряемый образец и ввести контрольный образец, при этом стрелка измерительного прибора должна вернуться к делению «100%».

8. После завершения работы на спектрофотометре выключить его тумблером СЕТЬ.

Для справки: лампа дейтериевая ДДС-30; лампа накаливания ОП-33-0,3; лампа ртутная ДРГС-12 (для проверки градуировки); сурьмяно-цезиевый фотоэлемент Ф17; кислородно-цезиевый фотоэлемент Ф23; кювета кварцевая К10 (рабочая длина 10 мм).

Настройка температуры термостата с помощью контактного термометра

Устройство для поддержания температуры в термостатах на постоянном заданном уровне представляет собой систему регулирования с отрицательной обратной связью, важным элементом которой является контактный термометр, управляющий работой электроннагревателя. Контактный термометр – это ртутный термометр, имеющий выводные контакты для соединения с внешней цепью. Один из контактов внутри термометра соприкасается со ртутью, второй – передвигается при помощи магнита и может быть установлен на любое деление шкалы. Установка контактного термометра на нужную температуру производится вращением головки магнита до тех пор, пока положение указателя на верхней шкале не будет соответствовать требуемой температуре. При подогреве, когда температура достигнет заданного значения, ртуть войдет в соприкосновение с металлическим контактом, и цепь контактного термометра замкнется, обеспечив тем самым поступление тока на контактное реле, которое отключит электрический нагреватель. При понижении температуры в термостате за счет его остывания процесс повторится в обратном порядке: цепь контактного термометра разомкнется, контактное реле обесточится, электрический нагреватель включится, о чем будет свидетельствовать загорание сигнальной лампы.

Верхняя шкала контактного термометра груба, поэтому точную настройку термостата осуществляют с помощью точного ртутного термометра, рабочая часть которого погружена в термостат. Для этого необходимо на контактном термометре установить температуру, несколько

превышающую требуемую, и в процессе нагревания следить за показаниями точного ртутного термометра. В момент достижения заданной температуры на этом термометре необходимо путем поворота головки магнита разомкнуть цепь, о чем свидетельствует выключение сигнальной лампы. Затем, наблюдая за показаниями точного термометра, если необходимо, с помощью головки магнита можно еще более точно откорректировать работу контактного термометра. После этого следует зафиксировать винтом положение головки магнита (или вообще временно снять ее с контактного термометра), чтобы случайно не нарушить настройку термостата.

В некоторых термостатах имеется дополнительный, не регулируемый автоматически электрический нагреватель. Он включается вручную, чтобы быстрее достичь заданной температуры. При подходе к этому значению его необходимо отключить, оставив только нагреватель, включенный в систему автоматической регуляции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

Раздел первый

1. Асатиани В.С. Методы биохимических исследований. М.: Медгиз, 1956. 472 с.
2. Любина А.Я., Неменова Ю.М., Полеев М.Э., Чернобельская Г.М. Руководство к практическим занятиям по технике лабораторных работ. М.: Медицина, 1983. 208 с.
3. Современные методы биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1968. 372 с.
4. Методы практической биохимии / Под ред. Б. Уильямса и К. Уилсона. М.: Мир, 1978. 268 с.
5. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 286 с.
6. Гарбарец Б.А. Биохимическая лабораторная техника. Киев: Здоров'я, 1983. 144 с.
7. Фролов Ю.П. Гомогенизатор биологических тканей с охлаждающей рубашкой. Деп. в ВИНТИ 12.01.93, №53-В93. 4 с.

Раздел второй

1. Филиппович Ю.В., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. 318 с.
2. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Колос, 1972. 456 с.
3. Асатиани В.С. Методы биохимических исследований. М.: Медгиз, 1956. 472 с.
4. Практикум по биохимии / Под ред. Н.П. Мешковой и С.Е. Северина. М.: МГУ, 1979. 430 с.
5. Фролов Ю.П. Форма для отливки чашек Конвея из парафина // Сравнительная биохимия обмена веществ у животных. Куйбышев: Куйб. госуниверситет, 1980. С.109-110.
6. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа. М.: Наука, 1969. 740 с.

Раздел третий

1. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
2. Методы практической биохимии / Под ред. Б. Уильямса и К. Уилсона. М.: Мир, 1978. 268 с.
3. Перри С., Амос Р., Брюер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Мир, 1974. 260 с.
4. Барковский В.Ф., Горелик С.М., Городенцева Т.Б. Физико-химические методы анализа. М.: Высшая школа, 1972. 344 с.

5. Современное состояние жидкостной хроматографии / Под ред. Дж. Киркланда. М.: Мир, 1974. 325 с.
6. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров / Под ред. Г.В. Самсонова. М.-Л., 1966. 342 с.
7. Козаренко Т.Д. Ионообменная хроматография аминокислот. Новосибирск: Наука, 1975. 134 с.
8. Тюкавкина Н.А., Литвиненко В.И., Шостаковский М.Ф. Хроматография на полиамидных сорбентах в органической химии. Новосибирск: Наука, 1973. 176 с.
9. Цвет М.С. Хроматографический адсорбционный анализ: Избранные главы. М.: Изд-во АН СССР, 1946.
10. Успехи хроматографии. М.: Наука, 1972.
11. Ольшанова К.М., Копылова В.Д., Морозова Н.М. Осадочная хроматография. М.: Изд-во АН СССР, 1963.
12. Хроматография на бумаге / Под ред. И.М. Хайса и К. Мацека. М.: Изд-во иностр. лит., 1962.
13. Фролов Ю.П. Коллектор фракций. АС №1529069, приоритет изобретения 30.11.87 (зарегистрировано 15.08.89).
14. Новицкая Г.В. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии фосфолипидов. М.: Наука, 1972. 62 с.
15. Ларский Э.Г. Методы зонального электрофореза. М.: Медицина, 1971. 112 с.
16. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982. 446 с.
17. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и центрифугирование. М.: Наука, 1981. 286 с.
18. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. М.: Наука, 1983. 304 с.
19. Электрофоретические методы анализа белков / Отв. ред. Р.К. Сяляев, П.Д. Решетов. Новосибирск: Наука, 1981. 120 с.
20. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу / Ред. Н. Аксельсен и др. М.: Мир, 1977. 216 с.
21. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М.: Мир, 1980. 582 с.
22. Уильямс В., Уильямс Х. Физическая химия для биологов. М.: Мир, 1976. 600 с.
23. Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971.
24. Иванов И.Д., Рахляева Е.Е. Полярография структуры и функции биополимеров. М.: Наука, 1968. 334 с.
25. Гороховская В.И., Гороховский В.М. Практикум по осциллографической полярографии. М.: Высшая школа, 1973. 112 с.
26. Осборн Н.Н. Микрохимический анализ нервной ткани. М.: Медицина, 1978. 262 с.
27. Дзвени Т., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды и белки. М.: Мир, 1976. 364 с.

28. Общая химия / Под ред. Е.М. Соколовской и Л.С. Гузев. М.: МГУ, 1989. 640 с.
29. Фролов Ю.П. Влияние лазерного излучения на ИК-спектр крови // Биологическое действие лазерного облучения. Куйбышев: КГУ, 1984. С. 132-136.
30. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии / Паперно Т.Я., Поздняков В.П. и др. М.: Просвещение, 1977. 176 с.
31. Арзамасцев А.П., Яскина Д.С. Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ. Вып. 1: Стероиды. М.: Медицина, 1975. 152 с.
32. Введение в количественную цитохимию. М.: Мир, 1969. 440 с.
33. Ашмарин И.П., Мюльберг А.А. и др. Химия белка. Часть 1: Общая химия белка. Л.: ЛГУ, 1968. 196 с.
34. Шишловский А.А. Прикладная физическая оптика. М.: Физматгиз, 1961. 822 с.
35. Фролов Ю.П. Устройство для определения величины электрофоретической подвижности веществ при диск-электрофорезе // Лабораторное дело. 1977. №4. С. 245-246.

Раздел четвертый

1. Радунская И.Л. Радиоспектроскопия. М.-Л.: Госэнергоиздат, 1958. 40 с.
2. Жарский И.М., Новиков Г.И. Физические методы исследования в неорганической химии. М.: Высшая школа, 1988. 272 с.
3. Кустанович И.М. Спектральный анализ. М.: Высшая школа, 1962. 400 с.
4. Шишловский А.А. Прикладная физическая оптика. М.: Физматгиз, 1961. 822 с.
5. Физические методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Под ред. Ю.С. Лазуркина. М.: Наука, 1967. 323 с.
6. Фриш С.Э., Тиморева А.В. Курс общей физики. Т.3: Оптика. Атомная физика. М.: Гос. изд-во технико-теорет. лит., 1952. 800 с.
7. Методы практической биохимии / Под ред. Б. Уильямса и К. Уилсона. М.: Мир, 1978. 268 с.
8. Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979. 151 с.
9. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир, 1975. 324 с.
10. Лейзеганг З. Электронная микроскопия. М.: Изд-во иностр. лит., 1960. 340 с.
11. Рукман Г.И., Клименко И.С. Электронная микроскопия. М.: Знание, 1968. 32 с.
12. Гайер Г. Электронная гистохимия. М.: Мир, 1974. 488 с.

13. Гольдин Л.С. Основы гистологической техники электронной микроскопии. М.: Медгиз, 1963. 258 с.
14. Саркисов Д.С., Пальцын А.А., Втюрин Б.В. Приспособительная перестройка биоритмов. М.: Медицина, 1975. 182 с.
15. Саркисов Д.С., Пальцын А.А., Втюрин Б.В. Электронно-микроскопическая радиоавтография клетки. М.: Медицина, 1980. 264 с.
16. Полякова А.А., Хмельницкий Р.А. Масс-спектрометрия в органической химии. Л.: Химия, 1972.
17. Практикум по физико-химическим методам в биологии / Под ред. Ф.Ф. Литвина. М.: МГУ, 1981. 240 с.
18. Фриш С.Э., Тиморева А.В. Курс общей физики. Т.2: Электрические и электромагнитные явления. М.: Гос. Изд-во технико-теорет. лит., 1953. 504 с.
19. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. М.: Мир, 1980. 582 с.
20. Ашмарин И.П., Мюльберг А.А. и др. Химия белка. Часть 1: Общая химия белка. Л.: ЛГУ, 1968. 196 с.
21. Рогинский С.З., Шноль С.Э. Изотопы в биохимии. М.: АН СССР, 1963. 380 с.
22. Фролов Ю.П. Неконтактное действие бензоидных соединений на биологические системы. Самара: Изд-во "Самарский университет", 2000. 84 с.
23. Фролов Ю.П. Неконтактное действие соединений с бензолными кольцами и гетероциклами на биосистемы // Биофизика. 2001. Т. 46. Вып. 5. С. 946-950.
24. Фролов Ю.П. Механизмы генерирования и биологического действия электромагнитного излучения ароматических соединений // Электромагнитные поля и здоровье человека. Фундаментальные и прикладные исследования: Матер. третьей междунар. конф. М.-СПб., 2002. С. 45-46.

Раздел пятый

1. Дубинина И.Г. Использование метода полимеразной цепной реакции в клинико-диагностических лабораториях // Лаборатория. 1996. № 4. С.3-6.
2. Клиническая лабораторная аналитика. Том 2: Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: "Лабинформ" – РАМЛД, 1999. 352 с.
3. Бочкарев Е.Г., Денисова Т.С., Генерозов Э.В. и др. Генодиагностика во фтизиатрии. М., 2000. 65 с.
4. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.:Мир, 1979. 518 с.
5. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. 472 с.
6. Иммунология / Под ред. У. Пола. Т.3. М.: Мир, 1989. 360 с.
7. Лабораторные методы исследования в неинфекционной иммунологии / Под ред. О.Е. Вязова. М.: Медицина, 1967. 366 с.
8. Электрофоретические методы анализа белков. Новосибирск: Наука, 1981. 118 с.

Раздел шестой

1. Федоров В.Д., Гильманов Т.Г. Экология. М.: МГУ, 1980. 464 с.
2. Фролов Ю.П. Введение в математическое моделирование биологических процессов. Часть 1: Молекулы и клетки. Самара: Изд-во "Самарский университет", 1992. 426 с.
3. Дородницын А.А. Математика и описательные науки // Число и мысль. Вып.5. М.: Знание, 1982. С.6-15.
4. Петушкова Е.В. Введение в кинетику ферментативных реакций. М.: МГУ, 1972.
5. Стьюпер Э., Брюггер У., Джурс П. Машинный анализ связи химической структуры и биологической активности. М.: Мир, 1982. 235 с.
6. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976. 957 с.
7. Демьянов Ю.В., Литвин Ф.Ф. Применение математических методов и ЭВМ в биологии. М.: МГУ, 1981. 135 с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990 (издание четвертое). 352 с.
9. Фролов Ю.П. Введение в математическое моделирование биологических процессов. Часть 2. Организмы и популяции. Самара: Изд-во "Самарский университет", 1994. 317 с.
10. Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование. Самара: Изд-во "Самарский университет", 1996 (издание третье). 265 с.

Приложения

1. Кузин А.М. Проблемы радиобиологии. М.: Знание, 1970. 96 с.
2. Нормы радиационной безопасности НРБ-76 и Основные санитарные правила работы с радиоактивными веществами и другими источниками ионизирующих излучений ОСП-72/80. М.: Энергоиздат, 1981. 95 с.
3. Рачинский В.В., Лурье А.А. Практикум по применению изотопов и излучений в сельском хозяйстве. Вып. 4: Техника радиационной безопасности. М.: ТСХА, 1969. 79 с.
4. Рачинский В.В. Курс основ атомной техники в сельском хозяйстве. М.: Атомиздат, 1974. 392 с.
5. Фурман А.О. Практикум по применению изотопов и излучений в сельском хозяйстве. Вып. 1: Радиометрия (часть первая). М., 1967. 103 с.
6. Фурман А.О. Практикум по применению изотопов и излучений в сельском хозяйстве. Вып. 2: Радиометрия (часть вторая). М., 1973. 121 с.
7. Фурман А.О. Практикум по применению изотопов и излучений в сельском хозяйстве. Вып. 3: Радиометрия (часть третья). М., 1969. 96 с.
8. Описания и инструкции по эксплуатации конкретных лабораторных приборов и оборудования.

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ. Взятие проб и подготовка их к анализу	
Глава первая. Взятие биологических проб	14
1.1. Некоторые особенности работы с биологическими пробами	14
1.2. Взятие проб для анализа	16
Глава вторая. Подготовка проб к анализу	23
2.1. Гомогенизация клеток и тканей	25
2.2. Разделение субклеточных структур с помощью центрифуг	31
2.3. Контроль чистоты фракций и выделение из них химических соединений	44
РАЗДЕЛ ВТОРОЙ. Химические методы анализа	
Глава третья. Химический анализ биологических проб	48
3.1. Белки	48
3.2. Углеводы	53
3.3. Нуклеиновые кислоты	55
3.4. Липиды	56
3.5. Витамины и гормоны	59
3.6. Минеральные вещества	60
РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ. Физико-химические методы	
Глава четвертая. Хроматография	61
4.1. Общие принципы и классификация хроматографических методов	61
4.2. Адсорбционная хроматография	63
4.3. Молекулярно-ситовая хроматография	84
4.4. Ионнообменная хроматография	88
4.5. Распределительная хроматография	94
4.6. Осадочная хроматография	100
4.7. Аффинная хроматография	102
4.8. Тонкослойная хроматография	104
Глава пятая. Электрохимические методы	106
5.1. Электрофорез	107
5.2. Кондуктометрический метод анализа	138
5.3. Потенциометрический метод анализа	147
5.4. Полярографический метод анализа	156
Глава шестая. Оптические методы анализа	166
6.1. Абсорбционный спектральный анализ	167
6.2. Нефелометрический и турбидиметрический методы анализа	192

6.3.Рефрактометрический метод	199
6.4.Поляриметрический анализ	208
6.5.Люминесцентный анализ	219
РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ. Физические методы исследования	
Глава седьмая. Радиоспектроскопия	230
7.1.Электронный парамагнитный резонанс	230
7.2.Ядерный магнитный резонанс	236
Глава восьмая. Эмиссионный спектральный анализ	241
8.1.Теоретические основы метода	241
8.2.Аппаратура эмиссионного анализа	243
8.3.Применение спектрального анализа	250
Глава девятая. Рентгеноструктурный анализ	252
Глава десятая. Масс-спектральный анализ	259
Глава одиннадцатая. Электронная микроскопия	264
11.1.Теоретические основы электронной микроскопии	264
11.2.Аппаратура электронной микроскопии	266
11.3.Применение электронной микроскопии	276
Глава двенадцатая. Гидродинамические методы анализа	277
12.1.Диффузия макромолекул в растворах	278
12.2.Аналитическое ультрацентрифугирование	280
12.3.Вискозиметрия	285
12.4.Двойное лучепреломление в потоке	291
Глава тринадцатая. Изотопные методы исследования	294
РАЗДЕЛ ПЯТЫЙ. Специальные методы анализа	
Глава четырнадцатая. Метод полимеразной цепной реакции	303
Глава пятнадцатая. Иммуноинструментальные методы анализа	308
15.1.Радиоиммунологический анализ	308
15.2.Имуноферментный анализ	311
15.3.Имунофлуоресцентный анализ	314
15.4.Получение иммунных сывороток	316
РАЗДЕЛ ШЕСТОЙ. Модельные методы	
Глава шестнадцатая. Использование моделей в биохимии	320
16.1.Модели и их классификация	320
16.2.Материальные модели	323
16.3.Идеальные модели	330
ПРИЛОЖЕНИЯ	
Приложение 1. Малый практикум по дисциплине “Радиоизотопные методы в биохимии”	338
Приложение 2. Правила работы на лабораторных приборах и оборудовании	384
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	404