

АТОМНО-АБСОРБЦІЙНІ, АТОМНО-ЕМІСІЙНІ СПЕКТРАЛЬНІ, ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сенюк І.В., Ленчик Л.В.

*Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
citochrom@gmail.com*

Атомно - спектроскопічні методи – це методи аналізу, які засновані на вимірюванні енергетичного стану атомів речовин. Вони відрізняються за способом отримання та реєстрації сигналу, а загальним є необхідність попередньої атомізації проб. Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї, випромінюють чи поглинають світло певної довжини хвилі. За інтенсивності смуг у спектрі можна визначити кількість окремих хімічних елементів у зразку.

Атомно – абсорбційна спектроскопія заснована на поглинанні атомами випромінювання від зовнішнього джерела. Метод кількісного елементного аналізу по атомних спектрах поглинання (абсорбції) у полум'ї. Атомні пари проби опромінюють в діапазоні 190-850 нм. У результаті поглинання квантів світла атоми переходять у збуджені енергетичні стани. Цим переходам в атомних спектрах відповідають резонансні лінії, які характерні для даного елемента. Випромінювання потрапляє на вхідну щілину монохроматора, встановленого таким чином, що виділяється із спектру лише резонансна лінія визначуваного елемента, інтенсивність якої вимірюється фотоелектричним способом. Переведення аналізованого об'єкта в атомізований стан і формування поглинаючого шару пару зазвичай здійснюється в полум'ї. Найбільш часто використовують полум'я сумішей ацетилену з повітрям (2000 °С) і ацетилену з N₂O (2700 °С). Атомно – емісійна спектроскопія заснована на випусканні випромінювання атомами, збудженими за використання різних зовнішніх джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

Атомно-емісійний спектральний аналіз (АЕСА) – це метод елементного аналізу речовини, заснований на вивченні спектрів випускання вільних атомів та іонів у газовій фазі в області довжин хвиль 150–800 нм. Перехід у газову фазу здійснюється за використання різних джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма). Пробу досліджуваної речовини вводять в джерело випромінювання, де відбуваються її випаровування, дисоціація молекул і збудження атомів 10 (іонів). Останні випускають характерне випромінювання, яке надходить до реєструючого пристрою спектрального приладу.

Електрофорез – це рух заряджених частинок (колоїдних, білкових тощо) у рідкому чи газоподібному середовищі під дією зовнішнього електричного поля. Білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди знаходяться в розчині у вигляді частинок (макромолекул), що за своїми розмірами відповідають колоїдним. Вони несуть певний електричний заряд, оскільки містять групи, які здатні до електролітичної дисоціації. Загальний заряд макромолекул визначається рН середовища. У електричному полі відповідно до свого заряду макромолекули мігрують у напрямку до протилежно зарядженого електроду. Електрофоретична рухливість заряджених часток може бути представлена наступним чином:

$$u = QD/kT - u', \text{ де}$$

u' – електроосмотична рухливість;

Q – загальний заряд частинки;

D – коефіцієнт дифузії;

k – константа Больцмана;

T – абсолютна температура.

Основні типи електрофоретичних систем – фронтальний електрофорез (метод рухомої межі), стаціонарний (ізоелектрофокусування, імуноелектрофорез) електрофорез та зональний електрофорез (або електрофорез на носії). Однак таке розділення відносно умовне. В системах першого типу електричне поле накладається на межі між розчином макромолекул та буфером. Швидкість міграції заряджених частинок визначається шляхом спостереження за переміщенням цієї межі.

Хроматографія – процес, заснований на багаторазовому повторенні актів сорбції та десорбції речовини при її переміщенні в потоці рухомої фази вздовж нерухомого сорбенту. Розподіл складних сумішей хроматографічним методом засновано на різній сорбції компонентів суміші. При протіканні цього процесу так звана рухома фаза (елюент), що містить аналізовану пробу, переміщується через нерухому фазу. Зазвичай нерухома фаза являє собою речовину з розвинутою поверхнею, а рухлива – потік газу або рідини, що фільтрується через шар сорбенту. При цьому відбувається багаторазове повторення актів сорбції – десорбції, що є характерною особливістю хроматографічного процесу і зумовлює ефективність хроматографічного розділення. Якісний хроматографічний аналіз, тобто ідентифікація речовини по його хроматограмі, може бути виконаний при порівнянні хроматографічних характеристик, найчастіше це утримуваного об'єму (тобто об'єму рухомої фази, пропущеної через колонку від початку введення суміші до появи даного компонента на виході з колонки), які знаходять при певних умовах для компонентів аналізованої суміші та для еталона. Кількісний хроматографічний аналіз зазвичай проводять на хроматографі. Метод заснований на вимірюванні різних параметрів хроматографічного піка (висоти, ширини, площі і утримуваного об'єму), які залежать від концентрації речовин, що визначаються. У кількісній газовій хроматографії застосовують методи абсолютного градування і внутрішньої нормалізації, або нормування. Використовується також метод внутрішнього стандарту. При абсолютному градуванні експериментально визначають залежність висоти або площі піка від концентрації речовини і будують градувальні графіки або розраховують відповідні коефіцієнти. Далі визначають ті ж характеристики піків в аналізованій суміші, і за градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованого речовини. Цей простий і точний метод є основним при визначенні мікродомішок. При використанні методу внутрішньої нормалізації беруть суму будь-яких параметрів піків, наприклад суму висот всіх піків або суму їх площ, за 100%. Тоді відношення висоти окремого піка до суми висот або відношення площі одного піку до суми площ при множенні на 100 буде характеризувати масову частку (%) компонента у суміші. При такому підході необхідно, щоб залежність величини вимірюваного параметра від концентрації була однаковою для всіх компонентів суміші.