

Инструментальные методы исследований

Современные физические и физико-химические (инструментальные) методы исследования клеточных метаболитов и макромолекул

Классификация инструментальных методов исследований

По природе

обнаруживаемых или определяемых соединений:

- Изотопный анализ
- Элементный анализ
- Структурно-групповой (функциональный) анализ
- Молекулярный анализ
- Фазовый анализ

По принципам,

положенным в основу работы аналитических приборов:

- Оптические методы (спектрофотометрия в ИК, УФ и видимом диапазоне, люминесцентный анализ, рефрактометрия и др.)
- Термические методы (ТГ, ДТА, калориметрические методы, в т.ч. ДСК)
- Электрохимические методы
- Резонансные методы (ЯМР, ЭПР)
- Хроматографические методы (ГХ, ЖХ, ВЭЖХ, ЭФ и др.)
- Масс-спектрометрия
- Рентгено-флуоресцентный анализ
- Рентгено-структурный анализ

Важнейшие физические и физико-химические методы исследования

UV, VIS - спектроскопия

ИК-спектроскопия

ЯМР-спектроскопия

Масс-спектроскопия

Рентгеноструктурный анализ

Методы термического анализа

Хроматографические методы

Электрохимические методы

В том числе:

- электрохимические методы (потенциометрия, полярография, кондуктометрия, и др.); диэлектрическая спектроскопия;
- газовая и жидкостная хроматография;
- гель-электрофорез и капиллярный электрофорез;
- методы просвечивающей и растровой электронной микроскопии

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ХРОМАТОГРАФИЯ – это динамический метод разделения сложных смесей соединений на отдельные компоненты, основанный на их многократном перераспределении между подвижной и неподвижной фазами при переносе через слой неподвижной фазы в хроматографической колонке

подвижная фаза – газ (**газовая хроматография**) или жидкость (**жидкостная хроматография**)

неподвижная фаза – сорбент. В зависимости от типа сорбента **газовая хроматография** подразделяется на два вида:

газоадсорбционная хроматография (ГАХ) – используется твердый мелкодисперсный адсорбент с развитой пористой структурой и высокой удельной поверхностью

газожидкостная хроматография (ГЖХ) – используется мелкодисперсный инертный носитель с нанесенной на поверхность его частиц неподвижной жидкой фазой - пленкой высококипящей жидкости, в которой могут растворяться разделяемые компоненты

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Газовая хроматография – ГАХ и ГЖХ

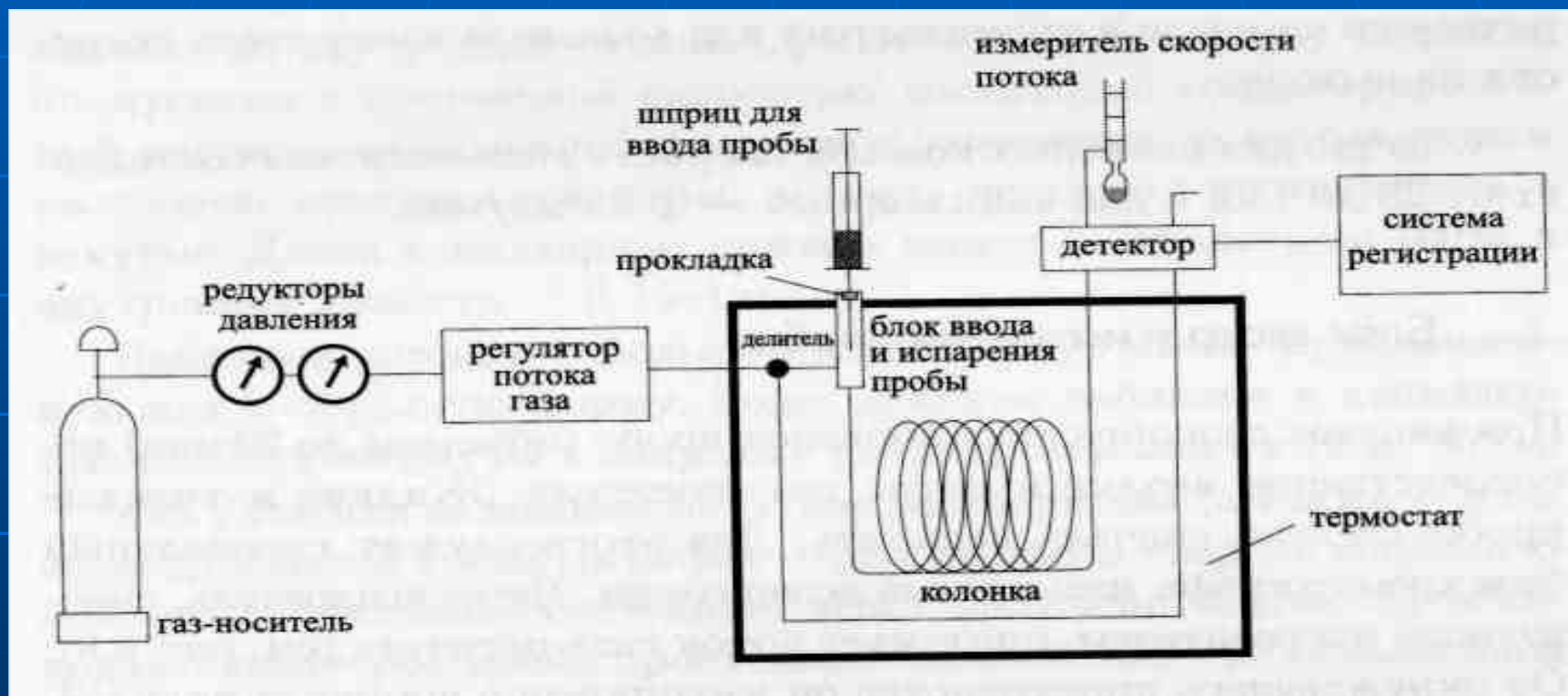


Схема устройства газового хроматографа

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Газовая хроматография – ГАХ и ГЖХ

Возможности методов ГХ: разделение на отдельные компоненты, качественный и количественный анализ сложных смесей летучих соединений, а также нелетучих соединений, которые могут быть преобразованы в их летучие производные

Качественный анализ: идентификация отдельных компонентов смесей путем сравнения параметров удерживания с известными веществами, а также с использованием детекторов различного принципа действия: ДИП, ДТП, электронного захвата, УФ, ИК, МС.

Количественный анализ: определение содержания компонентов смесей с использованием методов абсолютной калибровки, внутреннего стандарта, добавки и внутренней нормализации

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Механизмы разделения в ЖХ:

- адсорбционный (жидкостно-твердофазная хроматография);
- распределительный (жидкостно-жидкостная хроматография; включая нормально-фазовую и обращенно-фазовую);
- ионообменный (ионообменная хроматография);
- эксклюзионный (гель-проникающая хроматография - ГПХ);

В классическом варианте ЖХ. как правило, используются стеклянные колонки с внутренним диаметром 1-5 см и высотой 50-500 см при скорости протока жидкой подвижной фазы 1-5 мл/мин; зерна сорбента-наполнителя имеют диаметр 150- 250 мкм. Для повышения скорости и эффективности разделения требуются размеры частиц наполнителя 1-10 мкм и высокое давление для увеличения скорости протока элюента – этот вариант ЖХ называют ВЭЖХ

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

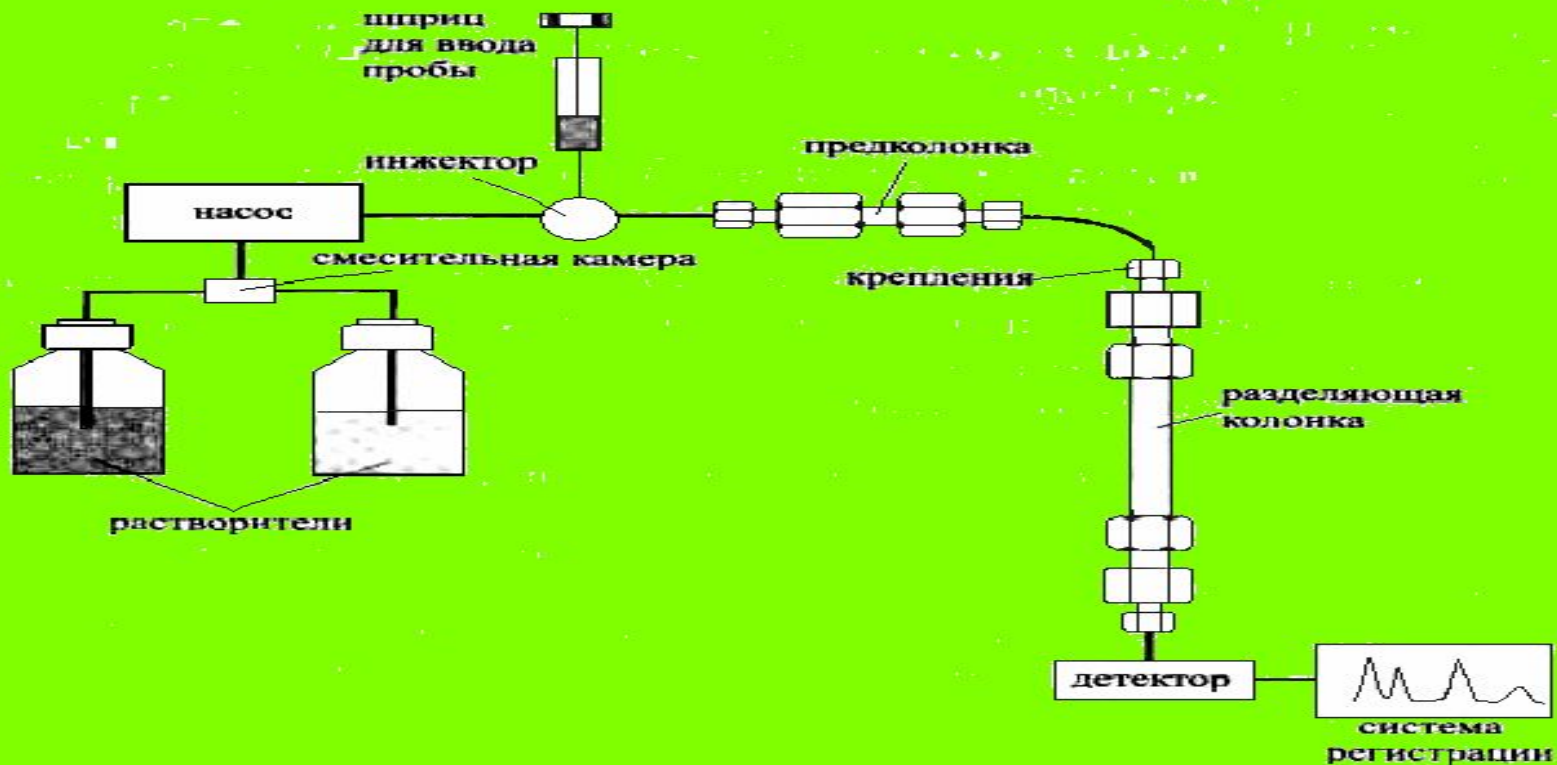
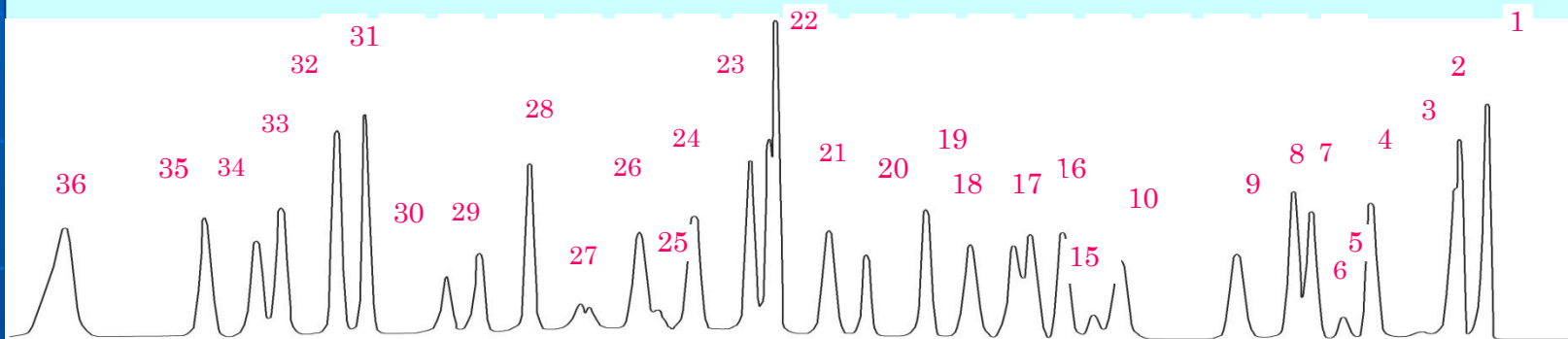


Схема устройства хроматографа для ВЭЖХ

- давление до 15 МПа; скорость потока жидкости 0.1-10 мл/мин;
- погрешность воспроизводимости скорости потока не более 0.5%

Ионообменная хроматография аминокислот

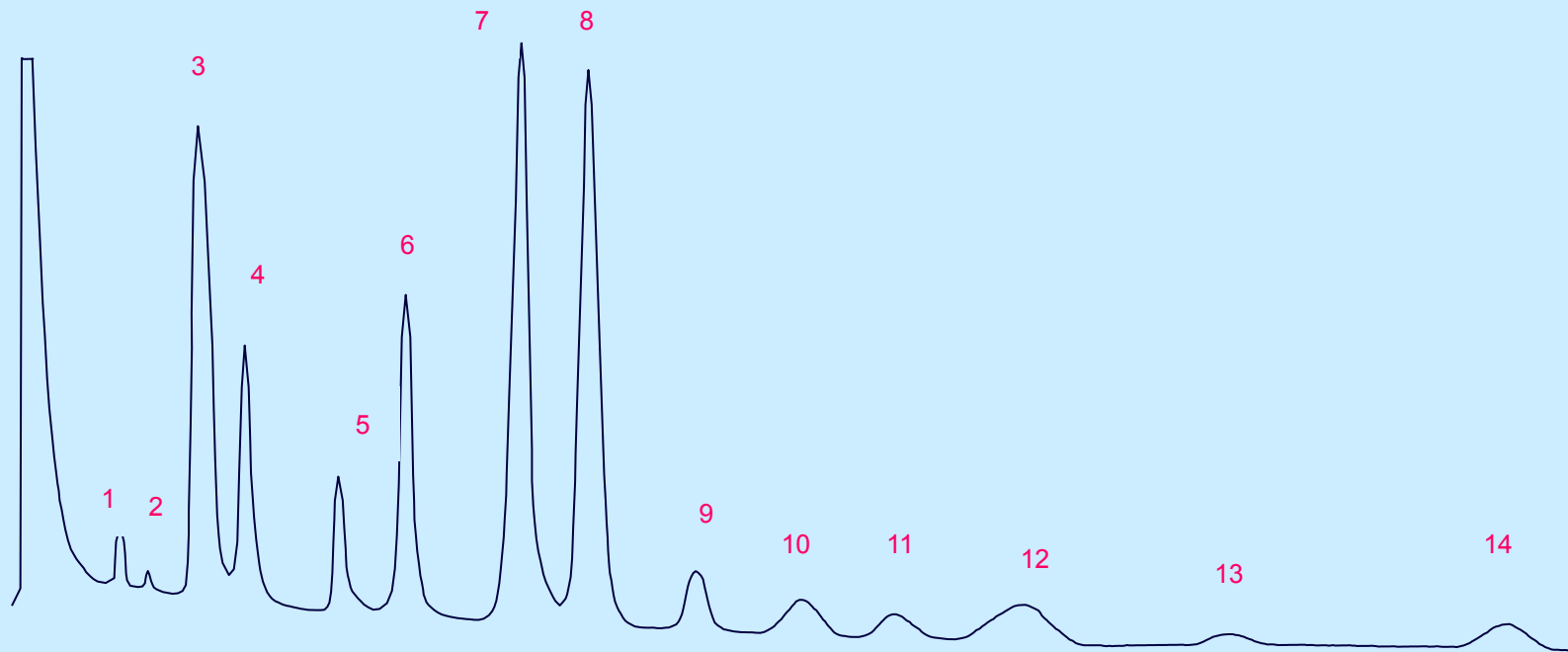


1 - Цистеионовая кислота
2 - Таурин
3 - Фосфоэтаноламин
4 - Мочевина
5 - Аспарагиновая кислота
6 - Гидроксипролин
7 - Треонин
8 - Серин
9 - Аспарагин
10 - Глутаминовая кислота
11 - Глутамин
12 - α -Аминоадипиновая к-та
13 - Пролин
14 - Глицин

15 - Аланин
16 - Цитруллин
17 - α -Аминомасляная к-та
18 - Валин
19 - Цистин (1/2)
20 - Метионин
21 - Цистатион
22 - Изолейцин
23 - Лейцин
24 - Тирозин
25 - Фенилаланин
26 - β -Аланин
27 - β -Аминомасляная кислота

28 - γ -Аминомасляная кислота
29 - Аммиак
30 - Этаноламин
31 - Орнитин
32 - Лизин
33 - Гистидин
34 - 1-Метилгистидин
35 - 3-Метилгистидин
36 - Аргинин

Газо-жидкостная хроматография метиловых эфиров жирных кислот

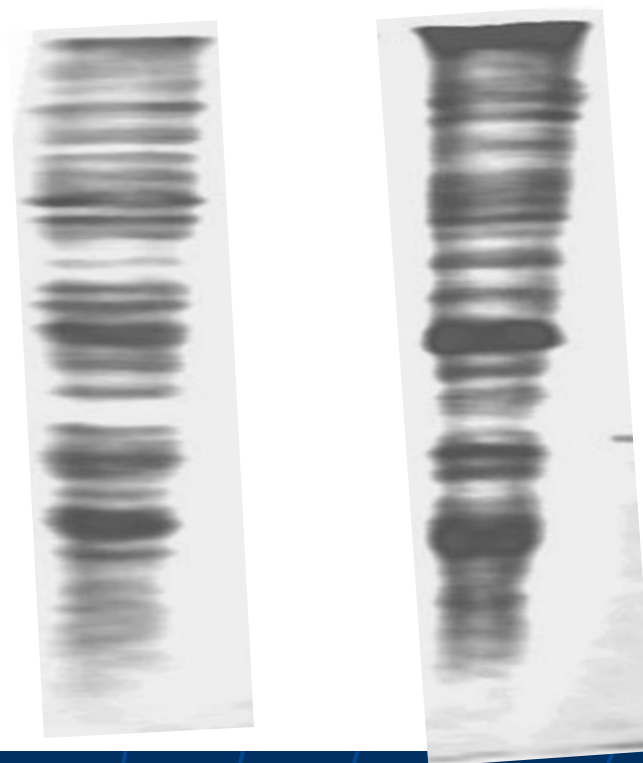


1. Лауриновая; 2. Миристиновая; 3. Пальмитиновая; 4. Пальмитоолеиновая; 5. Стеариновая; 6. Олеиновая; 7. Линолевая; 8. Линоленовая; 9. Эйкозановая; 10. Эйкозеновая; 11. Эйкозодиеновая; 12. Эйкозатриеновая; 13. Арахидоновая; 14. Эруковая.

Гель-электрофорез

■ **Принцип метода** заключается в том, что заряженные молекулы перемещаются в ПААГ или в капилляре под действием электрического поля. Для исследований белков широко применяется диск-электрофорез в столбиках или пластинах ПААГ с предварительной обработкой белков DDS-Na и бета-меркаптоэтанолом. Метод позволяет разделить белки по величине ММ, определить ММ, а по денситограммам оценить долю фракций

Электрофореграммы белков-криопротекторов из клеток меристем



Капиллярный электрофорез

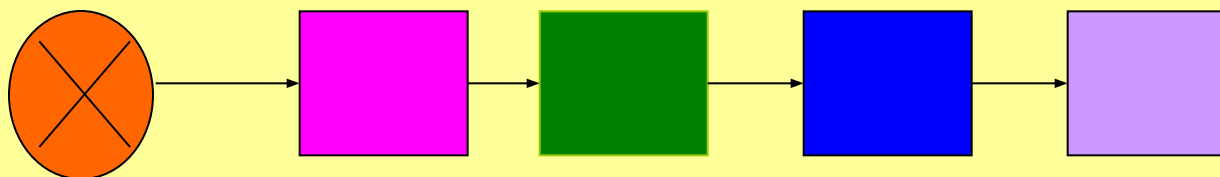
Использование в электрофорезе разработок, применяемых в капиллярной газовой хроматографии, резко расширило возможности метода. Современный вариант электрофореза называют капиллярным электрофорезом или, по аналогии с ВЭЖХ, высокоэффективным капиллярным электрофорезом. Капиллярный электрофорез позволяет реализовать все разновидности электрофоретических методов

Использование в газовой, жидкостной хроматографии и капиллярном электрофорезе наряду с обычными детекторами ИК-детекторов и МС-детекторов резко повышает возможности этих методов для качественного и количественного анализа. В этом случае для каждого компонента может быть получен ИК-спектр или масс-спектр

Физические методы: соответствие областей электромагнитного спектра спектроскопическим методам

Спектроскопические методы	Спектральная область	Изменяют свою энергию
Ядерно-физические	0,005 - 1,4 А	Ядра
Рентгеновские	0,1 - 100 А	Внутренние электроны
Вакуумная УФ-спектроскопия	10 - 180 нм	Валентные электроны
УФ-спектроскопия	180 - 400 нм	Валентные электроны
Спектроскопия в видимой области (VIS)	400 - 780 нм	Валентные электроны
Ближняя инфракрасная спектроскопия (ИКС)	780 - 2500 нм	Колебательные движения молекул
Инфракрасная спектроскопия (ИКС)	2500 - 2750 нм	Вращательные движения молекул
Микроволновая спектроскопия	0,75 - 3,75 мм	Колебательно-вращательные движения молекул
Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)	Около 3 см	Неспаренные электроны в магнитном поле
Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)	0,6-10 м	Ядерные спины в магнитном поле

Принципиальная схема UV, VIS, ИК-спектрометра



Источник
излучения

Монохроматор

Образец

Детектор

Регистратор

ИК-спектроскопия

Принцип метода:

Основан на способности исследуемых материалов избирательно взаимодействовать с электромагнитным излучением с поглощением энергии в инфракрасном диапазоне спектра (0.75-1000 мкм). Поглощение в ИК-диапазоне связано с резонансным возбуждением колебаний (валентных и деформационных) в молекулах. Каждому типу связей соответствуют колебания определенной частоты. Частоты этих колебаний сохраняются в ИК-спектрах различных соединений и называются *характеристическими*. По характеристическим частотам можно идентифицировать функциональные группы молекул, в том числе и молекул биополимеров, а также структуру молекул

ИК-спектроскопия

Образцы для анализа:

Как правило, чистые образцы веществ;

Пленки полимерных материалов

Суспензии тонкодисперсных порошков в вазелиновом масле;

Таблетки на основе тонкодисперсного полимерного материала, спрессованные с порошком KBr;

Растворы или индивидуальные вещества в жидком виде;

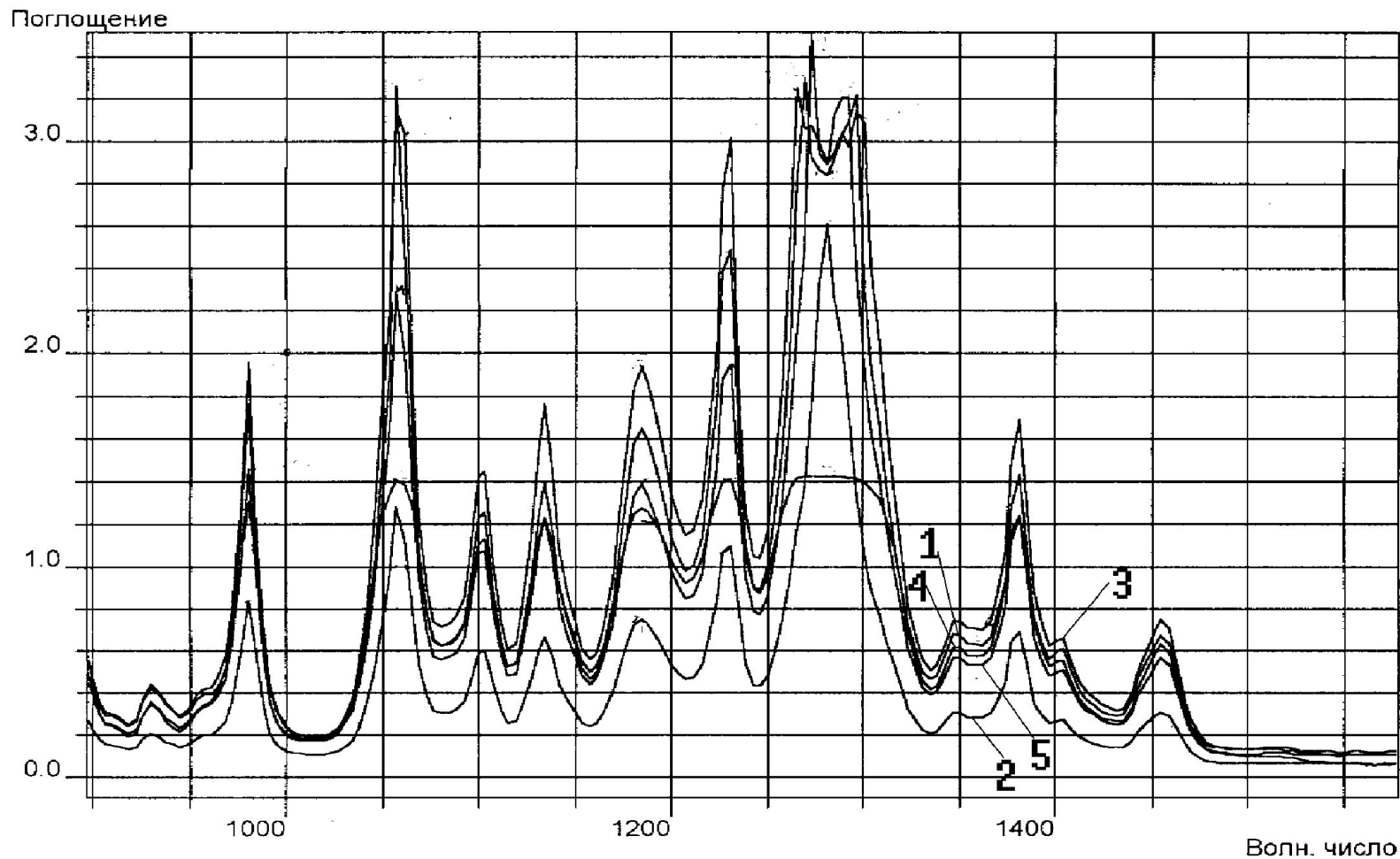
Газы или пары веществ - анализ в специальных газовых кюветах.

■ Возможности метода:

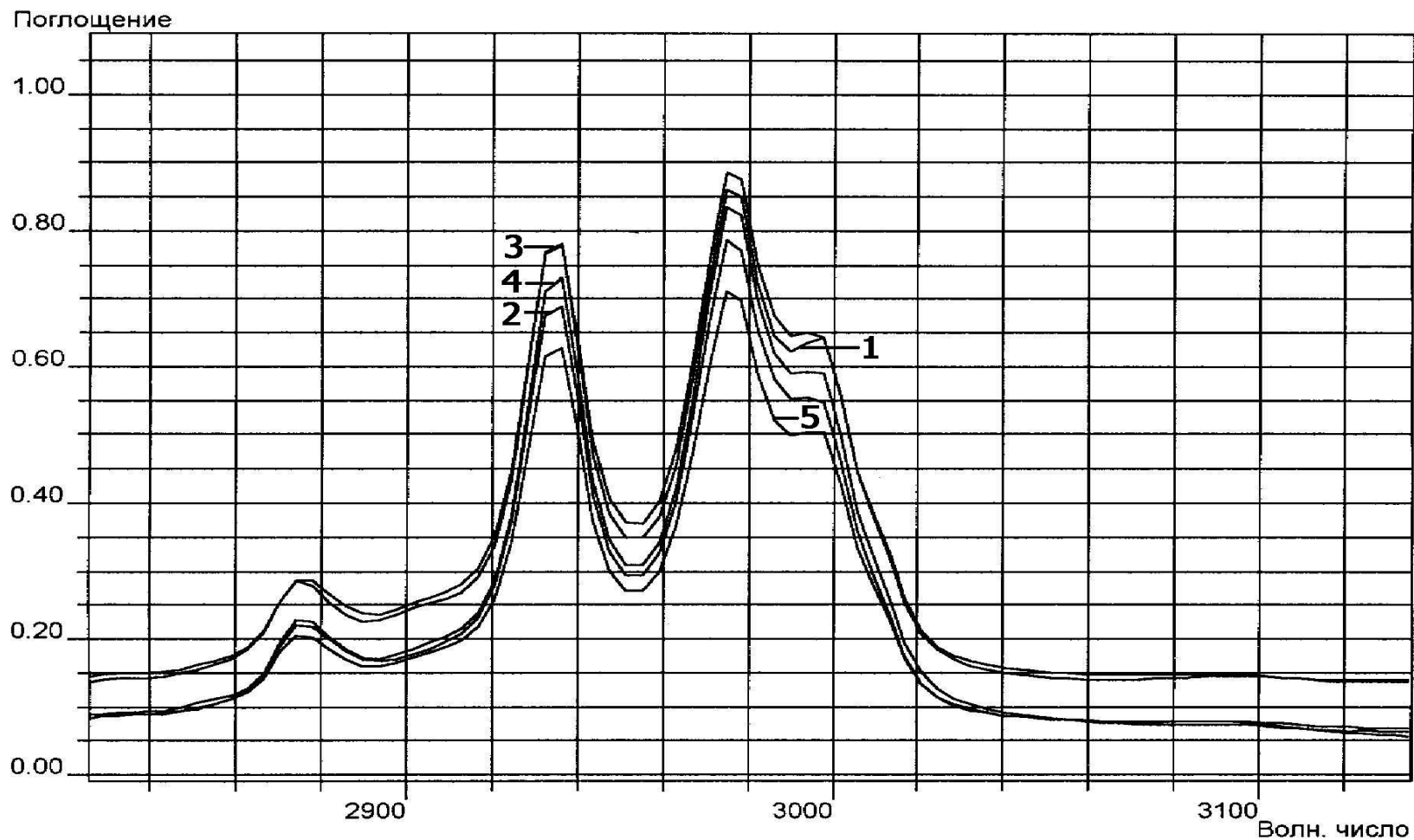
Качественный анализ: идентификация веществ и расшифровка структуры путем сравнения со спектрами известных веществ, либо со спектрами из компьютерных баз данных по ИК-спектроскопии, напр., из базы данных ИК-спектров OPUS фирмы BRUKER;

Количественный анализ (Закон Бугера-Ламберта Бэра

Фрагмент ИК-спектров ПГА (1)



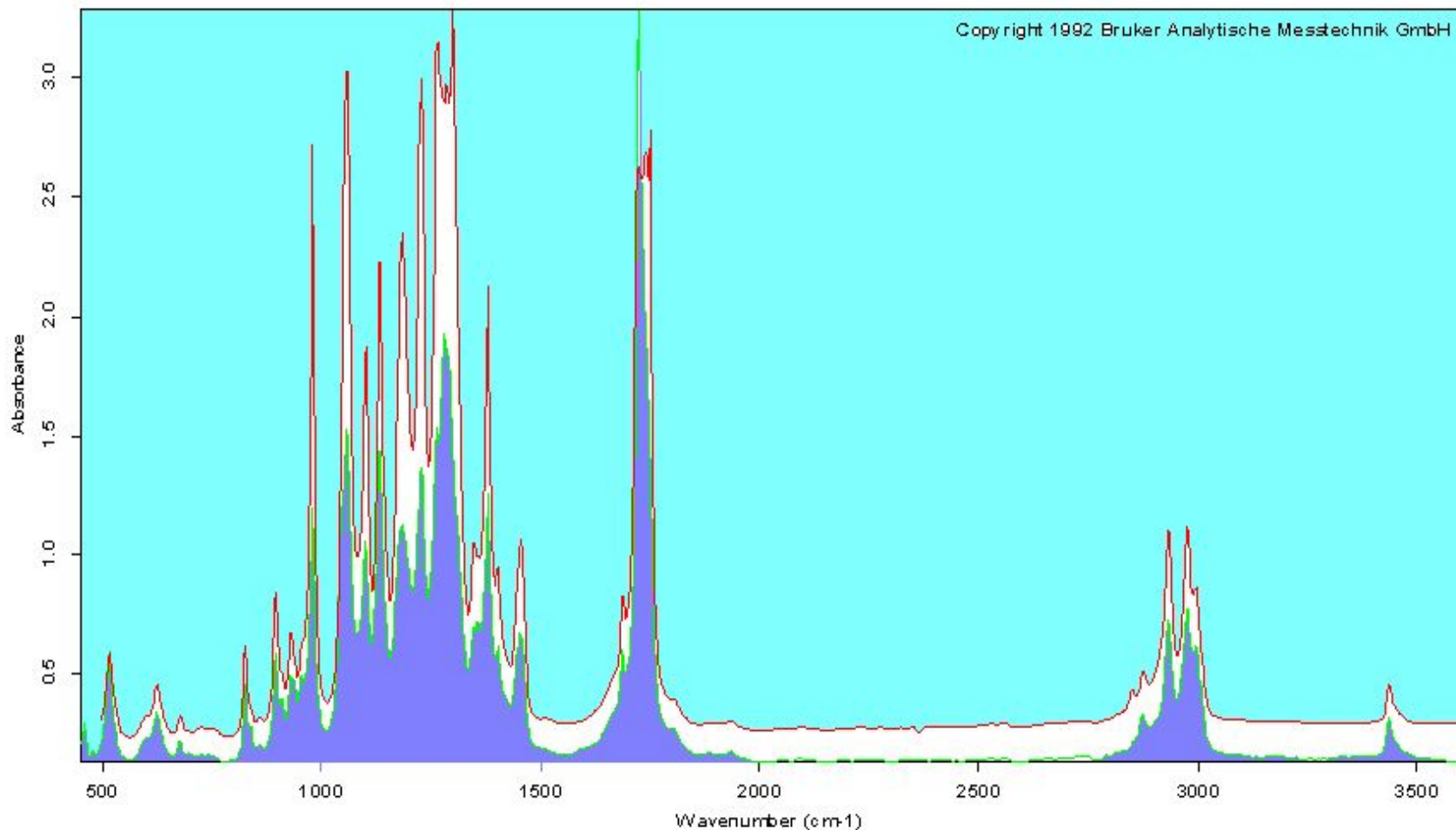
Фрагмент ИК-спектров ПГА (2)



Пример отнесения полос (пиков) поглощения в сополимерах ПГА

№	Волновое число, 1/см	Отнесение полос поглощения
1	517	Скелетные ν и δ X – Y, где X – C, O, N, Y – C, N
2	625	δ C-H
3	679	Колебание атомов C, H, N, S
4	756	δ неплоские C-H
5	826	δ C-H
6	895	δ неплоск. концевой CH ₃ , Колебания любой -OH
7	1130	Маятниковые колебания группы CH ₃

ИК-спектры стандартного (из базы данных OPUS, Bruker) и исследуемого образцов полигидроксибутирата



Спектроскопия в УФ- и видимой областях

Диапазоны: UV 180-400 нм; VIS 400-800 нм

Принцип метода:

- Поглощение электромагнитной энергии в УФ- и видимом диапазонах спектра связано с возбуждением валентных электронов, находящихся в органических соединениях в различных состояниях: n , π и σ -электроны. Наиболее важным источником информации о структуре соединений является избирательное поглощение, характерное для ненасыщенных соединений. Группы атомов, ответственные за избирательное поглощение, называются *хромофорами*

Возможности метода:

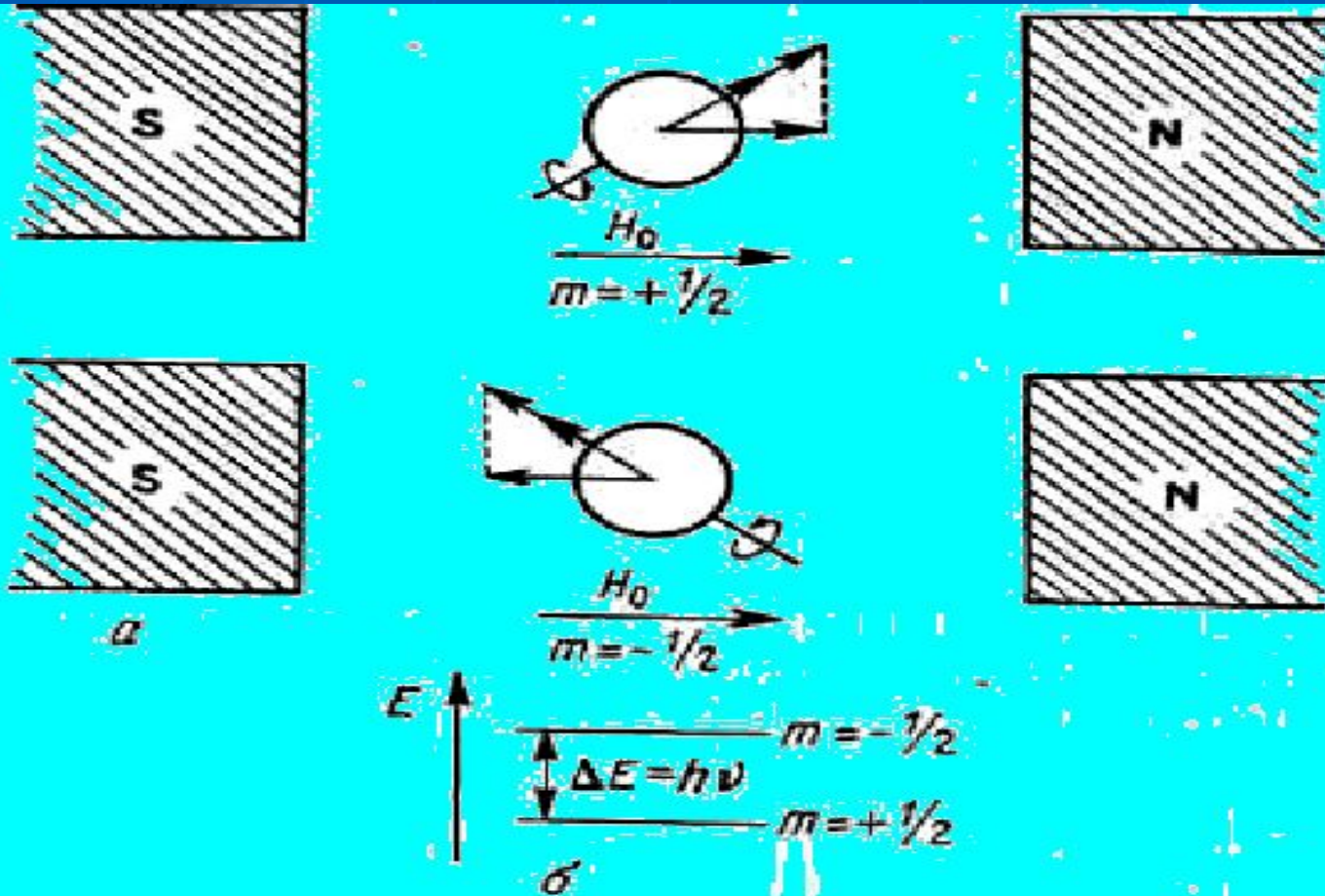
- Качественный структурно-групповой анализ по хромофорным группам;
- Количественный анализ (определение содержания компонентов в растворах – закон Бугера-Ламберта-Бэра)

ЯМР-спектроскопия

Принцип метода:

Явление резонанса в спектре ЯМР наблюдается при поглощении электромагнитного излучения парамагнитными ядрами, находящимися в однородном внешнем поле. Магнитным моментом обладают ядра, в состав которых входят нечетное число нейтронов или протонов. Если парамагнитное ядро поместить в однородное магнитное поле, то возможна различная ориентация его магнитного момента по отношению к внешнему полю, которая определяется магнитным спиновым квантовым числом m_I (m_I может принимать значения $+I, I-1, \dots, -I$). При наложении дополнительного переменного электромагнитного поля, магнитный вектор которого перпендикулярен однородному магнитному полю, возможна вынужденная переориентация магнитного момента ядра, сопровождаемая поглощением энергии высокочастотного поля (ядерный магнитный резонанс).

Принципиальная схема ЯМР-спектрометра



ЯМР-спектроскопия

Возможности метода ЯМР-спектроскопии в исследованиях структуры биополимеров:

- Детальное изучение микроструктуры полимерных цепей (ЯМР высокого разрешения);
- Исследование молекулярных движений в полимерах (Метод импульсного ЯМР);
- Исследование химических процессов, напр., кинетика полимеризации, термодеструкции, плавления, кристаллизации (Метод импульсного ЯМР);
- Анализ конфигурационных последовательностей звеньев в макромолекулах;
- Оценка степени кристалличности, степени набухания и глубины превращения в реакциях полимеризации

Масс-спектроскопия

Принцип метода: Масс-спектроскопия является аналитическим методом, при котором исследуемый образец, находящийся в газообразном состоянии в высоком вакууме ($\sim 10^{-6}$ мм рт. ст.), подвергается ионизации и фрагментации. Образовавшиеся после ионизации положительно заряженные частицы ускоряются в электрическом поле, затем разделяются в магнитном поле на пучки ионов с одинаковым отношением массы к заряду и далее сигнал регистрируется

Возможности метода:

- Качественный и количественный анализ структуры соединений

Принципиальная схема масс-спектрометра



Термические методы анализа

ТГ – термогравиметрия (измерение массы образца в процессе программируемого нагрева)

ДТГ – деривативная термогравиметрия (измерение скорости потери массы в условиях программируемого нагрева)

ДТА – дифференциальный термический анализ (измерение разности температур между исследуемым образцом и термоинертным эталонным веществом в условиях программируемого нагрева или охлаждения)

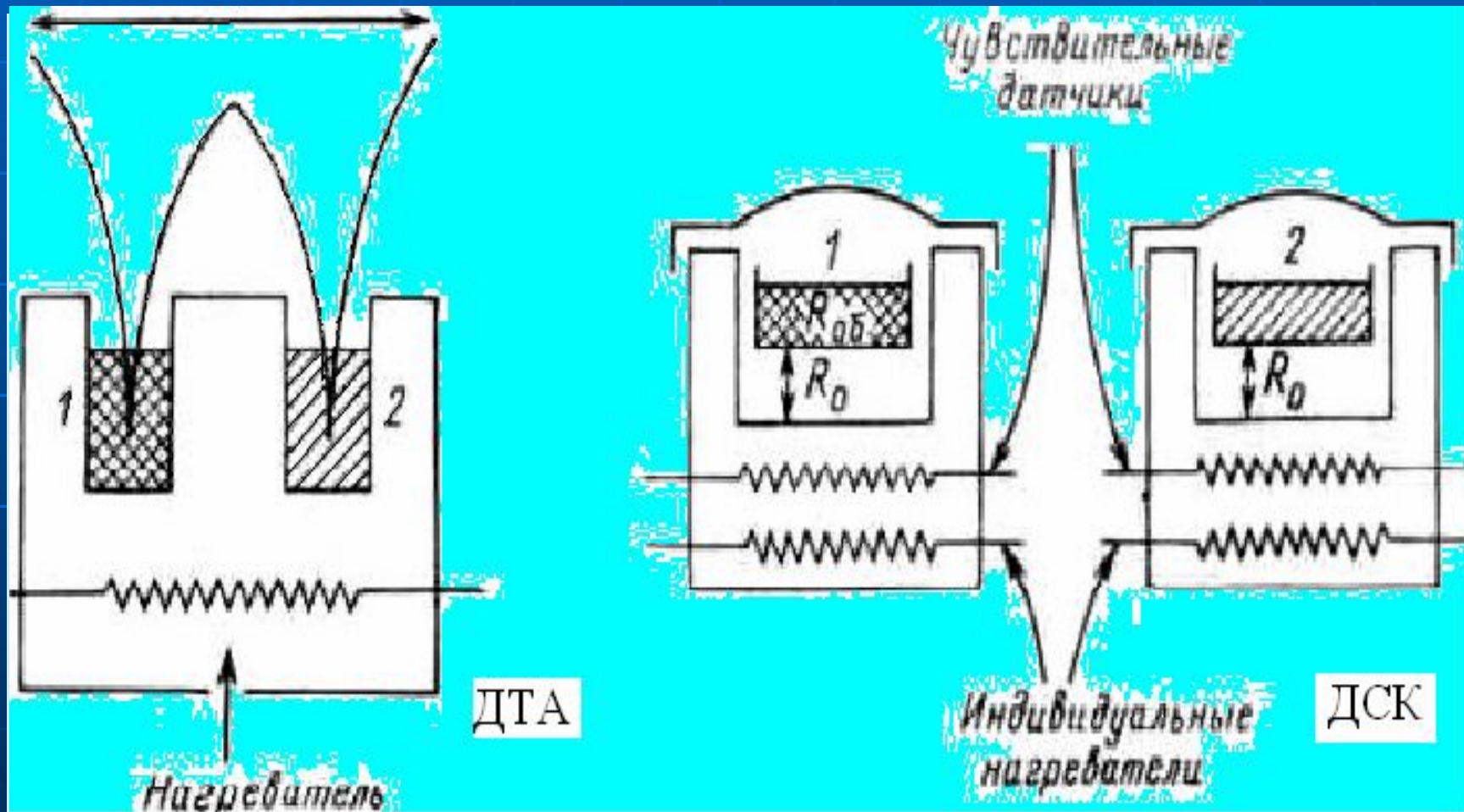
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия (измерение тепловой мощности, выделяемой или поглощаемой в исследуемом веществе в условиях программируемого нагрева или охлаждения)

МК – микрокалориметрия (измерение тепловой мощности в изотермических условиях; чувствительность $\sim 0.1-0.01 \mu\text{Вт}$)

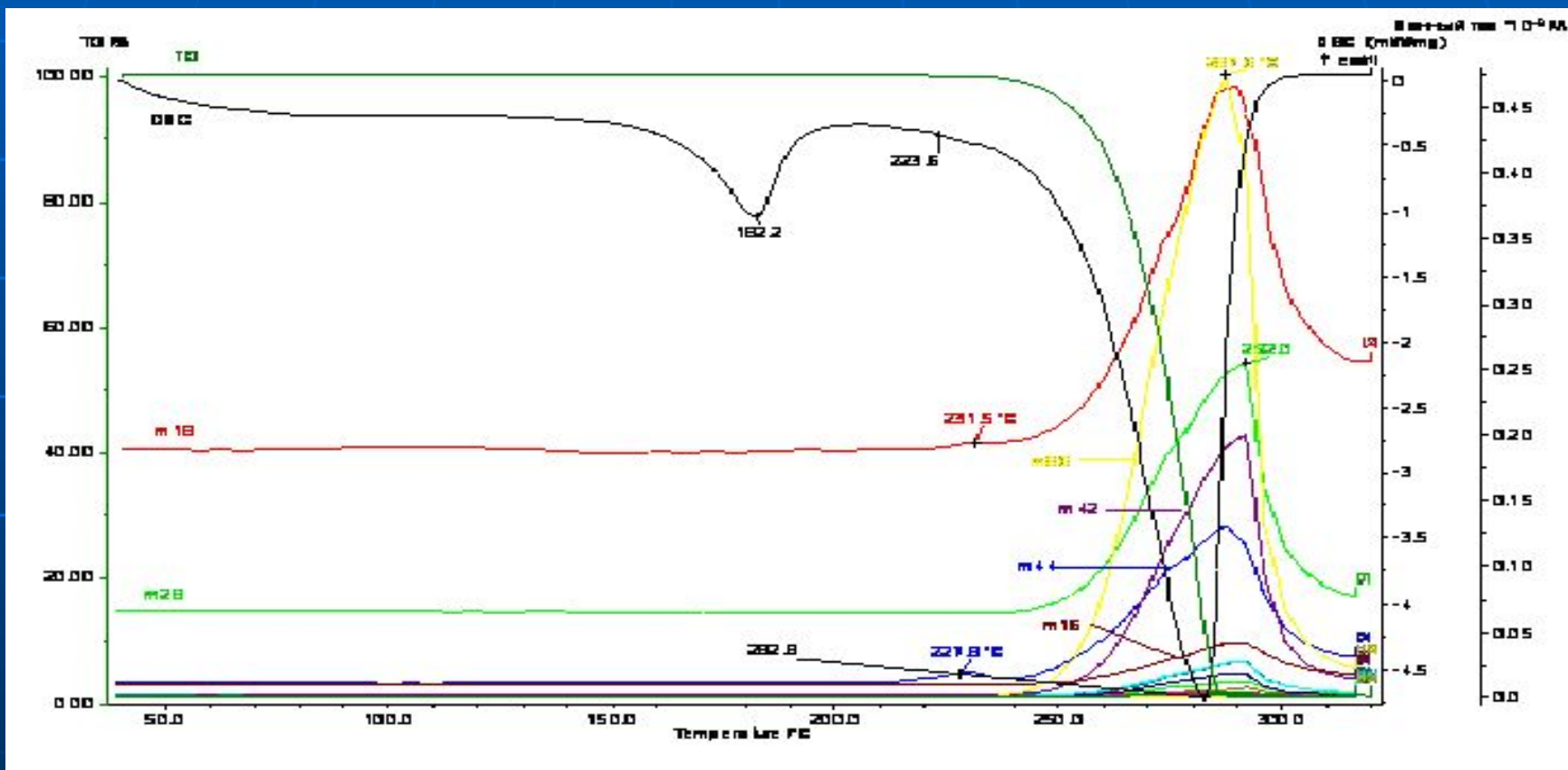
Термические методы анализа

- **Возможности методов ТА:**
- **Исследование фазовых переходов (плавление, кристаллизация, структурные модификации кристаллов, испарение и т.д.)**
- **Исследование процессов стеклования и расстеклования макромолекул**
- **Измерение теплоемкости, теплопроводности, теплоты сгорания, термостабильности и др. термических характеристик**
- **Исследование химических превращений (синтез полимеров, окисление, отверждение, термодеструкция и др.**
- **Исследование кинетики и механизмов химических и ферментативных реакций, теплопродукции организмов в изотермических условиях и многое другое)**
- **Термомеханический анализ полимеров и биополимеров**
- **Исследование гидратации молекул, в т.ч. макромолекул биополимеров**
- **Исследование процессов сорбции-десорбции, структуры адсорбентов, связывания лигандов, в т.ч. в биологических системах**
- **Термические сенсоры с иммобилизованными ферментами**

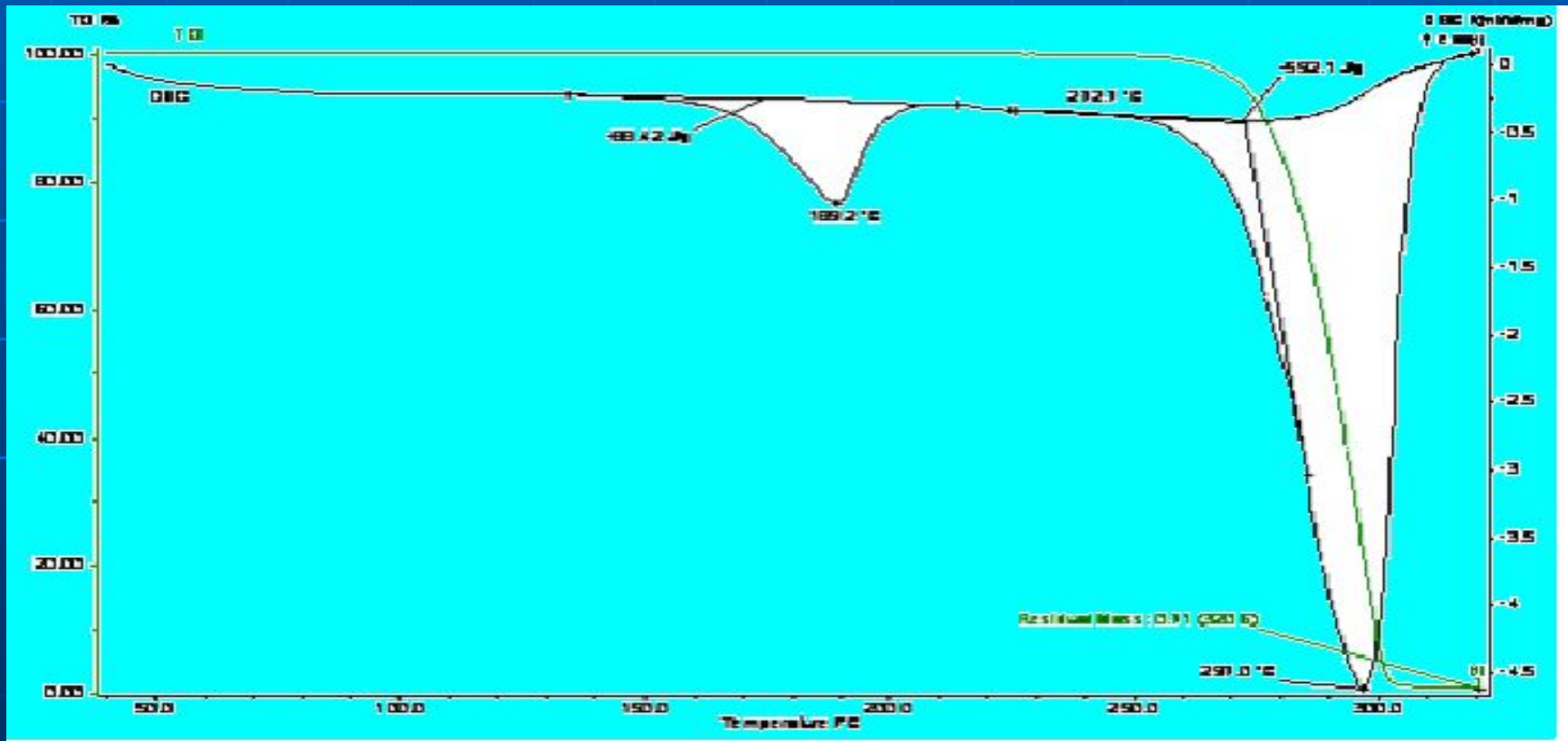
Термические методы анализа



Термограмма и масс-спектры продуктов термодеструкции образца полигидроксибутирата



Термограмма образца полигидроксипутирата ТГ (термогравиметрия) и ДСК (дифференциальная сканирующая калориметрия)



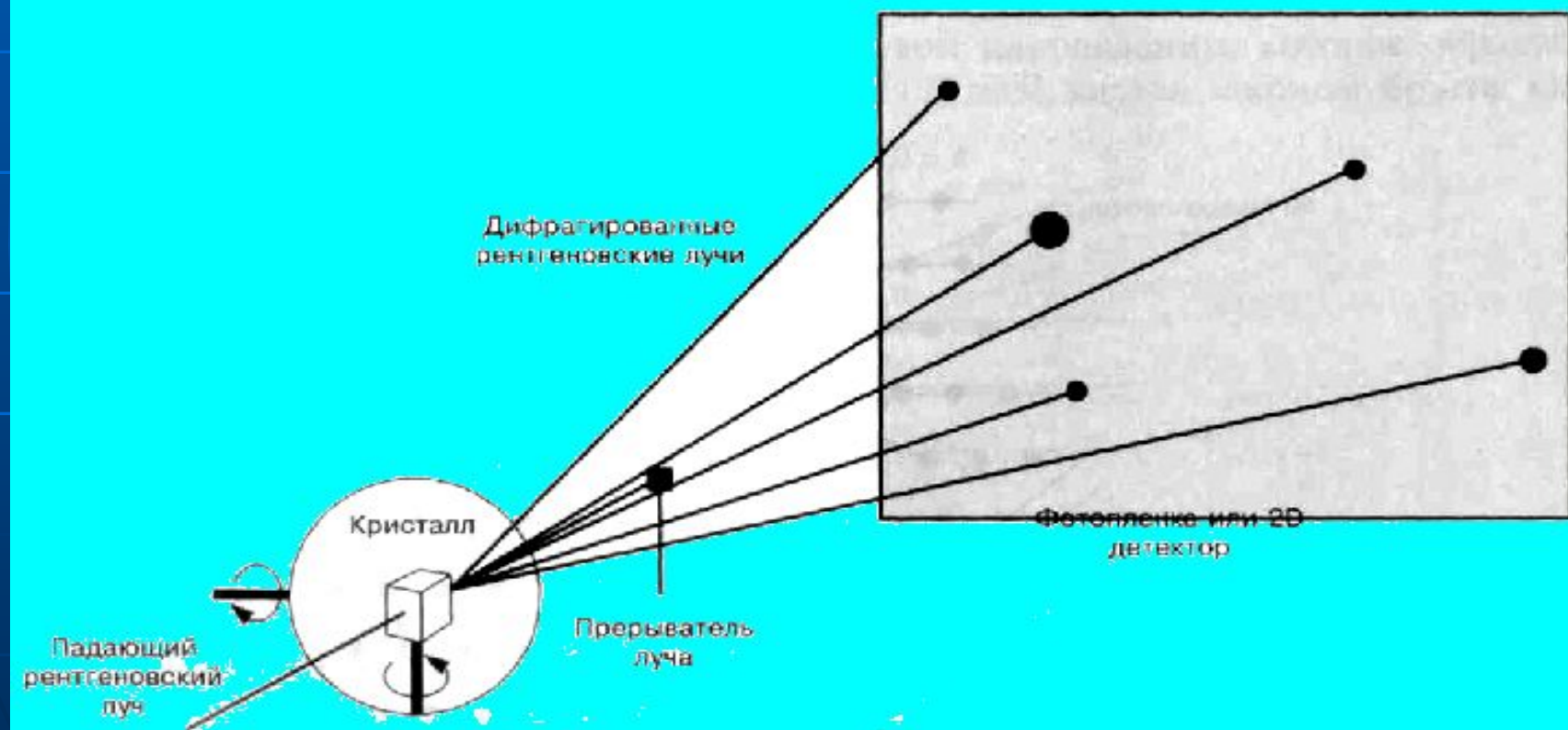
Рентгеноструктурный анализ полимеров

Принцип метода:

Рентгеноструктурный анализ представляет собой метод исследования структуры веществ с помощью дифракции рентгеновских лучей. Рентгеновские лучи с длиной волны $\lambda = 0.5-2.0 \text{ \AA}$ при прохождении через исследуемый образец претерпевают дифракцию. Формирующаяся при этом дифракционная картина отражает информацию о структуре вещества. Основная область применения рентгеноструктурного анализа (РСА) – изучение строения кристаллов.

Этим методом исследуют молекулярные кристаллы, определяют длины связей, углы между ними, устанавливают конформацию молекулы и упаковку молекул в кристалле. В частности, методом РСА определены параметры элементарных ячеек кристаллов многих полимеров, биополимеров и конформации макромолекул в кристаллическом состоянии (вспомните открытие структуры ДНК). РА применяется также для определения характера и степени ориентации кристаллитов в ориентированных полимерах, для оценки степени кристалличности (СК). Данные РА используют при определении размеров кристаллитов и степени порядка внутри них

Принципиальная схема прибора для рентгеноструктурного анализа



Основные узлы рентгенофлуоресцентного спектрометра с волновой дисперсией

