

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

В.И. Кочубей

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВ ПРИ
ПОМОЩИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Руководство к лабораторной работе

Саратов — 2008

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Спектры поглощения света веществом определяются разностью энергий между энергетическими уровнями при переходе электрона с нижнего уровня на верхний. В случае молекулярного состава вещества эти уровни зависят от свойств входящих в него молекул, а также вероятностями перехода между уровнями. Разность энергий определяет длину волны, на которой происходит поглощение света, вероятность перехода - коэффициент поглощения вещества. Для биологически важных молекул характерны широкие полосы поглощения, обусловленные электронными, колебательными и вращательными уровнями. Молекулярные группы, поглощающие свет, в биологии называют хромофорами.

Свойство атомов и молекул поглощать свет с определенной длиной волны, характерной для данного вещества, широко используется для качественных и количественных исследований его состава. Для регистрации спектров поглощения используются спектрофотометры.

При прохождении через вещество свет поглощается. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, интенсивность I света, прошедшего через слой, и интенсивность I_0 света, падающего на него, связаны между собой соотношением:

$$I = I_0 e^{-kcl} \quad (1)$$

где $e \sim 2,72$ - основание натурального логарифма, k - коэффициент пропорциональности, характерный для данного вещества и для данной длины волны, l - толщина поглощающего слоя, c - концентрация вещества, поглощающего свет. Для практических приложений закон (1) записывается в виде:

$$I = I_0 10^{-\epsilon_\lambda cl} \quad (2)$$

где величина ϵ_λ - молярный коэффициент поглощения на длине волны λ . Показатель степени в формуле (2), взятый с обратным знаком, называют оптической плотностью:

Как следует из формул (1) и (2), экспериментально определив отношение интенсивностей падающего и прошедшего света, можно определить концентрацию c вещества если известен молярный коэффициент поглощения ϵ_λ . Изучения веществ по их способности поглощать свет называется абсорбционной спектрофотометрией.

На практике измеряют две физические величины: коэффициент пропускания T или оптическую плотность D . Коэффициент пропускания T определяется как отношение интенсивностей прошедшего через образец и падающего на образец света:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

Значения T могут меняться от 0 (поглощается весь свет) до 1 (весь свет проходит). Если T измеряется в процентах, то используют формулу

$$T = 100 \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

Оптическую плотность D можно определить из формулы (2) и выразить через коэффициент пропускания:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} \quad (5)$$

Как следует из формулы (5), уменьшение коэффициента пропускания T от 100% до 0%, соответствует росту оптической плотности D от 0 до ∞ : T и D - безразмерные величины. Единица измерения концентрации поглощающего вещества [с]= моль/л; длины [l] - см; молярного коэффициента поглощения [ϵ_λ]=л/(моль см).

Кроме спектральной зависимости пропускания и оптической плотности спектр поглощения можно представить в виде зависимости молярного коэффициента поглощения ϵ_λ от длины волны λ .

МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРОВ

Прибор для определения спектральных зависимостей коэффициента пропускания или оптической плотности называется спектрофотометром.

Наиболее часто используемые спектрофотометры имеют диапазон измерений по длинам волн 180-1100 нм. Этот диапазон включает в себя три области спектра: ближнюю ультрафиолетовую область (УФ) -180-380 нм; видимую - 380-760 нм и ближнюю инфракрасную (ИК) - 760-1100 нм. Область измерений спектра конкретного вещества определяется исходя из его химического состава. Для биологических веществ можно рассмотреть следующие основные хромофоры.

Спектральные свойства оксигемоглобина (рис.1) характеризуются наличием двух полос поглощения в желто-зеленой части видимого спектра, одна из которых, лежащая ближе к красной области спектра, обозначается как α -полоса; другая, с более короткой длиной волны, более широкая и с менее резкими краями,- как полоса β . В фиолетовой части спектра лежит весьма интенсивная полоса поглощения, обозначаемая как γ -полоса (или полоса Соре). Максимум α -полосы поглощения HbO_2 находится в области длин волн 575-579 нм, максимум β -полосы приходится на 540-544 нм. γ -полоса имеет максимум в интервале 410-416 нм. Между α - и β -полосой находится минимум при 560 нм. α -, β - и γ -полосы характерны для группы гема. Считается, что γ -полоса обусловлена порфирином простетической группы.

В ближней инфракрасной области спектра оксигемоглобин имеет широкую малоинтенсивную полосу поглощения около 925 - 930 нм (рис.2). В ультрафиолетовой области наблюдаются две полосы поглощения. γ' -полоса (343-360 нм) обусловлена связанным железом. Максимум ϕ -полосы, обусловленной белковой частью молекулы гемоглобина, находится при 275 - 280 нм.

Вместо α и β -полос в спектре поглощения деоксигемоглобина имеется одна, более широкая и менее интенсивная полоса в области 555-560 нм. Кривая поглощения асимметрична и имеет отчетливый перегиб при 585-590 нм. В красной области спектра наблюдается слабая полоса с максимумом при 760 нм. Максимум широкой и интенсивной γ -полосы находится на длине волны: 425 - 431 нм. В области 620-680 нм деоксигемоглобин поглощает свет во много раз сильнее, чем оксигемоглобин. В ближней инфракрасной области спектра деоксигемоглобин имеет полосу с максимумом при 910 нм.

Спектральные свойства метгемоглобина зависят от рН среды. При рН \approx 7 метгемоглобин находится в кислой форме. Спектр поглощения характеризуется узкой полосой с максимумом при 500 нм, широкой - в области 630 нм и интенсивной полосой Соре в интервале 405-407 нм. В области 540-570 нм имеются два перегиба кривой поглощения. При рН 7.4 20% всего метгемоглобина составляет щелочной метгемоглобин. При увеличении рН спектр постепенно меняется: исчезает полоса с максимумом при 630 нм, заменяясь неотчетливым перегибом при 600 нм, в желто-зеленой области появляются две полосы поглощения с максимумами на 577 и 540 нм.

Максимум полосы Soret смещается к 411 нм. Щелочные растворы метгемоглобина имеют максимумы при 417, 540 и 578 нм, положение которых незначительно отличается от оксигемоглобиновых, но их интенсивность значительно ниже. После рН 9.4 увеличение рН приводит к исчезновению полос с максимумами при 577 нм и 540 нм.

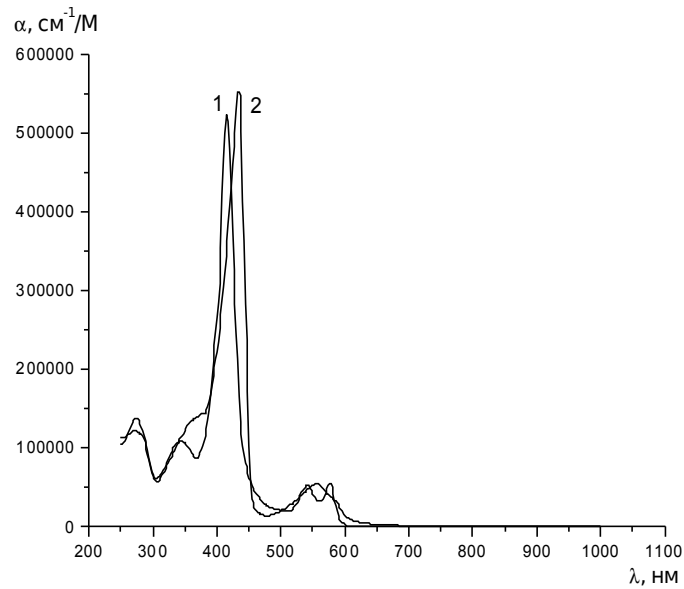


Рисунок1. Спектральная зависимость молярного коэффициента поглощения гемоглобина. Шкала линейная. : 1 – оксигенированная форма, 2 – деоксигенированная.

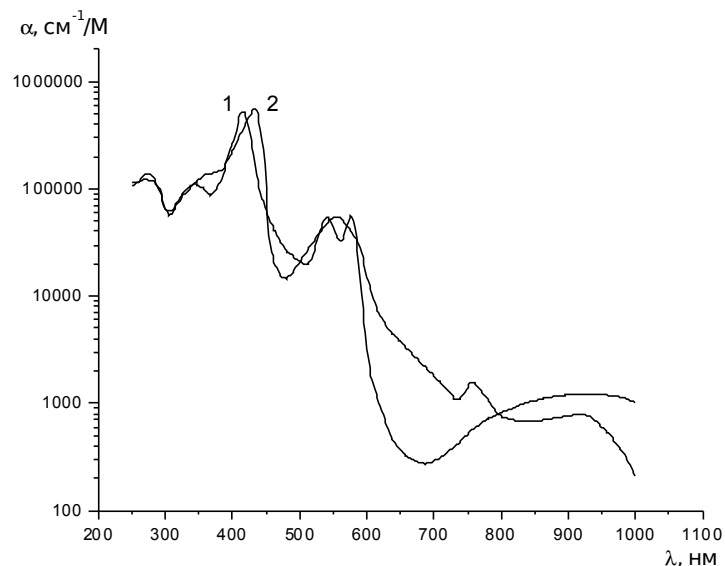


Рисунок2. Спектральная зависимость молярного коэффициента поглощения гемоглобина. Шкала логарифмическая: 1 – оксигенированная форма, 2 – деоксигенированная.

Поглощение света белками в области 240-300 нм обусловлено, главным образом, ароматическими аминокислотами - триптофаном, тирозином и фенилаланином (рис.3). Спектральные свойства триптофана определяются его индольным кольцом. Триптофан имеет две полосы поглощения - в области 218 и 280 нм. Молярный коэффициент поглощения этой аминокислоты в четыре раза больше, чем тирозина, и почти в тридцать раз больше, чем фенилаланина. Спектр поглощения тирозина обусловлен его фенольным кольцом. Максимумы находятся при 222 и 275 нм. Спектральные свойства фенилаланина определяются бензольным ядром. Спектр характеризуется максимумом при 257 нм. Меньший вклад в поглощение белков вносит гистидин.

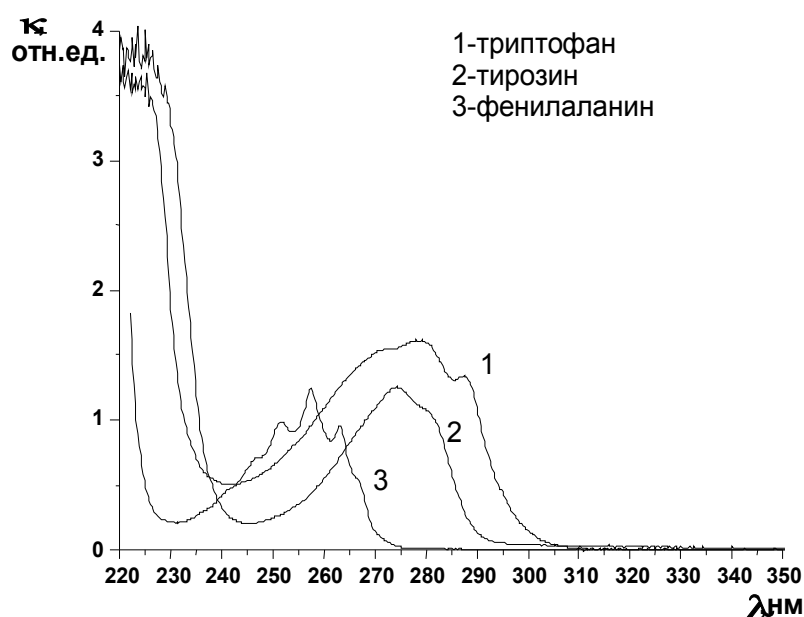


Рисунок3. Спектры поглощения ароматических аминокислот.

Свет в области 210 нм, поглощают гистидин (рис.4) и серосодержащие аминокислоты - цистин, цистеин и метионин.

Для большинства порфиринов характерно наличие четырех полос поглощения в видимой области спектра и более интенсивной полосы Core с максимумом около 400 нм. Раствор протопорфирина IX в эфире обнаруживает полосы поглощения с максимумами при 403 (полоса Core), 504 (I), 535 (II), 575 (III) и 633 нм (IV). Копропорфирин III (растворитель - эфир) - при 392 (полоса Core), 495 (I) 528 (II), 568 (III) и 623 нм (IV). Считается, что полоса Core и полосы I и III обусловлены электронными переходами. Полосы II и IV имеют колебательное происхождение.

Для окисленных форм никотинамидных коферментов НАД и НАДФ характерна интенсивная полоса поглощения с максимумом при 260 нм. Переход в восстановленную форму (НАД-Н, рис. 5) сопровождается появлением широкой полосы с максимумом при 340 нм, а интенсивность первой полосы немного уменьшается. Максимум спектра при 260 нм связан с наличием пуринового и пиридинового колец, второй максимум при 340 нм обусловлен восстановлением кольца амида никотиновой кислоты.

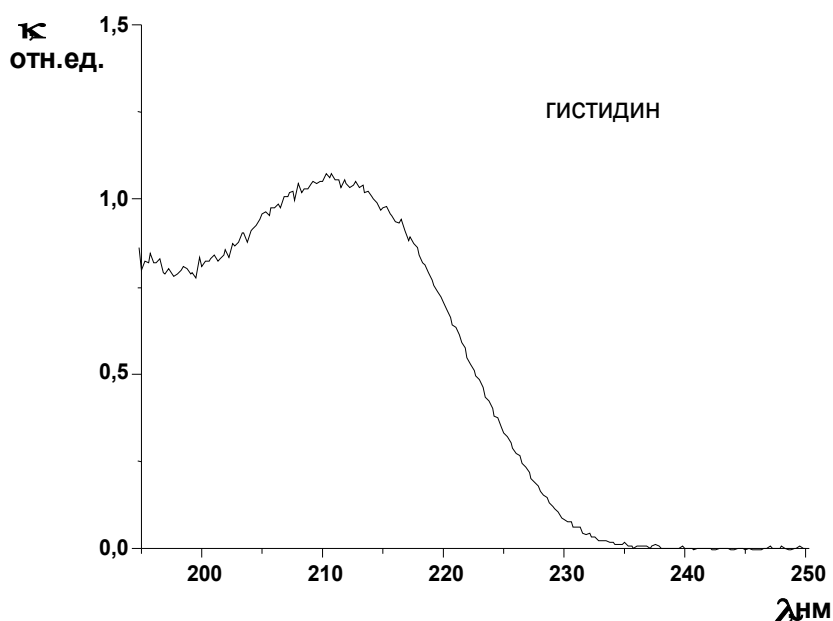


Рисунок4. Спектр поглощения гистидина.

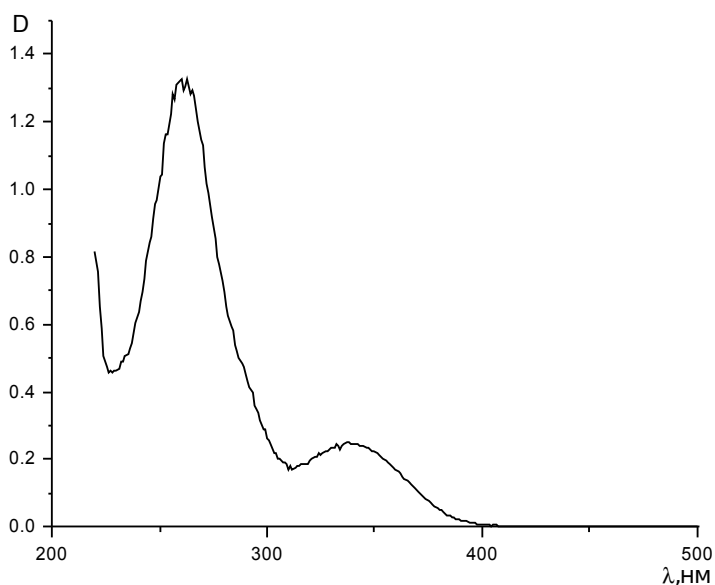


Рисунок5. Спектр поглощения НАД-Н

При регистрации спектров поглощения биологических образцов необходимо учитывать поглощение света водой, находящейся в образце. Даже при двухлучевой спектрофотометрии, когда в образце сравнения содержится такое же количество воды, возможны искажения спектров. Это происходит в тех случаях, когда, в результате поглощения света водой, количество прошедшего через кювету света настолько мало (рис.6), что становятся существенными погрешности прибора.

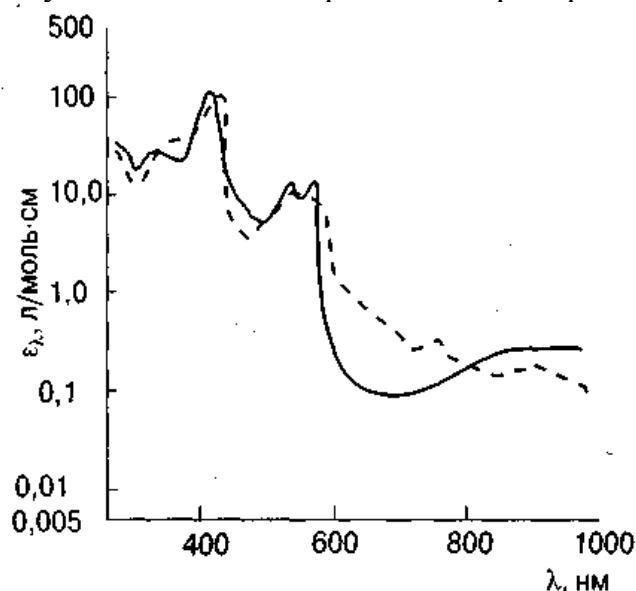


Рис. 11. Спектр пропускания воды.

Можно привести следующие примеры, использования спектрофотометрии в биологии и медицине.

1. Измерение концентрации белков и нуклеиновых кислот
2. Оценка кровоснабжения тканей на основе измерений степени оксигенации гемоглобина.
3. Измерение рН среды с помощью веществ, изменяющих спектр поглощения с изменением рН.
4. Определение концентрации различных лекарственных средств, имеющих характерные спектры поглощения (рутин, берберин).
5. Отслеживание динамики размножения микроорганизмов по изменению оптической плотности среды, в которой они находятся.

Определение концентрации лекарственных средств в препаратах важно для контроля, как эффективности исследуемого препарата, так и устранения возможности передозировки при лечении. Высокая биологическая активность многих препаратов обуславливает применение

их в малых дозах. В то же время особенность технологии изготовления таблеток заключается в том, что при малом содержании действующих веществ наряду с обычными вспомогательными веществами, обеспечивающими свойства прессуемости и распадаемости таблеток, вводятся наполнители с той целью, чтобы получить таблетки необходимой средней массы. Это приводит к такому изменению количественного соотношения между действующими и вспомогательными веществами, что возможно неравномерное смешивание и значительное колебание действующего вещества в отдельной дозе одной серии. В то же время даже незначительное отклонение в дозах может привести к заметному отклонению терапевтического эффекта. В данной работе предлагается измерить концентрацию левомецетина.

Определение концентрации вещества возможно двумя различными спектрофотометрическими методами:

1. Измерение при помощи эталонов. Для этого необходимо иметь эталонные образцы химически чистого исследуемого вещества с известной массой. Приготавливая растворы данного вещества с различной концентрацией и, измеряя оптическую плотность данных растворов в максимуме полосы поглощения, строят зависимость оптической плотности от концентрации. Ввиду аддитивности коэффициентов поглощения точные измерения концентрации вещества возможны только в области линейности данной зависимости. Возникновение отклонения от линейности свидетельствует от том, что в растворе происходят процессы, искажающие данные (химическое взаимодействие веществ, образование димеров, другие концентрационные эффекты). Далее, приготовив раствор исследуемого препарата и измерив его оптическую плотность, определяют концентрацию анализируемого вещества в растворе, а, умножив данную концентрацию на объем приготовленного раствора, массу данного вещества в таблетке.
2. Измерение при помощи табличных значений удельного показателя поглощения.

В спектрофотометрии более обоснованным является использование стандартных образцов (эталонных), которые нивелируют погрешности градуировки путем совмещения в одном опыте анализа и градуировки, что приводит к повышению точности и воспроизводимости результатов анализа.

В связи с тем, что левомецетин находит применение только в медицинской практике, стандартный образец этого препарата применяется только в фармацевтическом анализе. Выпуск стандартного образца для этого вещества является дорогостоящим. В этом случае возможна замена стандартного образца состава (лекарственного вещества) на стандартный образец свойств (внешний стандарт). В качестве внешних стандартов обычно используют устойчивые неорганические соединения. В результате многочисленных экспериментов была разработана теоретическая концепция выбора внешних стандартов. Установлено, что приемлемым может оказаться тот внешний стандарт, для которого выполняется условие: разница между максимумом поглощения внешнего стандарта и максимумом поглощения анализируемого лекарственного вещества (аналитической длиной волны) не должна превышать половины полуширины полосы поглощения стандартного образца. На основании экспериментальных данных стандартом является хромат калия.

Хромат калия имеет пологий спектр поглощения и характеризуется наличием максимумов поглощения при 275нм и 373нм. Оптимальная область полосы поглощения, в которой хромат калия можно использовать в качестве стандартного образца свойств, определено, что для спектрофотометрического анализа левомецетина оптимальным внешним находится в интервале 267-279 и 357-386нм.

Для выбора необходимых условий спекрофотометрического определения левомецетина изучены его спектры поглощения в воде, 0,1М растворе щелочи и 0,1М растворе соляной кислоты. Левомецетин в данных растворителях имеет максимум поглощения при 278нм. Учитывая устойчивость хромата калия в щелочной среде, а также свойства и константу диссоциации левомецетина, определено, что оптимальным растворителем для спектрофотометрического анализа левомецетина и для хромата ккалия является 0,1М раствор гидроксида натрия.

Используя границы концентраций, в которых соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера и оптимальные условия спектрофотометрического определения, разработана унифицированная методика количественного анализа левомецетина. Сущность методики заключается в следующем: точную массу препарата (0,0500 г) помещают в мерную колбу вместимостью 100мл, растворяют в горячей воде и доводят водой до метки, перемешивают. Точно отмеренных 2мл раствора переносят в мерную

колбу вместимостью 50мл, доводят 0,1М раствором гидроксида натрия до метки, перемешиваю. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 278нм, относительно 0,1М раствора щелочи на спектрофотометре в кювете с длиной рабочего слоя 10мм. Параллельно измеряют оптическую плотность 0,006% щелочного раствора стандартного образца хромата калия .

Для расчета количественного содержания левомецетина в формулу вводили коэффициент пересчета. Относительная ошибка спектрофотометрического определения левомецетина в субстанции находится в пределах 0,5-1%, а в таблетках 1,0-2,2%. Таким образом, показана возможность использования оптических свойств левомецетина в анализе его лекарственных средств и разработана унифицированная методика спектрофотометрического определения левомецетина в субстанции и таблетках с использованием внешнего стандарта хромата калия.

ВЫПОЛНЕНИЕ РАБОТЫ

Ознакомиться с описанием на прибор, порядком включения прибора, границами видимого спектра, соответствием цвета и длины волны.

Задание 1. Измерить спектр поглощения красителя эозина в видимой части спектра и ароматической аминокислоты в ультрафиолетовой области.

По описанной выше методике измерить спектр поглощения эозина в видимой части спектра (450-650 нм) с шагом 2 нм. Результаты занести в таблицу:

Номер	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X, нм											
T, %											
D, отн. ед.											

Построить спектр поглощения эозина в координатах: оптическая плотность D (отн. ед.) — длина волны (нм).

По описанной выше методике измерить спектр поглощения ароматической аминокислоты в ультрафиолетовой области спектра (240-310 нм) с шагом 10 нм. Результаты занести в таблицу:

Номер	1	2	3	4	5	6	7	8
X, нм								
T, %								
D; отн. ед.								

Построить спектр поглощения ароматической кислоты **в** координатах: оптическая плотность **D** (отн. ед.) — длина волны (нм).

Провести анализ исследованного вещества, то есть определить исследованную ароматическую аминокислоту (качественный анализ) и ее концентрацию (количественный анализ), используя спектральные свойства ароматических кислот:

Аминокислоты	Молярный коэффициент поглощения ϵ_λ , л/ (моль см)	Положение максимума, нм
Фенилаланин	180	257
Тирозин	1380	275
Триптофан	5600	279,5

При определении молярной концентрации c вещества по формуле (3), используя измеренную величину оптической плотности **D**, учесть, что толщина кюветы составляет **1 см**.

Задание 2. Решить задачи.

Задача 1. Оптическая плотность раствора, содержащего вещество с молярной массой $M=423$ в концентрации $c = 32$ мкг/мл, составляет 0,27 при длине волны $\lambda = 540$ нм в кювете толщиной 1 см. Найти молярную концентрацию c [моль/л] и коэффициент молярного поглощения ϵ_λ для данного вещества.

Указание: при переводе концентраций из мкг/мл в моль/л воспользоваться соотношением: c [моль/л] = $10^{-3} c$ [мкг/мл]/ M . Для расчета величины ϵ_λ использовать формулу (3).

Задача 2. Оптическая плотность раствора, содержащего вещество с молярной массой $M=384$ в концентрации $c = 28$ мкг/мл, составляет 0,27 при длине волны $\lambda = 540$ нм в кювете длиной 2 см. Найти молярную концентрацию и коэффициент молярного поглощения ϵ_λ для данного вещества.

Задача 3. Имеется раствор аминокислоты триптофана, оптическая плотность которого при длине волны 280 нм составляет 0.5, и раствор тирозина, оптическая плотность которого для той же длины волны – 0.36. Какова оптическая плотность раствора той же толщины, если смешали по 1 мл каждого раствора? Считать, что молекулы этих веществ не взаимодействуют друг с другом.

Указание: при смешивании концентрация каждого вещества уменьшается в 2 раза, а оптические плотности складываются.

Задание 3. Определить концентрацию активного вещества в лекарственном препарате (таблетках)

На первом этапе эксперимента проверяется область линейности зависимости поглощения растворов левомецетина от его концентрации.

Точную массу препарата (0,0500 г) помещают в мерную колбу вместимостью 100мл, растворяют в горячей воде и доводят водой до метки, перемешивают. 2 мл раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят 0,1М раствором гидроксида натрия до метки, перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора при длине волны 278 нм, относительно 0,1М раствора щелочи на спектрофотометре в кювете с длиной рабочего слоя 10мм. Параллельно измеряют оптическую плотность 0,006% щелочного раствора стандартного образца хромата калия.

Результаты измерения представить в виде графиков.

Выполнение второго этапа: Используя границы концентраций, в которых соблюдается закон Бугера-Ламберта-Бера и оптимальные условия спектрофотометрического определения. Определить концентрацию левомецетина по формуле:

$$C=D/k(\text{г/мл})$$

Значение удельного показателя поглощения левомецетина k, равно 2,81(мл/г)

Относительная ошибка спектрофотометрического определения левомецетина в субстанции находится в пределах 0,5-1%, а в таблетках 1,0-2,2%.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

1. Изучить законы поглощения света как теоретическую основу спектрофотометрии.
2. Понять принципы применения спектрофотометрии в биологии, медицине и фармации.
3. Выработать умение проводить качественный и количественный анализ физиологически активных веществ методом абсорбционной спектрофотометрии.

ПОДГОТОВКА К РАБОТЕ

Изучить следующие вопросы:

1. Закон Бугера-Ламберта-Бера и физический смысл всех входящих в него величин.
2. Коэффициент пропускания вещества, оптическая плотность образца. Связь между этими величинами. Размерности величин, входящих в формулы для коэффициента пропускания и оптической плотности.
3. Принципиальная схема спектрофотометра, назначение отдельных блоков.
4. Оптическая схема спектрофотометра, ход лучей в нем, способ изменения длины волны, место расположения исследуемого образца.
5. Примеры применения абсорбционной спектрофотометрии в медицине и фармации.