

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

***СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ  
В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ***

Учебное пособие по специальностям 011000 – Химия,  
040500 – Фармация, 011600 - Биология

Воронеж  
2004

Утверждено научно-методическим советом химического факультета  
от 20.12.2003, протокол №7.

Авторы: Котова Д.Л., Крысанова Т.А., Елисеева Т.В.

Учебное пособие подготовлено на кафедре аналитической химии  
химического факультета Воронежского государственного университета.

Рекомендуется для студентов 3 курса химического факультета, 1 и 2  
курсов биологического и фармацевтического факультета, а также для  
дипломников, аспирантов, научных сотрудников, занимающихся  
выделением, разделением и определением аминокислот в водных  
растворах.

1.	Метод электронной спектроскопии	4
1.1.	Введение в электронную спектроскопию. Спектры поглощения	4
1.2.	Основной закон светопоглощения Бугера – Ламберта – Бера и причины отклонения от закона	6
2.	Аналитические возможности спектрофотометрии при исследовании растворов органических веществ	9
3.	Анализ современных представлений о структурных особенностях и природе взаимодействий в системе вода – аминокислота	20
3.1.	Физико-химические характеристики аминокислот	20
3.2.	Особенности структурных взаимодействий в системе вода – аминокислота	27
4.	Методы определения, выделения и разделения аминокислот	30
5.	Особенности спектрофотометрического определения аминокислот в водном растворе	33
6.	Выбор оптимальных условий спектрофотометрического определения аминокислот	36
7.	Литература	52

# 1. МЕТОД ЭЛЕКТРОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

## 1.1. Введение в электронную спектроскопию. Спектры поглощения

Частицы можно охарактеризовать по их способности поглощать или испускать излучение. Эта характеристика оказалась настолько важной, что в настоящее время существует раздел химии, называемый спектральный (спектроскопический) анализ. В основе последнего лежит изучение спектра электромагнитного излучения, которое поглощается или излучается анализируемым веществом. Спектральные методы анализа классифицируются по характеру взаимодействия электромагнитного излучения с веществом (эмиссионные и абсорбционные). Абсорбционный анализ, в свою очередь, классифицируется, с одной стороны, по типу используемой области электромагнитного излучения (спектрофотометрия в видимой и УФ - областях, ИК-спектроскопия), с другой – по типу поглощающих частиц (атомы и молекулы).

Электромагнитное излучение представляет собой вид энергии, которая распространяется с огромной скоростью. Эта энергия существует в многочисленных формах, из которых наиболее легко распознаются свет и тепловое излучение. Менее очевидно проявление рентгеновского, ультрафиолетового, микроволнового и радиоизлучения.

Электромагнитным спектром является графическая зависимость некоторого измеряемого свойства излучения как функция частоты излучения. Из спектра можно получить два вида важной информации. Во-первых, по виду спектра можно качественно идентифицировать химические частицы. Во-вторых, по значению измеряемого свойства излучения можно определить количество присутствующих химических частиц. Электромагнитный спектр охватывает огромную область длин волн или энергий. Основные области спектра, используемые в спектральном анализе [1]:

Интервал длин волн	Участок спектра
$10^{-4} \dots 0,1 \text{ нм}$ , или $10^{-13} \dots 10^{-10} \text{ м}$	$\gamma$ - излучение
$10^{-2} \dots 10 \text{ нм}$ , или $10^{-11} - 10^{-8} \text{ м}$	Рентгеновское излучение
$10 \dots 400 \text{ нм}$ , или $10^{-8} \dots 4 \cdot 10^{-7} \text{ м}$	Ультрафиолетовое излучение
$400 \dots 760 \text{ нм}$ , или $4 \cdot 10^{-7} \dots 7,6 \cdot 10^{-7} \text{ м}$	Видимый свет
$760 \dots 10^6 \text{ нм}$ , или $7,6 \cdot 10^{-7} \dots 10^{-3} \text{ м}$	Инфракрасное излучение
$10^{-3} \dots 1 \text{ м}$	Микроволны или СВЧ
$\lambda > 1 \text{ м}$	Радиоволны
$(1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м})$	

Фотон имеет определённую энергию и может вызывать переходы между квантовыми энергетическими состояниями в атомах, молекулах и

других химических частицах. Чтобы вызвать такой переход, энергия фотона должна быть равна разности между энергетическими состояниями, соответствующими данному переходу. Энергетические состояния разных химических частиц отличаются, поэтому можно ожидать, что изменения энергии, связанные с переходами, также будут различны. Это значит, что спектр каждого вещества будет строго индивидуальным, и его можно использовать для идентификации этого вещества. Фактически спектр отражает схему возможных переходов, которые имеют место между различными энергетическими состояниями химической частицы. Если измеряемый параметр в спектре может быть отнесён к числу переходов, спектр может быть использован для определения концентрации присутствующих частиц. Разделение спектра электромагнитного излучения на области обусловлено не только тем, что каждой области присущ свой тип перехода, но и различием спектральной аппаратуры, необходимой для проведения соответствующих измерений в каждой области. По этой причине спектральный анализ чрезвычайно разнообразен и включает несколько методов. Молекулярно-абсорбционные методы основаны на измерении уменьшения интенсивности электромагнитного излучения, прошедшего через анализируемое вещество. В зависимости от области оптического диапазона, способа измерения и ширины полосы измеряемого излучения различают следующие молекулярно-абсорбционные методы: колориметрию – сравнение окраски анализируемого и стандартного раствора вещества визуальным способом; фотометрию – измерение интенсивности светового потока, прошедшего через раствор вещества фотоэлектрическим способом; спектрофотометрию – измерение интенсивности монохроматического (определённой длины волны) светового потока, прошедшего через раствор вещества фотоэлектрическим способом. В зависимости от длины волны различают: спектрофотометрию в ультрафиолетовой (УФ), видимой (В) и инфракрасной (ИК) области спектра.

Возникновение спектров поглощения в УФ и видимой области спектра объясняется способностью электронов на некоторых орбиталях поглощать кванты света и переходить на более высокие энергетические уровни. Поэтому часто такие спектры называют электронными. В ИК-области кванты света поглощают отдельные функциональные группы, атомы которых при этом изменяют уровни своих колебательных и вращательных движений. ИК-спектры поэтому называют молекулярными (колебательными и вращательными) [2,3].

Свет поглощается раствором избирательно: при некоторых длинах волн светопоглощение происходит интенсивно, а при некоторых свет не поглощается. Интенсивно поглощаются кванты света, энергия которых ( $h\nu$ ) равна энергии возбуждения частицы и вероятность их поглощения больше нуля. Молярный коэффициент поглощения при этих частотах (или длинах волн) достигает больших значений. Распределение по частотам (или по длинам волн) значений молярного коэффициента поглощения

называется спектром поглощения. Обычно спектр поглощения выражают в виде графической зависимости абсорбционности ( $A$ ) или молярного коэффициента поглощения ( $\epsilon$ ) от частоты ( $\nu$ ) или длины волны ( $\lambda$ ) падающего света.

Наибольший интерес представляют следующие характеристики спектра: число максимумов (или полос поглощения) и их положение по шкале длин волн (или частот); высота максимума; форма полос поглощения.

Спектральные линии имеют различную форму и разную (и обязательно конечную) ширину, что обусловлено свойствами самой поглощающей системы и внешними условиями (температура, давление), а также размером входной щели регистрирующего спектрометра. Шириной щели называют ширину её контура при значении ординаты, равной  $\epsilon_{\max}/2$ . Причиной уширения линии является то, что энергетические уровни атомных и молекулярных систем всегда размыты. Существует три причины неопределённости положения энергетических уровней:

- 1) **столкновительное (ударное) или лоренцевское уширение.** Столкновение атомов и молекул вызывают деформацию электронных оболочек и возмущают энергетические уровни, по крайней мере, валентных электронов. Это уширение особенно характерно для видимой и УФ области спектра;
- 2) **доплеровское уширение.** В результате теплового движения излучающих частиц все спектральные линии испытывают доплеровское уширение;
- 3) **естественное уширение.** Даже если бы удалось абсолютно изолировать атомы и молекулы при очень низких температурах, энергетические уровни всё равно не имели бы нулевой ширины. Ширина уровней и ширина линии “покоящейся” атомной или молекулярной системы называется естественной шириной.

Таким образом, чем выше молярный коэффициент поглощения и меньше ширина полосы, тем более ценными химико-аналитическими свойствами обладает соединение, так как эти характеристики определяют предел обнаружения и селективность [3].

### ***1.2. Основной закон светопоглощения Бугера – Ламберта - Бера и причины отклонения от закона***

Основа спектрофотометрии – закон Бугера – Ламберта - Бера – закон ослабления монохроматического света при поглощении его слоем вещества может быть выражен в форме:

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon \times c \times l}, \quad (1)$$

или 
$$I/I_0 = 10^{-\epsilon \times c \times l}, \quad (2)$$

$$A = \epsilon \times c \times l, \quad (3)$$

где  $I_0$ ,  $I$  – интенсивности света до и после его прохождения через поглощающую среду (эти интенсивности сравнивают для учета потерь света на отражение и рассеяние);

$\epsilon$  – коэффициент поглощения света, зависящий от длины волны и природы вещества; при  $c = 1$  моль/л и  $l = 1$  см он называется **молярным коэффициентом поглощения** (единицы измерения – л/моль·см);

$c$  – концентрация вещества, поглощающего свет (моль/л);

$l$  – толщина светопоглощающего слоя (см);

$A$  – абсорбционность ( $A = -\lg I/I_0$ ).

Атом, ион или молекула, поглощая квант света, переходит в более высокое энергетическое состояние. Обычно это – переход с основного (невозбужденного) уровня на первый возбужденный энергетический уровень. Вследствие поглощения излучения при прохождении его через слой светопоглощающего вещества интенсивность излучения уменьшается и тем больше, чем выше концентрация светопоглощающего вещества.

В соответствии с уравнением (3) зависимость оптической плотности от концентрации отображается прямой линией, выходящей из начала координат (рис.1).

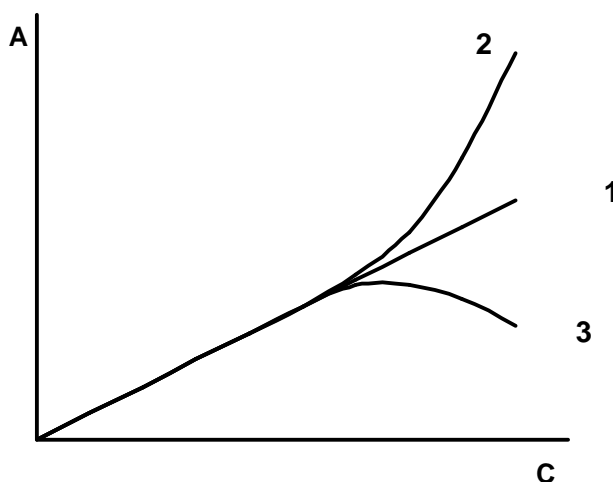


Рис.1. Зависимость абсорбционности от концентрации поглощающего свет вещества в растворе при соблюдении закона Бугера – Ламберта - Бера (1), положительных (2), и отрицательных (3) отклонениях от него

Линейная зависимость соблюдается не всегда. Поэтому, на практике закон Бугера-Ламберта-Бера необходимо применять со следующими ограничениями:

- 1) Закон справедлив для света строго определенной длины волны;
- 2) Температура при измерениях должна быть постоянной;
- 3) Коэффициент поглощения света ( $\epsilon$ ) зависит от показателя преломления среды (для того, чтобы показатели преломления исследуемого раствора и чистого растворителя оставались

- одинаковыми, измерения следует проводить в области мало концентрированных растворов);
- 4) Закон выполняется для частиц одной природы (измерение следует вести в таком интервале концентраций, где заведомо не может быть реакций диссоциации, ассоциации, флуоресценции и химических реакций с растворителем);
  - 5) Пучок света должен быть параллельным.

Если исследования проводят с гомогенной изотропной средой (толщина светопоглощающего слоя ( $l$ ) = const), то зависимость абсорбционности от концентрации отображается прямой линией. Значение тангенса угла наклона этой прямой равно коэффициенту поглощения света.

Отклонения от прямой возможны из-за химических реакций, приводящих к сдвигу химического равновесия, который, в свою очередь, вызывает изменение концентрации поглощающей формы вещества. К причинам отклонения прямой от линейности относится рассеяние поглощающего вещества в объеме объекта, которое наблюдается при спектрофотометрии биологических объектов со сложной пространственной структурой. Так же отклонения могут появляться из-за приборной ошибки, вызываемой нелинейностью зависимости тока фотоэлементов от интенсивности потока света при малых (менее 0,1) и больших (1,5) значениях абсорбционности раствора (эта опасность реальна в дальней ультрафиолетовой области 190 - 220 нм, где рассеянный свет вызывает сдвиг максимумов поглощения) [3].

Увеличение ширины щели спектрального прибора приводит к падению оптической плотности и показателя светопоглощения в максимумах спектральных линий и их увеличению в минимумах. Эти изменения мало заметны для веществ с широкими спектральными полосами. Необходимо, чтобы ширина щели была меньше полуширины спектральной полосы.

Если нельзя избежать отклонений от закона Бугера-Ламберта-Бера, изменяя условия анализа (аналитическую длину волны, растворитель, интервал концентраций), то выбирают область, где зависимость абсорбционности от концентрации линейна приближенно.

**На практике следует помнить об оптимальных условиях спектрофотометрического определения:**

- 1) при определении в растворе одного светопоглощающего вещества выбирают аналитическую длину волны на максимуме полосы поглощения. Если в спектре несколько полос, выбор останавливают на более интенсивной полосе, что обуславливает высокую чувствительность определения. Более предпочтительны плоские максимумы, так как погрешность в установлении длины волны здесь минимальна. Необходимо



учитывать, что чем уже полоса поглощения, тем меньше ее симметрия; чем в более коротковолновой области она расположена, тем больше ее немонохроматичность.

2) оптимальная абсорбционность составляет примерно 0,6...0,7 или несколько выше. Наибольшими погрешностями характеризуется абсорбционность растворов менее 0,05 и более 1,5;

3) в работе необходимо использовать кюветы с толщиной слоя меньше чем 5 см, что понизит потери на рассеяние света;

4) превращение определяемого компонента в окрашенное соединение определяет точность спектрофотометрического анализа. Такие соединения получают в результате реакций окисления - восстановления и комплексообразования. Если окислительно-восстановительные реакции протекают практически до конца, то реакции комплексообразования осложняют процесс спектрофотометрического определения вещества. Поэтому, используя эти реакции, нужно рассчитывать, при каких значениях рН и концентрации реагента будет достигнута необходимая полнота реакции.

## **2. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

Количественный и качественный анализ - традиционные области применения молекулярной спектроскопии. Спектрофотометрия в видимой и УФ – области спектра является одним из самых распространенных методов исследования органических соединений. Достоинствами метода являются быстрота, незначительное количество необходимого вещества и его сохранение в процессе анализа.

**Качественный анализ вещества** предполагает, во-первых, молекулярный анализ - обнаружение в веществе определенных молекул, во-вторых, структурный анализ – обнаружение отдельных структурных фрагментов и определение их взаимного расположения.

Положение и интенсивность полос поглощения вещества определяется содержащимися в нем хромофорными группами с сопряженными кратными связями. Поэтому идентификацию исследуемого вещества целесообразно проводить только при наличии в нем хромофорных групп. Так как интенсивность полос чувствительна к растворителю, идентифицировать вещество по электронному спектру можно только в том же растворителе, в котором получен сравниваемый спектр. Полосы в электронных спектрах различаются по интенсивности на несколько порядков, поэтому необходимо иметь в виду возможность присутствия светопоглощающих примесей.

Спектр исследуемого соединения сравнивают с приведенным в литературе спектром данного соединения или с полученным ранее спектром известного образца. О тождественности этих соединений может свидетельствовать наличие всей совокупности полос поглощения в обоих

спектрах с совпадающими с точностью до 1 нм положениями максимумов. Увеличение интенсивности отдельных максимумов может быть вызвано присутствием в растворе вещества, имеющего более протяженную цепь сопряженных связей. Присутствие в веществе примесей, не имеющих кратных связей, проявляется в уменьшении показателей поглощения вещества в исследуемом спектре. Этот же эффект наблюдается, если в молекуле имеется большая по объему и молекулярной массе группа атомов, не имеющих кратных связей и не влияющая на электронные свойства других групп [4].

*Следовательно, спектрофотометрия позволяет проводить идентификацию вещества по спектру в УФ - и видимой области спектра при наличии в нем сопряженных кратных связей и рассчитывать молекулярную массу поглощающего вещества.*

Молярный показатель поглощения постоянен для молекул, содержащих кратные связи, в то время как удельный показатель поглощения зависит от молекулярной массы вещества. Между абсорбционностью, показателем поглощения, толщиной слоя, концентраций и молекулярной массой вещества существует зависимость:

$$A = 1000 \cdot C \cdot \epsilon \cdot l / M \quad (4)$$

Из этого соотношения можно найти молекулярную массу поглощающего вещества с ошибкой определения данной величины, не превышающей 2 %.

*Также спектрофотометрия позволяет сравнивать электронные спектры с результатами квантово-механических расчетов и относить полосы к той или иной паре молекулярных орбиталей.*

Это наблюдается в тех случаях, когда внутримолекулярные взаимодействия в больших молекулах, к которым относятся лекарственные вещества, биостимуляторы, красители и другие соединения, настолько сильны, что относить полосы поглощения к отдельным функциональным группам и отождествлять их с определенным типом электронных переходов не имеет смысла.

Рассмотрим причины возможных изменений в электронных спектрах поглощения.

### 1. $\pi$ - $\pi$ Сопряжение в электронных спектрах

Взаимодействие электронов нескольких кратных связей, при котором образуется единое делокализованное  $\pi$  - электронное облако, охватывающее все атомы этой системы связей, называется  $\pi$ - $\pi$ -сопряжением. Основным доказательством сопряжения являются характерные изменения в электронном спектре поглощения. При сопряжении двух ненасыщенных групп полосы поглощения смещаются в длинноволновую сторону по сравнению с несопряженными хромофорами.

Длина волны полосы и её интенсивность возрастают по мере увеличения числа сопряженных групп.

Наиболее отчетливо химические эффекты  $\pi$ - $\pi$ -сопряжения проявляются в ароматических соединениях, содержащих циклические системы сопряженных двойных связей. Эти системы моделируются делокализацией  $\pi$  - электронов в замкнутых кольцах и успешно рассчитываются методами МО ЛКАО.

## 2. $p$ - $\pi$ -сопряжение в электронных спектрах

Взаимодействие неподеленных электронных пар с  $\pi$  - электронами, приводящее к образованию единого делокализованного электронного облака, называется  $p$ - $\pi$  - сопряжением. По аналогии с  $\pi$ - $\pi$ -сопряжением увеличение размеров единой электронной системы должно приводить к длинноволновому смещению и увеличению интенсивности полос поглощения.

Взаимодействие электронов тем больше, чем больше значение интеграла перекрывания соответствующих этим электронам орбиталей, которое существенно зависит от характера их гибридизации. Интеграл перекрывания  $p$ -и  $\pi$  - орбиталей тем больше, чем выше доля  $p$  - характера орбитали неподеленной пары. Поскольку тип гибридизации влияет на  $p$  -  $\pi$  - сопряжение, он влияет на его спектральные проявления.

В отличие от  $\pi$ - $\pi$ -сопряжения  $p$ - $\pi$ -сопряжение может быть подавлено различными способами, основанными на связывании неподеленной электронной пары и соответствующего исключения ее из  $p$ - $\pi$  взаимодействия. Так, электронные спектры поглощения  $p$  -  $\pi$  - сопряженных азотсодержащих соединений претерпевают существенные изменения даже в слабых растворах. Интенсивность соответствующих полос падает с ростом кислотности, и при некотором значении  $pH$  раствора полосы совсем исчезают, подтверждая тем самым участие электронов неподеленных пар в соответствующих переходах. Падение интенсивности является обратимым, при подщелачивании кислых растворов интенсивность исследуемой полосы возрастает.

## 3. Эффекты заместителей в электронных спектрах

Отождествление и идентификация веществ по электронным спектрам поглощения требует учета влияния непоглощающих замещающих групп на характеристики вещества. В органической химии принято изучать влияние замещающей группы на распределение электронов в молекуле с точки зрения индуктивного и мезомерного свойств группы, т.е. рассматривать индуктивный эффект и эффект сопряжения этой группы. Поскольку электронные спектры молекулы характеризуют изменение электронного распределения, естественно и влияние заместителей на спектральные

характеристики изучать то же с точки зрения индуктивного эффекта и эффекта сопряжения.

Индуктивный эффект заместителя представляет собой результат влияния потенциального поля заместителя на  $\pi$ -электроны незамещенной молекулы. В этом случае несущественна детальная электронная структура заместителя, важна лишь зависимость возмущающего потенциала от этой структуры. Эффект сопряжения определяется как способность электронов заместителя распространяться на область, в которой делокализованы  $\pi$ -электроны молекулы. Очевидно, вероятность такого распределения зависит от энергии, формы и размеров орбиталей заместителя, так что необходимо знать его детальное строение. Таким образом, эффект  $p$ - $\pi$ -сопряжения является частным случаем мезомерного эффекта. Действие заместителя можно рассматривать как возмущение  $\pi$ -электронной системы незамещенной молекулы.

Введение заместителей в бензольное кольцо вызывает длинноволновое смещение полосы перехода  ${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1B_{2u}$  при 260 нм и увеличение его интенсивности. Естественно предположить, что эффект сопряжения должен расти с ростом числа одинаковых заместителей, индуктивный же эффект определяется числом и взаимным расположением заместителей.

По отношению к ненасыщенному углеводороду заместители могут быть классифицированы как доноры и акцепторы электронов, доноры занимают орбитали  $\pi$ -симметрии относительно более высокой энергии. Сила донора увеличивается по мере уменьшения потенциала ионизации заместителя. Например, группы  $-N(CH_3)_2$ ,  $-NH_2$  и  $-O^-$  имеют низкие потенциалы ионизации и являются сильными донорами,  $-OH$  и  $-OCH_3$  – умеренно сильными, алкидные группы и легкие галогены имеют высокие потенциалы ионизации и являются слабыми донорами. Акцепторы имеют низколежащие вакантные орбитали, сила акцептора увеличивается, если увеличивается сродство к электрону заместителя. Обычно акцепторы имеют ненасыщенные связи ( $NO_2$ ,  $COOH$ ,  $CONH_2$ ,  $=C=O$ ,  $=C=N-$ ).

Одна и та же группа (например  $-CH=CH_2$ ) может проявлять как донорные, так и акцепторные свойства в равной степени или с преобладанием одного из них [5].

**Количественный спектрофотометрический анализ** основан на законе Бугера – Ламберта – Бера и сводится к определению концентрации вещества в растворе по абсорбционности стандарта (вещества с известной концентрацией) и исследуемого образца при некоторой длине волны.

Спектрофотометрический метод позволяет *определить несколько светопоглощающих органических веществ в одном растворе без предварительного разделения*. Частный случай такой системы – анализ смеси двух окрашенных веществ. Для этого используется принцип аддитивности, предложенный К.Фирордтом (*абсорбционность  $m$  – соединений, подчиняющихся основному закону светопоглощения и не*

*вступающих в химическое взаимодействие друг с другом, равна сумме абсорбционностей каждого из соединений):*

$$A = e_1 \times c_1 \times l + e_2 \times c_2 \times l + e_m \times c_m \times l = l \sum_{i=1}^m \epsilon_i \cdot c_i \quad (5)$$

Длины волн, при которых следует проводить измерения оптической плотности, следует выбирать по спектрам поглощения анализируемых веществ, применяя различные приемы, например, метод максимальных разностей. Сначала снимают спектры поглощения определяемых компонентов, затем строят график зависимости разницы коэффициентов светопоглощения от длины волны и находят области максимума и минимума. Длины волн, соответствующие этим областям, выбирают как аналитические. Часто эти области совпадают с областью максимального поглощения каждого из компонентов. Молярные коэффициенты поглощения определяются заранее, поэтому анализ сводится к определению абсорбционности при двух выбранных длинах волн.

Особый интерес представляют спектральные участки, в которых одно из органических веществ не поглощает свет, а другое обладает интенсивным светопоглощением. При наличии такой области повышается точность определения интенсивно поглощающего свет вещества.

Если для одного компонента закон Бугера-Ламберта-Бера не выполняется, то уравнение Фирордта (5) справедливо для смеси с постоянной концентрацией этого элемента. Проверка принципа аддитивности абсорбционности может быть проведена сравнением найденных абсорбционностей для ряда смесей известного состава со значениями абсорбционностей, вычисленными по уравнению Фирордта.

Правильность спектрофотометрических данных можно оценить по результатам исследования стандартов. Эталон абсорбционности за рубежом является раствор 0,06 г/л  $K_2Cr_2O_7$  в 0,005 М  $H_2SO_4$  (область 235-350 нм). Следует учитывать погрешности отсчета по шкале длин волн, которые составляют до 0,7 % и кюветные погрешности – 0,05-0,2 %. Рабочий интервал абсорбционностей растворов составляет 0,2 – 1,5. Величина предела обнаружения зависит от погрешности фона и определяется аналитическим сигналом, превышение которого не должно служить мерой фактической концентрации вещества в растворе.

*Спектрофотометрическим методом можно определять концентрации в интервале  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$  моль/л, так как молярные коэффициенты поглощения обычно лежат в интервале  $10^3$  -  $4 \times 10^3$  л/моль·см. Максимальные молярные коэффициенты светопоглощения для органических соединений составляют  $1,5 \times 10^5$  л/моль·см. Показатель поглощения  $\epsilon$  определяется с точностью 1-5 % [6].*

**Спектрофотометрический метод позволяет исследовать протолитические реакции и определять рК кислоты (константу ионизации кислоты).**

Простейшим случаем изучения равновесия является количественный анализ двух одновременно присутствующих в растворе форм вещества. При изменении общей концентрации поглощающих веществ экспериментатор активно вмешивается в установление равновесия.

Спектры поглощения органических соединений, представляющих собой кислоты или основания, зависят от рН среды. Это вызвано тем, что спектры ионов отличаются от спектров нейтральных молекул.

Ионизацию кислоты НА ( $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ ) можно охарактеризовать термодинамической константой ионизации этой кислоты:

$$K_A = \frac{a_{H^+} \cdot a_{A^-}}{a_{HA}} \quad (6)$$

или после логарифмирования:

$$pK_A = pH - \lg \frac{a_A}{a_{HA}} \quad (7)$$

Для определения константы ионизации или константы основности необходимо знать отношение активностей кислоты и сопряженного с ней основания и наоборот. Спектрофотометрический метод используется, чтобы найти это соотношение (чаще для определения констант основности). Главное условие его применения – различное поглощение протонированного основания и его непротонированной формы.

При спектрофотометрическом определении  $pK_A$  кислоты предполагается, что величины рН растворов заранее известны и необходимо найти именно  $a_A$  и  $a_{HA}$ . Для этого снимают спектры исследуемого вещества в ряде буферных растворов (концентрация буфера 0,01 – 0,10 моль/л) с разными значениями рН (от 2 до 11) при постоянной толщине кювет и постоянной суммарной концентрации НА и А (то есть к одинаковому объему буфера с разным рН добавляют одинаковое исходное количество НА или А).

Исходя из уравнения:

$$\frac{a_{HA}}{a_A} = \frac{A_A - A}{A - A_{HA}}, \quad (8)$$

где А – абсорбционность анализируемого раствора, можно рассчитать  $pK_A$ :

$$pK_A = pH + \lg \frac{A_A - A}{A - A_{HA}} \quad (9)$$

Зависимость абсорбционности от рН раствора в общем виде выражается следующим образом:

$$A = \frac{A_A \cdot 10^{-pK_A} + A_{HA} \cdot 10^{-pH}}{10^{-pK_A} + 10^{-pH}} \quad (10)$$

Уравнение (10) справедливо для любой длины волны и является основным для проведения спектрофотометрических определений  $pK_A$ . Для вычисления данной величины необходимо знать показатель поглощения кислоты (основания) при какой-либо длине волны, показатель поглощения сопряженного основания (кислоты) при той же длине волны и абсорбционность раствора известной концентрации с известным значением рН (при той же длине волны).

В тех случаях, когда одна из форм преобладает в растворе, его поглощение от рН не зависит (для разбавленных растворов рН раствора принимается равным рН растворителя). Абсорбционность зависит от рН только в узкой области, где концентрации форм сравнимы друг с другом. Для измерения  $pK_A$  спектрофотометрическим методом рН раствора следует изменять в пределах  $pK_A + 2 \geq pH \geq pK_A - 2$ .

Для спектрофотометрического определения  $pK_A$  следует учитывать следующие допущения: реакция ионизации должна протекать без побочных процессов; коэффициенты светопоглощения каждой из кислотно-основных форм должны быть независимы от рН и различаться в рассматриваемой области спектра; должна определяться абсорбционность растворов, содержащих одну из кислотно-основных форм. Спектрофотометрический метод является единственно доступным при исследовании очень слабых оснований, сопряженные кислоты которых имеют  $pK_A < 1 - 2$ , когда потенциометрическое титрование невозможно [6,7].

***На основании данных спектрофотометрического определения можно рассчитать концентрацию вещества, которое находится в растворе в присутствии поглощающей примеси с неизвестными характеристиками.***

В этом случае абсорбционность выражается следующим образом:

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l + A_{\text{примеси}} \quad (11)$$

Предполагается, что ход зависимости  $\varepsilon$  от длины волны ( $\lambda$ ) известен. Наиболее распространен случай, когда спектральный ход поглощения примеси можно изобразить прямой линией:

$$A_{\text{примеси}} = a + b \cdot \lambda \quad (12)$$

При этом используют метод "базисной линии" - на кривой зависимости  $A$  от длины волны соединяют отрезком прямой линии соседние с исследуемым максимумом минимумы (рис.2).

Концентрацию вещества можно рассчитать по формуле (13), предполагая, что его поглощение при  $\lambda_A$  и  $\lambda_B = 0$ .

$$C = A_{LM} / \varepsilon l, \quad (13)$$

где  $A_{LM} = A_L - A_M$ .

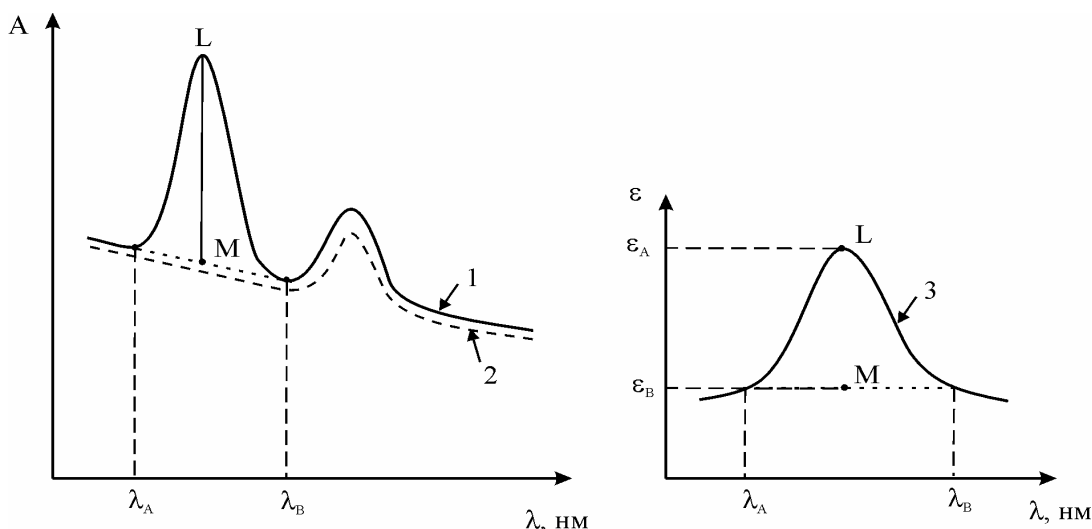


Рис.2 Вычисление концентрации вещества в присутствии поглощающей смеси. 1 – экспериментальная кривая; 2 – кривая поглощения примеси; 3 – зависимость  $\varepsilon$  от  $\lambda$

**Спектрофотометрический анализ применяется при исследовании комплексов различного типа, если комплексообразование сопровождается изменением спектральных характеристик.** Преимущество метода – возможность изучения комплексов без выделения их из раствора.

Существует ряд комплексов, образование которых сопровождается появлением в спектре новых полос, отсутствующих у неассоциированных молекул. Этим свойством обладают координационные комплексы переходных металлов, окраска которых обусловлена изменением симметрии иона металла под влиянием молекул лигандов и появлением запрещенных для невозмущенного иона переходов. Эти новые полосы присущи только комплексу и являются доказательством его существования [6].

Мерой содержания комплекса в растворе является абсорбционность при длине волны, соответствующей полосе поглощения комплексного соединения. Если один (A) или два компонента (A и D) поглощают при этой же длине волны, то мерой содержания комплекса будет разность



между наблюдаемой абсорбционностью и вычисленной по значениям коэффициентов экстинкции и концентрации компонентов:

$$\Delta A = A_{\text{набл.}} - (\epsilon_A \cdot C_A + \epsilon_D \cdot C_D) \quad (14)$$

**Спектрофотометрический метод дает возможность определить константу устойчивости комплекса**, которую легко вычислить, зная абсорбционность при длине волны поглощения комплекса и показатель поглощения [6].

$$K_p = \frac{\Delta A}{l \cdot e_K (C_A^0 - m \frac{\Delta A}{l \cdot e_K})^m \cdot (C_D^0 - n \frac{\Delta A}{l \cdot e_K})^n}, \quad (15)$$

где  $C_A^0, C_D^0$  - исходные концентрации компонентов;  $e_K$  - показатель поглощения комплекса;  $m, n$  - стехиометрические коэффициенты в уравнении образования комплекса.

**Значения  $e_K$  можно определить**, измерив абсорбционность двух растворов с разным соотношением компонентов. На практике применяют частные случаи определения свойств комплексов простого состава.

Для молекулярных комплексов состава 1:1 выражение (15) можно переписать в виде:

$$K_p = \frac{[AD]}{(C_A^0 - [AD]) \cdot C_D^0}, \quad (16)$$

где  $[AD] = A^\lambda / (\epsilon^\lambda \cdot l^\lambda)$ .

Скомбинировав два уравнения, получим:

$$\frac{C_A^0 \cdot l}{A^\lambda} = \frac{1}{e^\lambda} + \frac{1}{K_p \cdot e^\lambda} \cdot \frac{1}{C_D^0} \quad (17)$$

Графическая зависимость величины обратной абсорбционности раствора, умноженной на концентрацию компонента А и на толщину слоя, от величины обратной концентрации компонента D выражается прямой линией. Отрезок, отсекаемый этой прямой на оси ординат, дает величину, обратную показателю поглощения комплекса, а тангенс угла наклона прямой равен  $\frac{1}{K_p \cdot e^\lambda}$ . Определив показатель поглощения, можно найти  $K_p$ .

Величину  $K_p$  можно найти и по точке пересечения с осью абсцисс. В этой точке уравнение (17) выглядит так:

$$0 = \frac{1}{e^I} + \frac{1}{e^I \cdot K_p (C_D^0)_0} \quad (18)$$

Откуда  $K_p = -1 / (C_D^0)_0$  (рис.3).

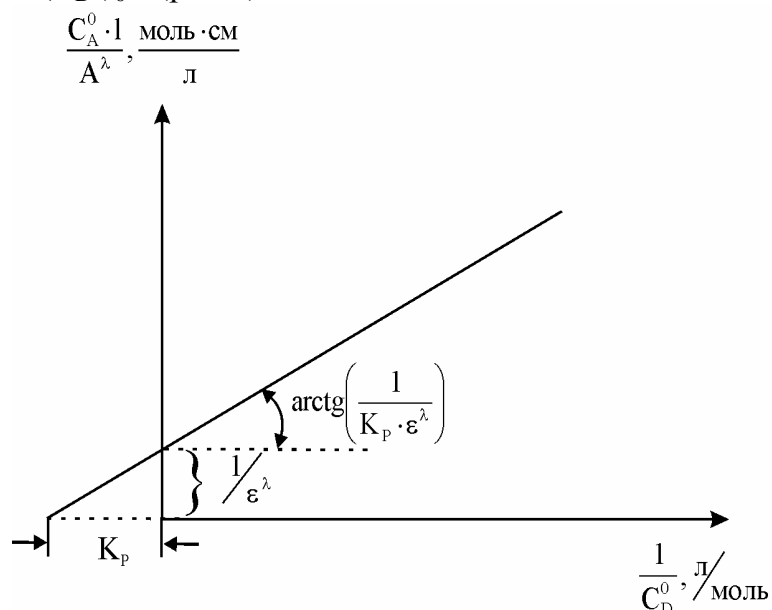


Рис.3. Определение константы устойчивости комплексного соединения

**Спектрофотометрический метод применяется и при изучении характеристик химической реакции.**

Количественное изучение химической реакции (19) предполагает экспериментальное определение скорости ее протекания, константы равновесия и изменения энтропии, энтальпии, энергии Гиббса системы.



где А, В – исходные реагенты, М, Н – конечные реагенты или продукты реакции; а, б, м, н – стехиометрические коэффициенты.

Степень протекания реакции - x (или степень превращения) определяется соотношением:

$$n_A = n_A^0 + ax,$$

где  $n_A^0$  – начальное число моль вещества А,  $n_A$  – число моль в более поздний момент.

Скорость реакции выражается как скорость изменения величины x:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{a} \cdot \frac{dn_A}{dt}$$

Определенная таким образом скорость реакции не зависит от выбора реагента, этим выражением можно пользоваться при изменении объема или фазы.

Если объем системы не меняется в ходе реакции и можно пренебречь присутствием промежуточных соединений, то скорость химической реакции определяется как скорость исчезновения одного из реагирующих веществ или появления одного из продуктов реакции.

$$J = -\frac{dC_A}{dt} = k_r \cdot C_A^a, \quad (20)$$

где  $k_r$  - константа скорости реакции.

При исследовании скорости реакции измеряют изменение концентрации исходных и конечных продуктов во времени и выражают скорость реакции через концентрации реагентов и других соединений, присутствующих в системе (катализаторов, буферных веществ и др.). Если реакция (19) обратима, она характеризуется константой равновесия  $K_p$ , которая определяется отношением констант прямой и обратной реакций. Зависимость  $K_p$  от температуры дает возможность рассчитать термодинамические характеристики реакции, а зависимость от температуры скорости реакции – энергию активации реакции.

Спектрофотометрический метод изучения кинетики реакции сводится к определению концентраций реагентов в зависимости от времени и температуры. При этом необходимо выполнение условий количественного абсорбционного анализа: соблюдение закона Бугера – Ламберта – Бера и отсутствие полного перекрывания полос поглощения исходных и конечных продуктов, постоянство температуры.

Если реакция проводится во внешнем реакторе, то через определенные промежутки времени необходимо отбирать пробы реакционной смеси и измерять их абсорбционность. Этот способ удобен для медленных реакций, а также когда реакция идет только при высоких температурах. Необходимо также, чтобы в кювете сравнения пропускание не изменялось во времени, поэтому можно использовать чистый растворитель в качестве эталона сравнения.

Спектрофотометрический метод дает возможность определить скорость реакции по изменению абсорбционности раствора без перехода к концентрациям компонентов. Для раствора, в котором идет реакция (19), абсорбционность в любой момент времени определяется следующим образом:

$$A = (e_A C_A + e_B C_B + e_M C_M + e_H C_H) \times l = [e_A (C_A^0 - ax) + e_B (C_B^0 - bx) + e_M (C_M^0 - mx) + \dots] \times l \quad (21)$$

Из уравнения (21) очевидно, что

$$\frac{dA}{dt} = P \frac{dx}{dt},$$

где  $P$  – константа,  $A$  – абсорбционность.

Таким образом, изменение абсорбционности в ходе химического процесса связано со скоростью реакции. Поэтому при кинетических спектрофотометрических измерениях находят абсорбционность в зависимости от времени и строят графики. Касательная к полученной кривой в каждый момент времени дает скорость реакции [6-8].

**При выполнении измерений в количественном спектральном анализе необходимо соблюдать следующий порядок измерений:**

- 1) Снимают полный спектр поглощения вещества, выбирают аналитическую длину волны на максимуме поглощения вещества, учитывая, что чем выше коэффициент поглощения, тем большие изменения абсорбционности соответствуют изменениям концентрации вещества и тем меньше влияние примесей;
- 2) Рассчитывают молярный коэффициент поглощения, определяют концентрацию стандарта и толщину кювет.
- 3) Готовят 5-7 стандартных растворов с известными концентрациями, измеряют их абсорбционности.
- 4) Строят график зависимости абсорбционности от концентрации при постоянной толщине кювет.
- 5) Определяют концентрацию исследуемого раствора по градуировочному графику.

### **3. АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ И ПРИРОДЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ ВОДА – АМИНОКИСЛОТА**

#### **3.1. Физико-химические характеристики аминокислот**

Аминокислоты являются амфотерными соединениями, способными диссоциировать как по основному, так и по кислотному типу. Учитывая гидратацию и диссоциацию функциональных групп, этот процесс можно представить в следующем виде [9]:



Таким образом, диссоциируя одновременно с отщеплением ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ , аминокислоты находятся в растворе в виде биполярных ионов. Наличие последних доказывается высокой температурой плавления

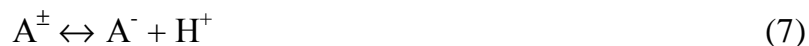
(200°C), легкостью кристаллизации аминокислот, хорошей растворимостью в воде по сравнению с менее полярными растворителями, а также высокими диэлектрическими постоянными и большими дипольными моментами, что свидетельствует о полном разделении положительного и отрицательного зарядов.

Кислотно-основные свойства аминокислот проще всего объясняются на основе теории Бренстеда - Лоури [9]. Согласно этой теории, кислотами считаются любые молекулы или ионы, которые могут отдавать протон – доноры протона, а основаниями - молекулы или ионы, способные принять протон – акцепторы протона. Кислота и основание являются сопряженной системой. Свойство кислотности или основности относительно, одно и то же вещество может проявлять себя и как кислота, и как основание в зависимости от условий химического взаимодействия.

Аминокислоты, содержащие две диссоциирующие группы, характеризуются двумя константами диссоциации  $K_1$  и  $K_2$ . При этом  $K_2$  характеризует диссоциацию основной группы, а  $K_1$  – кислотной группы. Диссоциацию аминокислот представляют в следующем виде [10]:



$$K_1 = [A^\pm] \cdot [H^+] / [A^+] \quad (6)$$



$$K_2 = [A^-] \cdot [H^+] / [A^\pm], \quad (8)$$

где  $A^+$  - катион аминокислоты;  $A^\pm$  - цвиттерион;  $A^-$  - анион аминокислоты.

Данная схема диссоциации аминокислот составлена на основе уточнения физической сущности процессов диссоциации цвиттерлитов, к которым относится большинство аминокислот. Цвиттерлиты в сильнокислых средах существуют в виде катионов, а в сильнощелочных – в виде анионов. В промежуточной области pH цвиттерлиты являются соединениями, существующими преимущественно в виде биполярных ионов, электрически нейтральных, образующих внутреннюю соль. Образование цвиттерионов обусловлено тем, что у цвиттерлитов кислотная и основная группы расположены близко друг к другу. Диссоциация основной группы ведет к появлению положительного заряда, который оттягивает электроны от карбоксильной группы, ослабляя связь протона карбоксильной группы и усиливая тем самым ее диссоциацию. Указанная диссоциация сопровождается переходом водорода к аминогруппе с образованием биполярных ионов.

В уравнении (5)  $A^+$  - донор протона;  $A^\pm$  - акцептор протона. В уравнении (7)  $A^\pm$  - донор протона;  $A^-$  - акцептор протона.

Логарифмируя (6) с обратным знаком и подставляя рН вместо  $-\lg[H^+]$  и рК вместо  $-\lg K_1$  получим:

$$pH = pK_1 - \lg([A^+]/[A^\pm]) \quad (9)$$

Изменив знак на обратный, получим:

$$pH = pK_1 + \lg([A^+]/[A^\pm]) \quad (10)$$

Уравнение (9) носит название Гендерсона – Хассельбаха.

Аналогично для уравнения (8):

$$pH = pK_2 - \lg([A^+]/[A^\pm]) \quad (11)$$

В общем виде уравнение Гендерсона – Хассельбаха, согласно теории Бренстеда, запишется:

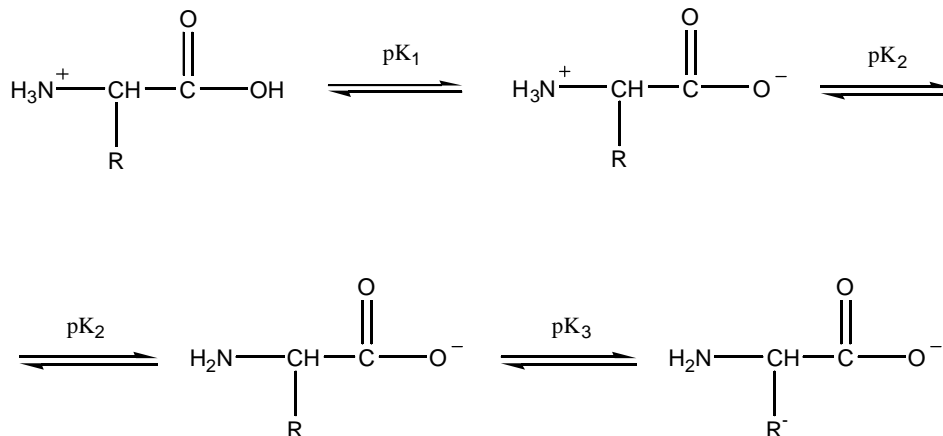
$$pH = pK + \lg([\text{акцептор } H^+]/[\text{донор } H^+]) \quad (12)$$

Кроме величин  $pK_1$  и  $pK_2$  для аминокислот характерно значение рН, при котором в растворе число катионов равно числу анионов - изоэлектрическая точка, обозначаемая рІ. В изоэлектрической точке максимальное количество аминокислоты находится в виде цвиттерионов. Для моноаминомонокарбоновых кислот величину рН в изоэлектрической точке можно определить из уравнения:

$$pI = (pK_1 + pK_2)/2 \quad (13)$$

Обычно рІ у аминокислот лежит около рН = 6. Если аминокислота имеет вторую карбоксильную группу, то ее изоэлектрическая точка смещена в область более низких значений рН, если вторую аминогруппу – в область более высоких значений рН.

Возможные перезарядки аминокислот описываются уравнениями:

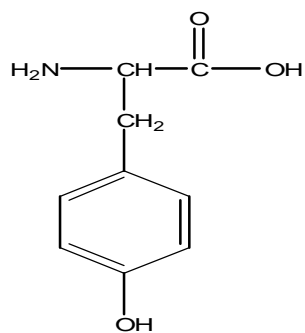


Необходимо отметить, что  $\alpha$ -COOH группы аминокислот обладают большей кислотностью ( $pK_1$  - от 1,7 до 2,6), чем карбоксильные группы соответствующих карбоновых кислот ( $pK$  уксусной и молочной кислот составляют 4,76 и 3,86). Это объясняется наличием положительного заряда у  $NH_3^+$ - группы, который оттягивает электроны от  $\alpha$  - COOH группы и усиливает её диссоциацию.

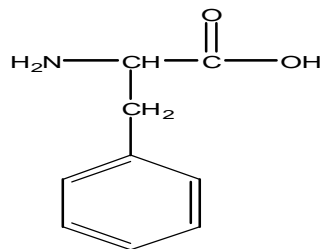
$\alpha$ -Аминогруппы моноаминомонокарбоновых кислот обладают более слабой основностью, чем аминогруппы соответствующих алифатических аминов [12]. Важным свойством растворов аминокислот является проявление ими буферной ёмкости, причём  $pH$  растворов несколько отличается у различных аминокислот. Максимальные значения буферной ёмкости обнаруживаются при значениях  $pH$  близких к величинам их  $pK_1$ , т.е. в интервале равном 1,3-3,3, и  $pH$  равном 8,6-10,6. Наличие в частицах аминокислот при различных  $pH$  ионизированных групп  $NH_3^+$ ,  $COO^-$ , полярных группировок - OH,  $NH_2$ , COOH и неполярных углеводородных фрагментов в боковых радикалах приводит к сложной картине гидратации. Общепринятым является, что при растворении цвиттерионов в воде наблюдается электрострикция по причине сильного электростатического притяжения ионизированными группами молекул воды, в результате чего происходит их уплотнение. Все аминокислоты как биполярные соединения обладают большими дипольными моментами. Дипольный момент цвиттериона аминокислот обычно составляет величину не меньше, чем 15 Дебай [13]. Общим свойством для всех аминокислот является образование водородных связей между амино- и карбоксильными группами. Для аминокислот, не имеющих активных групп в радикале, структурообразование идет между  $NH_2$ - и COOH- группами. Структуры такого типа имеют сложный характер, между их слоями действуют силы Ван-дер-Ваальса [8,13]. Для аминокислот, имеющих полярные группы в боковом радикале, независимо от размеров молекул, характерно образование трехмерной сетки водородных связей. В образовании таких структур принимают участие молекулы гидратной воды [14].

Рассмотрим исследуемые аминокислоты: *тирозин* (*Tyr*) ( $\alpha$  - амино -  $\beta$ - пара оксифенилпропионовая кислота), *фенилаланин* (*Phe*) ( $\alpha$ -амино- $\beta$ -фенилпропионовая кислота), а также такие аминокислоты, как: *триптофан* (*Trp*) ( $\alpha$  -амино- $\beta$ -индолилпропионовая кислота), *гистидин* (*His*) ( $\alpha$ -амино- $\beta$ -имидазолпропионовая кислота) и *цистеин* (*Cys*) ( $\alpha$ -амино- $\beta$ -меркаптопропионовая кислота) [11]. Их физико-химические характеристики представлены в таблице 1.

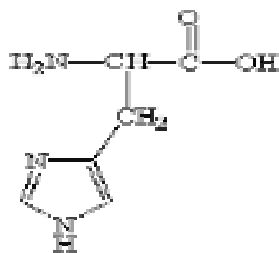
Tyr



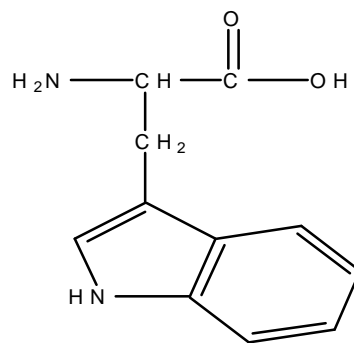
Phe



His



Trp



Cys

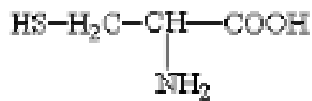


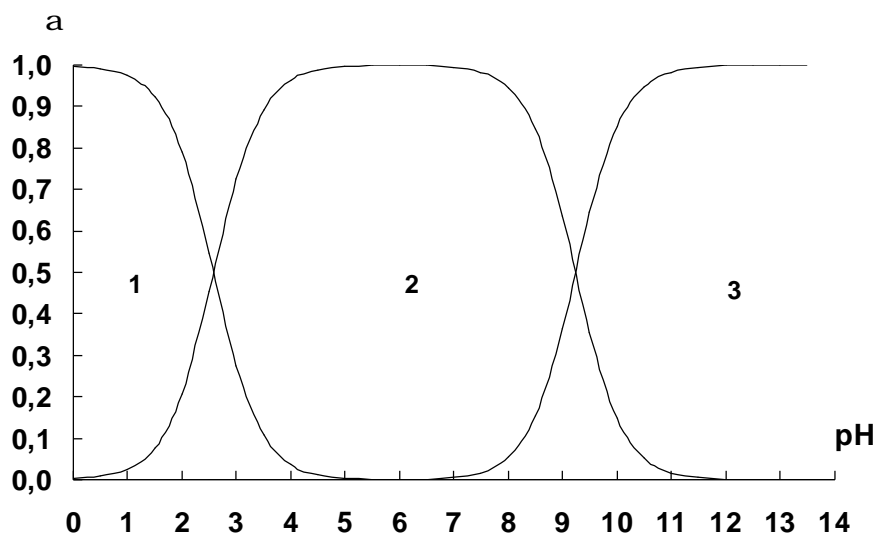
Таблица 1.

Физико-химические характеристики используемых аминокислот

Амино- кисло- та	$M_r$	Раствори- мость, г/100 г $H_2O$	$t_{пл}, ^\circ C$	$pI$	$pK_1$ α- COOH	$pK_2$ α- $NH_3^+$	$pK_3$ боко- вой цепи	$pK_4$ имид .
<b>Tyr</b>	181,2	0,05	310 (разл)	5,63	2,20	9,11	10,07	—
<b>Phe</b>	165,2	2,96	283	5,91	2,58	—	9,24	—
<b>Trp</b>	204,2	1,14	298	5,88	2,38	9,49	11,60	—
<b>His</b>	155,2	4,30	285	7,64	1,77	9,18	10,90	5,82
<b>Cys</b>	121,2	Хорошо раствор.	240	5,02	1,71	10,78	8,27	—

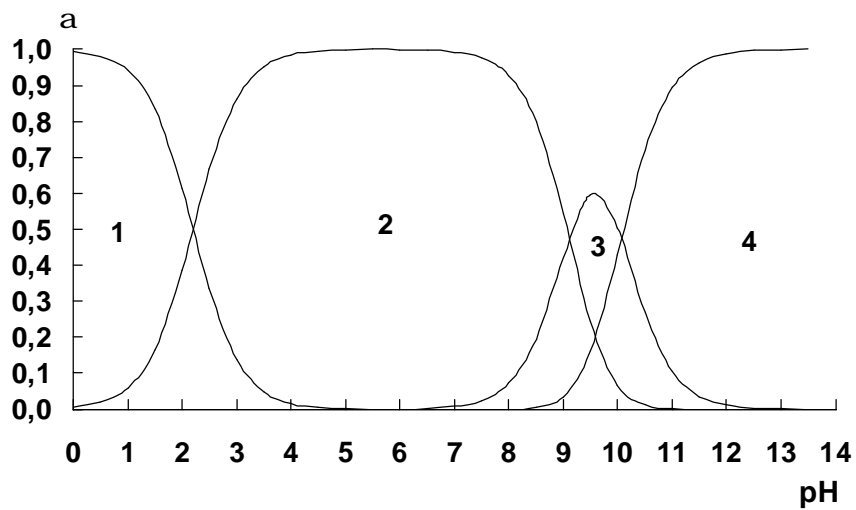


На основании констант диссоциации и уравнений материального баланса рассчитано содержание различных ионных форм ароматических и гетероциклических аминокислот в растворе при разных значениях pH (рис.4):



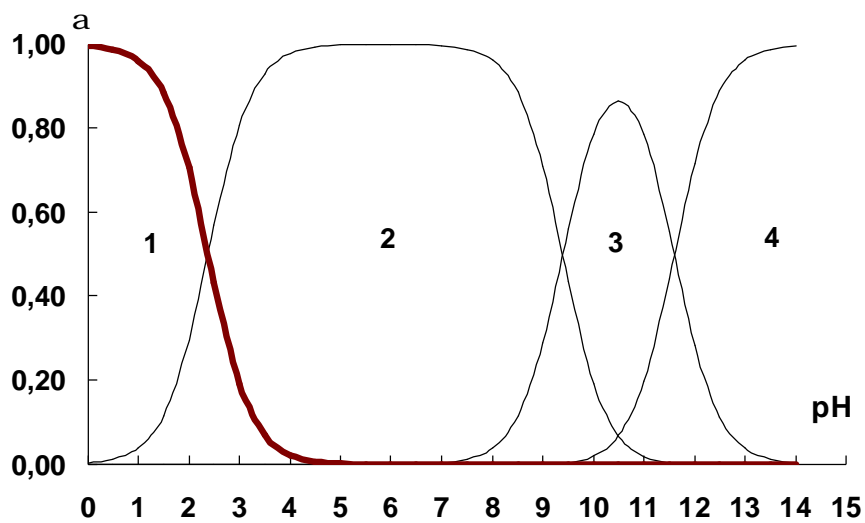
(a) Фенилаланин (Phe)

1 –  $\text{Phe}^+$       2 –  $\text{Phe}^\pm$       3 –  $\text{Phe}^-$



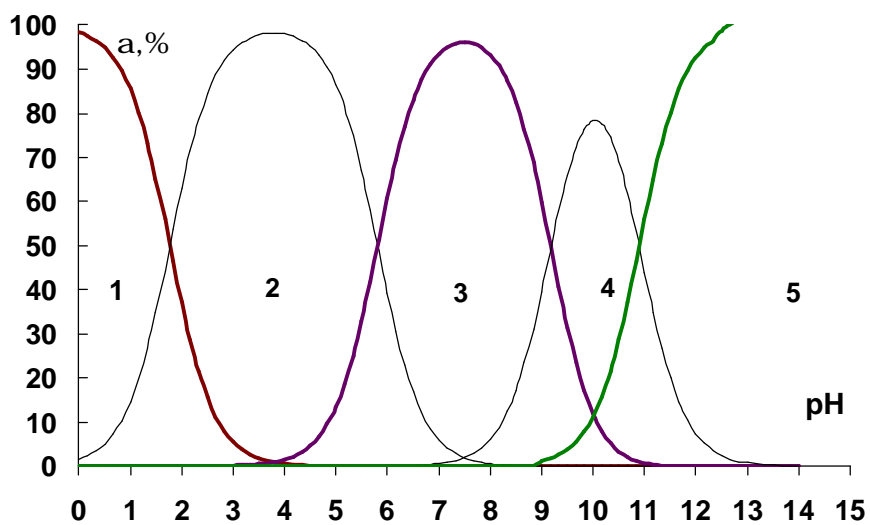
(б) Тирозин (Tyr)

1 –  $\text{Tyr}^+$     2 –  $\text{Tyr}^\pm$     3 –  $\text{Tyr}^-$     4 –  $\text{Tyr}^{2-}$



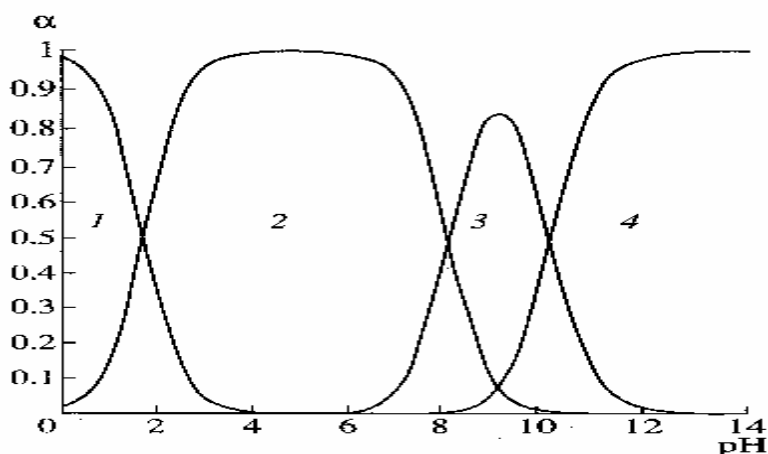
(в) Триптофан (Trp)

1 –  $\text{Trp}^+$     2 –  $\text{Trp}^\pm$     3 –  $\text{Trp}^-$     4 –  $\text{Trp}^{2-}$



(г) Гистидин (His)

1 –  $\text{His}^{2+}$     2 –  $\text{His}^+$     3 –  $\text{His}^\pm$     4 –  $\text{His}^-$     5 –  $\text{His}^{2-}$



(д) Цистеин (Cys)

1 –  $\text{Cys}^+$     2 –  $\text{Cys}^\pm$     3 –  $\text{Cys}^-$     4 –  $\text{Cys}^{2-}$

Рис. 4 (а-г) Диаграмма распределения ионных форм

Присутствие ароматического кольца обуславливает относительно низкую растворимость аминокислот (Phe – 30 г/л, Tyr – 0,45 г/л, Trp – 11 г/л при 293 К). Phe имеет неполярный радикал, Trp – индольный цикл, а Tyr – радикал с полярной гидроксильной группой, хотя эта группа легко отщепляет протон, тирозин оказывается слабо ионизированным при  $\text{pH} = 7$ . В твердом состоянии эти аминокислоты находятся в виде кристаллов, которые разлагаются при сравнительно высокой температуре ( $T > 473 \text{ K}$ ). В нейтральных водных растворах они имеют высокие значения диэлектрической постоянной и большие дипольные моменты. Указанные свойства свидетельствуют о том, что аминокислоты кристаллизуются из нейтральных водных растворов в виде дипольных цвиттерионов.

### 3.2. Особенности структурных взаимодействий в системе вода – аминокислота

Вода, как известно, отличается от других жидкостей по целому ряду аномальных свойств, обусловленных особенностями ее структуры, благодаря которым в воде может образоваться следующая структура: водородные связи молекул воды полностью замыкаются на соседние молекулы воды с выигрышем энергии сразу 4-х водородных связей [13,15]. Образование относительно прочного каркаса из молекул воды, связанных четырьмя водородными связями, обуславливает сравнительно высокую температуру замерзания воды, примерно на  $100^\circ$  выше ожидаемой, исходя из сравнения с жидкостями одного с нею гомологического ряда, а также

частичное сохранение такого каркаса после плавления льда. Со структурными особенностями воды связаны и такие ее характеристики, как высокая диэлектрическая постоянная, свойства полярного растворителя, существенное изменение ее структуры вблизи растворенных веществ.

Для биологических систем важно не только изменение структуры воды вблизи поверхности раздела, сопровождаемое уменьшением доли молекул, связанных 4-мя водородными связями. Подобная перестройка вблизи неполярной поверхности энергетически невыгодна, что подтверждается данными по модельным системам - растворам неполярных углеводов в воде. Неполярные углеводороды плохо растворимы в воде, причем, несмотря на уменьшение энтальпии системы, наблюдается значительная положительная свободная энергии растворения [16]. При растворении в воде регистрируют практически одинаковые значения теплоты гидратации для различных неполярных соединений [17], откуда следует, что изменение энергии связано не с каким-либо специфическим взаимодействием неполярных молекул с водой, а с перестройкой структуры самой воды. Невыгодность подобных структурных изменений для воды в пограничных областях обуславливает тенденцию к вытеснению неполярных соединений или групп из воды, их слипанию между собой и уменьшению поверхности контакта с ними [16], что является источником гидрофобного взаимодействия, которое играет решающую роль в формировании конформации биополимеров и в их стабилизации. Наличие гидрофобных участков на поверхности макромолекул отчасти связано с их важной ролью в составе активных центров ферментов при взаимодействии с ними субстратов реакций [18].

Изучение растворов малых концентраций представляет принципиальный интерес для понимания строения воды и водных растворов вообще, так как в таких растворах структура воды ещё не нарушена за счёт эффекта избытка растворённого вещества, и изменения структуры воды от добавления посторонних молекул проявляются в наиболее чистом виде. Кроме того, при очень малых концентрациях наблюдается и биологическое действие многих веществ (например, явление анестезии и др.).

В работе [19] замечено, что изменения спектров поглощения воды при растворении малых количеств неэлектролитов аналогичны изменениям, наблюдающимся в спектре чистой воды при понижении температуры. Такой характер изменений спектров свидетельствует об упорядочивании воды в смысле упрочнения водородных связей между молекулами воды. Наблюдаемые сдвиги полос, свидетельствующие об увеличении силовой постоянной водородной связи, согласуются с распространённым мнением об увеличении структурированности воды в растворах неэлектролитов.

Установлено [19], что при растворении разнообразных веществ полоса поглощения воды с частотой  $5180\text{ см}^{-1}$  смещается в сторону малых частот, что свидетельствует об “упорядочивании” структуры воды при

растворении неэлектролита. Смещение полосы, достигнув некоторого наибольшего значения, прекращается при разных значениях концентрации для разных веществ. Прекращение сдвигов полос показывает, что, начиная с некоторой, характерной для каждого вещества концентрации его в растворе, дальнейший рост структурированности воды прекращается. Объяснение этим результатам, по мнению авторов данной работы, в существовании гидрофобных взаимодействий между неполярными группами молекул неэлектролитов в водных растворах. Процессы, происходящие в воде при добавлении малых концентраций неэлектролитов, можно, с учётом гидрофобных взаимодействий, описать следующим образом. При малых концентрациях вокруг каждой растворённой в воде молекулы выстраивается некий упорядоченный каркас из молекул воды; при увеличении числа растворённых молекул количество упорядоченных областей вначале возрастает, что приводит к концентрационному сдвигу максимумов полос поглощения воды. По достижении некоторых концентраций начинает проявляться гидрофобное взаимодействие между растворёнными молекулами. Новые молекулы, попадающие в раствор, за счёт взаимного гидрофобного притяжения стремятся к ассоциации с другими растворёнными молекулами; при этом они встраиваются в уже структурированную воду, прилегающую к растворённым молекулам, и, следовательно, дальнейшего упорядочивания воды не вызывают. Концентрации, при которых происходит резкое замедление дальнейшего упорядочивания раствора, тем меньше, чем больше склонность данного вещества к образованию гидрофобных связей. Вероятно, при непосредственном контакте двух растворённых молекул общая поверхность неполярной частицы уменьшается и тем самым снижается упорядочивающее действие на воду [19].

Необходимость очень малых концентраций в растворах некоторых веществ для их лекарственного действия может быть связана с тем, что в силу гидрофобного взаимодействия молекул в некоторых участках раствора может создаваться высокая локальная концентрация растворённых молекул при общей весьма низкой их концентрации. В этом случае локальная концентрация, необходимая для лекарственного действия, будет тем меньше, чем выше склонность молекул к образованию гидрофобных связей [18].

Объяснение длинноволнового сдвига, по мнению авторов [20], следует искать в увеличении степени самоассоциации воды под воздействием неполярных групп неэлектролита. Наиболее вероятные объяснения действия неполярных групп на воду таковы: 1) уменьшение трансляционной подвижности воды благодаря занятию пространства, необходимого для перемещений, посторонней молекулой: молекулы воды при этом легче вступают в водородную связь друг с другом и 2) увеличение универсального ван-дер-ваальсового взаимодействия в растворе при растворении неэлектролита. Увеличение степени ассоциации воды происходит также под действием неполярных веществ, например

углеводородов, однако выражено оно гораздо слабее, чем в растворах спиртов. Полярная часть молекулы неэлектролита, образуя водородную связь с молекулой воды, увеличивает концентрацию в ней неполярных групп.

При растворении небольших молекул вода, приспособиваясь к размерам растворённой молекулы “гостя”, образует наиболее подходящую из ограниченного, дискретного набора структур, свойственных ассоциатам из молекул воды, в то время как большие молекулы могут изменять геометрию структуры воды непрерывным образом, путём небольших деформаций большого количества водородных связей, находящихся вблизи растворённой молекулы [20].

По мнению авторов [21], использующих теорию дефектов, при некоторой концентрации неэлектролита происходит разрушение сетки водородных связей. Сетка Н-связей выталкивает молекулы неэлектролита к дефектам сетки. Это выталкивание тем выгоднее, чем сильнее выражен гидрофобный эффект, поскольку в местах дефектов молекулы неэлектролита объединяются так, чтобы гидрофобные части имели контакт с водой. Дефектами сетки водородных связей воды являются тепловые разрушения, примеси и сами молекулы неэлектролита.

При работе с водными растворами аминокислот имеют дело с водными растворами широкой области концентрации по растворённому веществу (от очень разбавленных ( $10^{-6}$  моль/л) до достаточно концентрированных растворов). Важной характеристикой раствора является координация молекул воды вокруг аминокислоты. Функциональные группы, способные образовывать водородные связи с молекулами воды, включаясь в структурированные системы кластеров, нарушают их упорядоченность.

Метод УФ-спектроскопии может быть использован для анализа структурных изменений водной матрицы при образовании растворов аминокислот с концентрацией  $< 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

#### **4. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ**

В настоящее время насчитывают около 80 аминокислот, выделенных из различных природных объектов. Кроме постоянно и редко встречающихся в белках аминокислот, в составе животных, микроорганизмов и особенно растений обнаружены разнообразные свободные аминокислоты.

Способы выделения аминокислот зависят от того, находятся ли цвиттерлиты в свободном или в связанном состоянии (в белках). Свободные аминокислоты чаще всего извлекают из биологического материала 75 – 80% - ми водными растворами этанола или метанола. Так как в случае растительных объектов возможен переход в спиртовой экстракт некоторых белков, последние дополнительно осаждают, либо

изменяя рН среды, либо добавляя к ней те или иные осадители белков. Хорошие результаты получают при экстракции свободных аминокислот из биологических объектов 5%-ным водным раствором трихлоруксусной кислоты, которая является одним из лучших осадителей белков. Однако недостаток указанного метода состоит в том, что для дальнейшей работы с аминокислотами, содержащимися в такой вытяжке, необходимо удаление из неё трихлоруксусной кислоты, представляющее довольно трудоёмкую операцию. Для извлечения свободных аминокислот из биологического материала применяют многие другие вещества: воду, подкисленный ацетон, разбавленную уксусную кислоту и т.д.

Если аминокислота находится в связанном состоянии, то выделить её можно после гидролиза белка: либо путём нагревания препарата с кислотами (20% - ный раствор HCl; 30% - ный раствор  $H_2SO_4$ ) или основаниями (5 М NaOH; 14% - ный раствор  $Ba(OH)_2$ ), либо путём инкубации препарата с ферментами [22].

Наиболее сложную и ответственную часть работы по выделению той или иной аминокислоты из природных объектов представляет процесс отделения данной аминокислоты от сопутствующих ей других аминокислот вытяжки или гидролизата. Ранее применявшиеся методы фракционирования аминокислот (разгонка в вакууме этиловых эфиров аминокислот, осаждение аминокислот в виде медных, серебрянных и др. солей, избирательное растворение некоторых аминокислот в органических растворителях) сейчас почти полностью заменены простым и эффективным хроматографическим методом разделения сложных аминокислотных смесей на индивидуальные составляющие.

При выделении свободных аминокислот из биологического материала используются высушенные насекомые, например куколки тутового шелкопряда, являющиеся отходами кокомотального производства и содержащие в несколько раз больше свободных аминокислот, чем другие объекты природного происхождения. При работе с иным материалом (ткани животных, фиксированные этанолом при нагревании и переведённые в сухой порошок) необходимо увеличить в 2 – 3 раза количество 1% - ной HCl, идущей на растворение сухого остатка перед хроматографированием. Аминокислоты в вытяжке обнаруживают реакцией с нингидрином (трикетогидринденом). Проявляется интенсивное синее – фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о присутствии в испытуемой пробе  $\alpha$ - аминокислот [23].

Кроме того, существуют цветные высокоспецифичные реакции на аминокислоты, некоторые из них даже находят применение для количественного определения аминокислот. *Например, для определения тирозина используется реакция Миллона.* (К нескольким кристаллам тирозина (полученного из шёлка или коммерческого препарата) прибавляют 5 мл 2,5%-ного раствора серной кислоты и перемешивают до полного растворения). Приливают 1 мл реактива Миллона, встряхивают и оставляют стоять при комнатной температуре. Через некоторое время

раствор окрашивается в кроваво-красный цвет. Для ускорения появления окраски раствор можно слегка подогреть. Реактив Миллона представляет собой смесь нитратов и нитритов ртути (1) и (2), растворённых в концентрированной азотной кислоте. При взаимодействии его с фенольным ядром тирозина возникает нитрозотирозин, ртутное соединение которого окрашено в красный цвет.

*Для определения гистидина используется реакция Паули.* (К 1мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе HCl прибавляют 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита калия, сильно встряхивают и немедленно приливают сначала 2 мл 0,01%-ного раствора гистидина. Затем, после перемешивания содержимого пробирки, приливают 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнёво-красная окраска). *Для определения триптофана – реакция Гопкинса - Коле.* (1 мл 0,005%-ного раствора триптофана смешивают в пробирке с равным объёмом раствора глиоксиловой кислоты и добавляют 10 капель 0,04 М раствора сульфата меди. Приливают небольшими порциями 2 – 3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку каждый раз. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре и ставят на 5 мин в кипящую водяную баню. Развивается сине-фиолетовое окрашивание [23, 24].

Однако цветные реакции в большинстве своём не специфичны, поэтому количественное определение аминокислот при помощи цветных реакций не всегда надёжно.

Существует ещё ряд методов количественного определения аминокислот. Если плотность окраски с нингидрином аминокислотной вытяжки измерить в колориметре и сопоставить далее с плотностью окраски, развивающейся при взаимодействии с нингидрином смеси аминокислот известного состава, то можно рассчитать количественное содержание аминокислот в исследуемой пробе. Карбоксильные группы аминокислот можно количественно учесть путём титрования их в спиртовой среде. Так как в этих условиях диссоциация по аминогруппе подавлена, аминокислоты ведут себя как карбоновые кислоты и прямо титруются спиртовым раствором щёлочи. Разработан, кроме того, метод титрования аминокислот в водной среде. Чтобы подавить диссоциацию по аминогруппам, к аминокислотам добавляют раствор формалина. Возникшие при этом N-диоксиметил-аминокислоты диссоциируют и титруются как обычные карбоновые кислоты. Наконец, суммарное содержание аминокислот часто определяют путём реакции по аминогруппам.

Также для количественного определения аминокислот применяются хроматографические методы. В бумажной хроматографии образцы аминокислот наносят на бумагу, которую подвешивают в сосуде, на дне которого находится смесь растворителей. Для разделения цвиттерлитов используются полярные растворители в виде смеси воды, спиртов, кислот и оснований. Полярные растворители образуют с целлюлозой



неподвижную фазу. Далее бумагу обрабатывают нингидрином в ацетоне и нагревают до  $100^{\circ}\text{C}$ . Перемещение аминокислот, содержащих короткие неполярные цепи или полярные боковые цепи, происходит медленнее, чем движение аминокислот с длинными неполярными боковыми цепями [25].

Разделение аминокислот возможно с помощью элюентной хроматографии на ионообменных смолах. Обычно используют колонки из сульфированного полистирольного ионообменника с гранулами сферической формы одинакового размера. Аминокислоты вымываются растворами цитрата натрия при температуре  $50^{\circ}\text{C}$  и значениях pH от 3 до 6. Первыми выходят аминокислоты с двумя карбоксильными группами в молекуле (аспарагиновая, глутаминовая кислота). Затем следуют нейтральные аминокислоты с одной карбоксильной группой и одной аминогруппой в молекуле. Цвиттерлиты с ароматическими кольцами (тирозин, фенилаланин) удерживаются дольше других. Последними вымываются “основные” аминокислоты – лизин, триптофан, аргинин [25].

Сотрудниками научной школы В.А. Даванкова были предложены методы разделения оптических изомеров аминокислот, смесей пептидов и аминокислот на модифицированных силикагелях и сверхсшитых сорбентах “Стиросорб” [26].

Авторами работы [27] предложено для экстракции аминокислот (в частности, лизина) применять экстрагирующую эмульсию, в качестве органической мембраны - ди-2- этилгексилфосфорную кислоту в инертном разбавителе, контактирующую с водным раствором.

Для количественного определения аминокислот можно применять метод дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Аминокислоты взаимодействуют с фталевым альдегидом в присутствии меркаптановых соединений, образующиеся изоиндолы окисляются на графитовом электроде. Вольтамперограммы получаются при сканировании потенциала на фоне боратного буферного раствора с pH 9,2 [28].

Также возможно потенциометрическое определение аминокислот с помощью анион-селективных электродов пленочного типа на основе раствора бромида тетрадециламмония в дибутилфталате. Измерения ЭДС проводят при постоянном значении pH для определенной аминокислоты [29].

## **5. ОСОБЕННОСТИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**

Спектрофотометрическое определение аминокислот основано на поглощении их растворов в УФ – области спектра из-за наличия у цвиттерлитов  $\pi$  - электронной системы в углеводородном радикале. Для водных растворов ароматических аминокислот поглощение в УФ и видимой областях спектра связано с переходами валентных электронов одинарных и кратных связей ( $\sigma$  и  $\pi$  электроны) и электронов

неподеленных электронных пар (n-электроны). Положение полосы поглощения определяется разностью энергий состояний, между которыми происходит переход, и может быть охарактеризовано длиной волны в максимуме полосы поглощения [4,30]. Такие аминокислоты, как фенилаланин, тирозин и триптофан имеют в своей структуре бензольное кольцо. Следует отметить, что в спектре поглощения бензола наблюдаются три полосы поглощения при 180, 203, и 256 нм [4]. Установлено, что эти полосы в спектре сохраняются, несколько изменяя своё положение и интенсивность, для всех производных бензола.

Спектры поглощения аминокислот должны быть записаны в таких условиях, чтобы оптимальным образом использовать возможности спектрофотометрии, сведя к минимуму случайные и систематические искажения спектра. Для устранения случайных ошибок значение сигнала должно существенно превышать уровень шумов от приемника излучения. Главной причиной систематических ошибок является большая ширина щели прибора, в этом случае полоса поглощения оказывается более широкой и менее интенсивной.

Поведение полос поглощения при использовании различных растворителей дает информацию о свойствах поглощающей молекулы, об их изменениях при оптическом возбуждении и о строении поглощающей среды в целом. Главное требование к растворителю – прозрачность в области исследуемого поглощения, поэтому вода является универсальным растворителем в спектрофотометрическом определении аминокислот, существенно уменьшая случайные ошибки анализа.

Реальные электронные спектры редко содержат одну полосу, обычно наблюдается несколько перекрывающихся полос. Вид двухполосного спектра зависит от их относительной интенсивности и взаимного расположения. Перекрывание двух симметричных близко расположенных полос разной интенсивности приводит к появлению одной симметричной полосы, максимум которой смещен относительно его положения в первичной более интенсивной полосе. Если интенсивности перекрывающихся полос равны, суммарная полоса симметрична и имеет максимум посередине. Если же полосы удалены друг от друга так, что расстояние между максимумами больше их полуширины, они видны раздельно, и их максимумы не смещены [31,32].

Среди важнейших характеристик, влияющих на спектрофотометрическое определение аминокислот в водном растворе, необходимо отметить такие параметры, как рН раствора, его концентрацию и время установления равновесия при растворении цвиттерлита.

Спектры поглощения органических соединений, представляющих собой кислоты или основания, зависят от рН среды. Известно, что аминокислоты могут существовать в различных ионных формах в зависимости от рН раствора [33]. Изменение кислотности раствора может

привести к тому, что химические превращения пойдут в нежелательном направлении. Кислотность раствора может влиять на положение максимума основной полосы поглощения и приводить к его уширению. В современных исследованиях особое внимание уделяется изучению данной проблемы. В работе [34] установлено уширение и сдвиг максимума полосы поглощения в более длинноволновую область для катиона ( $pH < 3$ ) и аниона ( $pH > 7$ ) цистеина. Авторы работы [35] выявили смещение максимума поглощения тирозина также в длинноволновую область спектра при  $pH$  больше 9,2 и показали, что спектры поглощения аминокислот при совместном присутствии перекрываются. Невозможность отдельного определения аминокислот по поглощению в УФ – области сделало целесообразным использование варианта Фирорда.

Одним из основных источников погрешности определения показателя поглощения аминокислот служит погрешность определения концентрации исследуемого вещества. Для оптимальных значений абсорбционности анализируемое вещество должно иметь концентрацию порядка  $10^{-4}$  моль/л. В целях повышения точности приготовления раствора исследуемый раствор готовят методом последовательных разведений.

При спектрофотометрических исследованиях цвиттерлитов следует обратить внимание на возможность образования ассоциатов аминокислот благодаря водородным связям протонированных аминогрупп с диссоциированными карбоксильными группами соседних молекул цвиттерлита. Различными физико-химическими методами установлено проявление в растворах аминокислот гидрофобных и гидрофильных эффектов, обусловленных строением этих биомолекул [36,37]. Изменение в окружении молекул цвиттерлита влияет на величину молярного коэффициента поглощения, поэтому увеличение концентрации аминокислоты выше определенного предела может привести к отклонению от основного закона светопоглощения [34].

Время установления равновесия, а также время “выдержки” рабочих растворов аминокислот влияет на оптические характеристики растворов цвиттерлитов, в частности, может вызвать уменьшение интенсивности и уширение максимума поглощения из-за изменения количества поглощающих частиц, образования межмолекулярных и внутримолекулярных водородных связей в растворах аминокислот или перехода аминокислоты в мезомерную форму [13].

Таким образом, учитывая особенности поведения аминокислот в водных растворах, необходимо рассмотреть причины, вызывающие отклонения от основного закона светопоглощения. Особый интерес представляет установление влияния  $pH$  среды, концентрации и времени установления равновесия в водных растворах ароматических и гетероциклических аминокислот на спектральные характеристики растворов цвиттерлитов.

## **6. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ**

Выбор оптимальных условий количественного анализа аминокислот заключается в определении влияния рН, времени установления равновесия при образовании раствора аминокислоты в интервале концентрации, в котором соблюдается основной закон светопоглощения. Следует учитывать, что область абсорбционности, где относительная ошибка ее определения не превышает 3%, заключена в пределах 0,2 - 0,8 [4].

Для количественного определения аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина и цистеина) наиболее удобен способ градуировочного графика. Однако для водных растворов, содержащих несколько индивидуальных аминокислот, измеряемая величина абсорбционности представляет собой сумму абсорбционностей определяемых компонентов при условии, что между этими компонентами нет химического или другого типа взаимодействия, которое оказывало бы влияние на спектральные характеристики поглощающих веществ. Поэтому для количественного определения индивидуальных ароматических и гетероциклических аминокислот при их совместном присутствии в растворе целесообразно использовать принцип аддитивности Фирордта [4, 35,38].

Для выбора аналитической длины волны и интервала концентраций, в котором соблюдается основной закон светопоглощения, ежедневно по точной навеске готовят стандартный раствор аминокислоты определенной концентрации, используя фармакопейные образцы. Для получения раствора аминокислоты с  $pH < pI$  используют 0,005 М, 0,050 М и 0,100 М растворы HCl; с  $pH > pI$  – 0,1 М и 1 М растворы NaOH. При определении аминокислот применяются кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см. Спектры поглощения полученных растворов снимают при температуре измерения рН раствора. Для определения аналитической длины волны получают полный спектр поглощения водного раствора исследуемой аминокислоты (зависимость абсорбционности от длины волны). Измерения проводят через 20 нм, и, определив границы максимума, повторяют измерения через 2 нм. Выбирают длину волны, соответствующую максимальному значению абсорбционности.

### ***6.1. Определение фенилаланина***

Для спектра водного раствора фенилаланина характерно наличие трех максимумов поглощения при 191; 205 и 257 нм. Максимальное значение абсорбционности и более широкая полоса поглощения соответствует длине волны 257 нм (рис.5). Молярный коэффициент светопоглощения составляет величину  $\epsilon_{257} = 0,18 \cdot 10^3 \pm 0,01 \cdot 10^3$  л/моль·см.

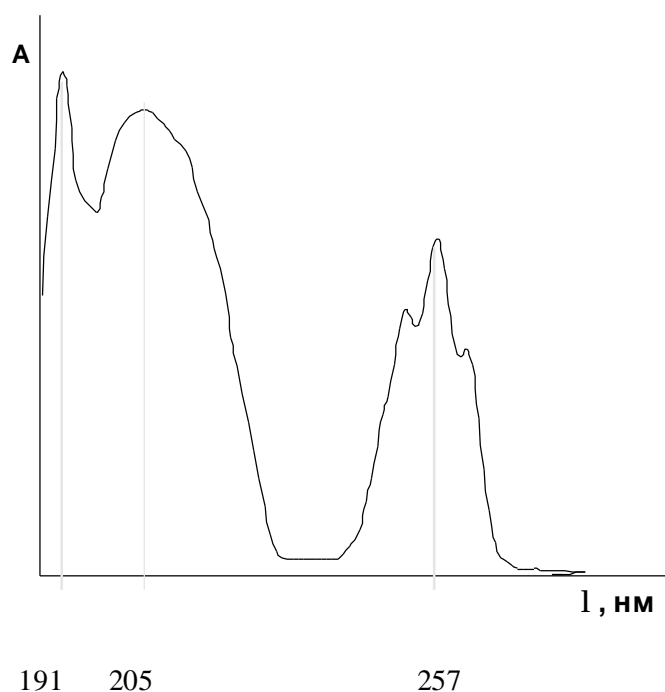


Рис.5. Спектр поглощения фенилаланина

Для построения градуировочного графика готовят серию стандартных растворов с концентрациями  $0,5 \cdot 10^{-3}$  -  $5,00 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>, используя исходный раствор с концентрацией  $5,00 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>. Для приготовления стандартного раствора используют навеску аминокислоты не менее 50 мг [4]. В этой области концентраций Phe наблюдается линейная зависимость между абсорбционностью и концентрацией, и значения A лежат в пределе 0,2 - 0,9. На рис.6 приведен градуировочный график для определения фенилаланина в водном растворе.

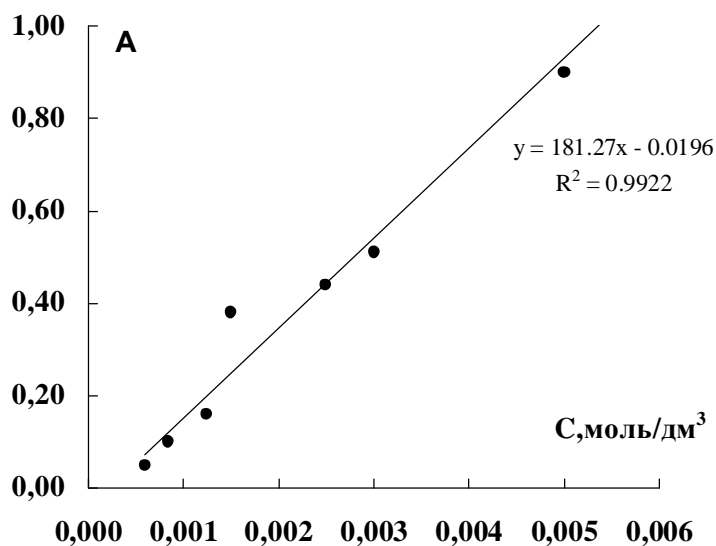


Рис.6. Градуировочный график для определения фенилаланина

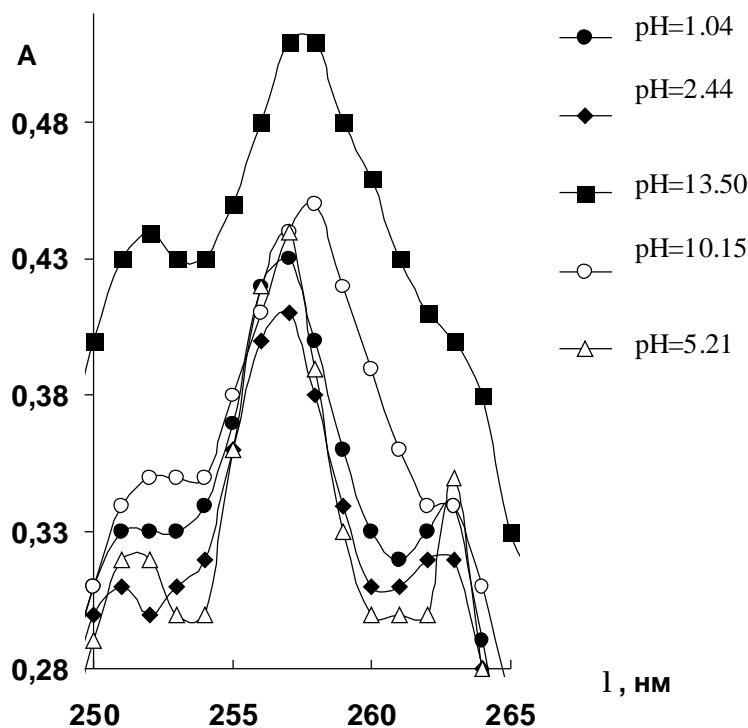
в водном растворе,

$\lambda = 257$  нм,  $pH = 5,81$ ,

$C = 0,5 \cdot 10^{-3} - 5,0 \cdot 10^{-3}$   
моль/дм<sup>3</sup>,

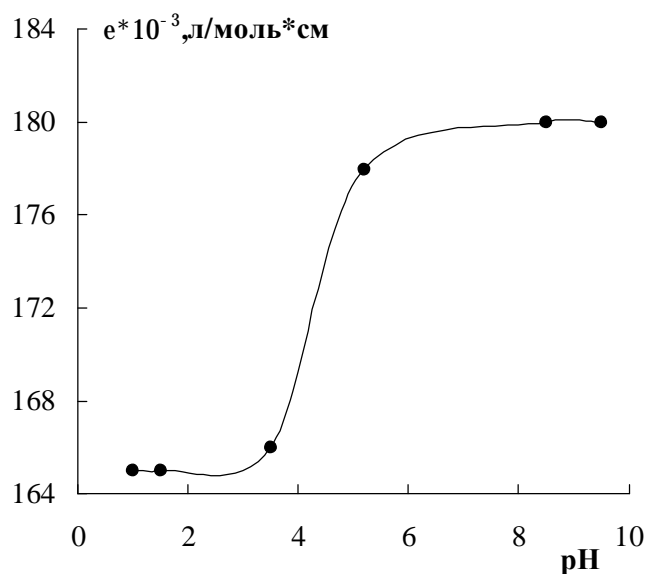
$\varepsilon = 0,18 \cdot 10^3 \pm 0,01 \cdot 10^3$   
л/(ммоль·см)

**Влияние pH раствора на спектральные характеристики.** На рис.7 представлен спектр поглощения для растворов фенилаланина с разным значением pH. Положение основного максимума поглощения ( $\lambda = 257$  нм) не зависит от pH раствора в интервале  $1,0 < \text{pH} < 9,0$ . Значения pH раствора Phe более 9,5 приводят к некоторому уширению максимума основной полосы поглощения и смещению его в длинноволновую область спектра.



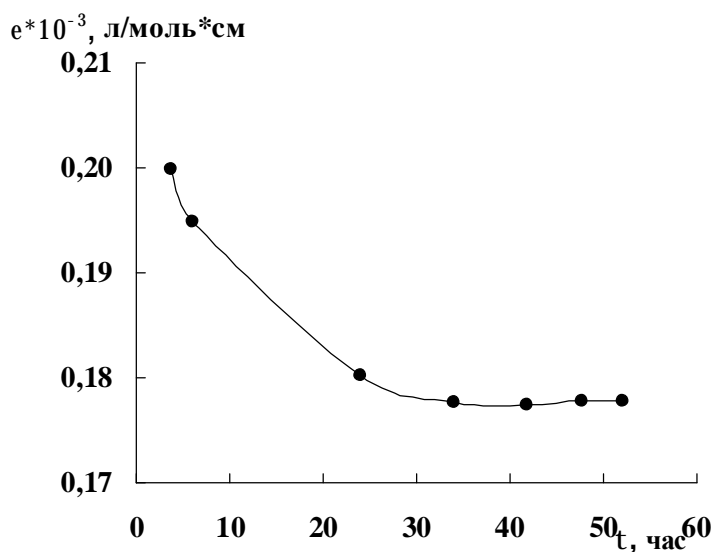
*Рис.7. Спектры поглощения растворов Phe концентрации  $2,5 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> при различных значениях pH*

На рис.8 приведена зависимость молярного коэффициента светопоглощения от pH раствора фенилаланина. Постоянство значений  $\epsilon$  наблюдается в области значений  $5,2 < \text{pH} < 9,5$ . Значения pH раствора менее 5,2 приводят к уменьшению значения молярного коэффициента светопоглощения. В интервале  $1,0 < \text{pH} < 3,5$  молярный коэффициент также постоянен, но при этом имеет меньшее значение.



*Рис.8. Зависимость молярного коэффициента светопоглощения от pH раствора Phe.*

**Определение времени установления равновесия в водном растворе фенилаланина.** Для определения времени установления равновесия в растворе аминокислоты снимали кинетическую кривую образования водного раствора фенилаланина (рис.9). В течение 24 часов с момента приготовления водного раствора аминокислоты наблюдается изменение молярного коэффициента светопоглощения. Таким образом, согласно экспериментальным данным, равновесие в растворе при растворении фенилаланина наступает через 24 часа. Хранение водного раствора фенилаланина более трех суток вызывает уменьшение молярного коэффициента поглощения и уширение максимума поглощения.



*Рис.9. Зависимость молярного коэффициента светопоглощения от времени выдержки раствора фенилаланина с концентрацией  $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ моль/дм}^3$ ,  $pH = 5,81$ ,  $l = 257 \text{ нм}$*

## 6.2. Определение тирозина

Спектр водного раствора тирозина (рис.10) представляет собой кривую с тремя максимумами поглощения при 193; 222 и 274 нм. Наиболее выраженному максимуму с большим значением величины поглощения соответствует полоса поглощения при 274 нм. Значение молярного коэффициента светопоглощения имеет величину  $\epsilon_{274} = 1,50 \cdot 10^3 \pm 0,41 \cdot 10^3$  л/моль·см.

Для приготовления стандартных растворов тирозина используют исходный раствор с концентрацией  $1,0 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>. Область линейности градуировочного графика и оптимальные значения абсорбционности для водного раствора тирозина соответствуют интервалу концентрации аминокислоты  $0,1 \cdot 10^{-3} - 0,7 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> (рис.11).

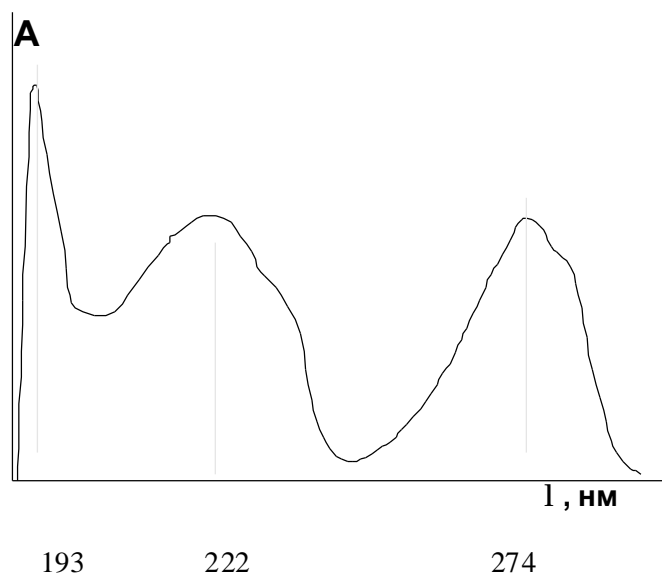


Рис.10. Спектр поглощения тирозина

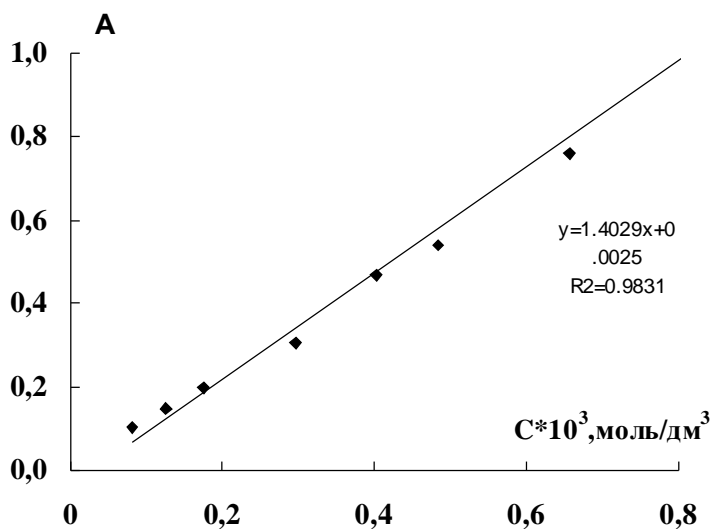


Рис.11.

Градуировочный график для определения тирозина в водном растворе,  
 $\lambda = 274$  нм,  
 $C = 0,10 - 0,70$  ммоль/дм<sup>3</sup>,  
 $pH = 5,70$ ,  
 $\epsilon = 1,50 \cdot 10^3 \pm 0,41 \cdot 10^3$  л/(моль·см)



**Влияние pH раствора на спектральные характеристики.** Для водных растворов тирозина в области значений  $5,5 < \text{pH} < 10,0$  положение основного максимума поглощения и его интенсивность не изменяются (рис.12,13). Для растворов аминокислоты с  $\text{pH} > 10,0$  характерно уширение и сдвиг максимума в длинноволновую область спектра ( $\lambda = 291 \text{ нм}$ ), уменьшение интенсивности. Для растворов тирозина с  $\text{pH} < 5,5$  наблюдается уменьшение величины поглощения при сохранении аналитической длины волны.

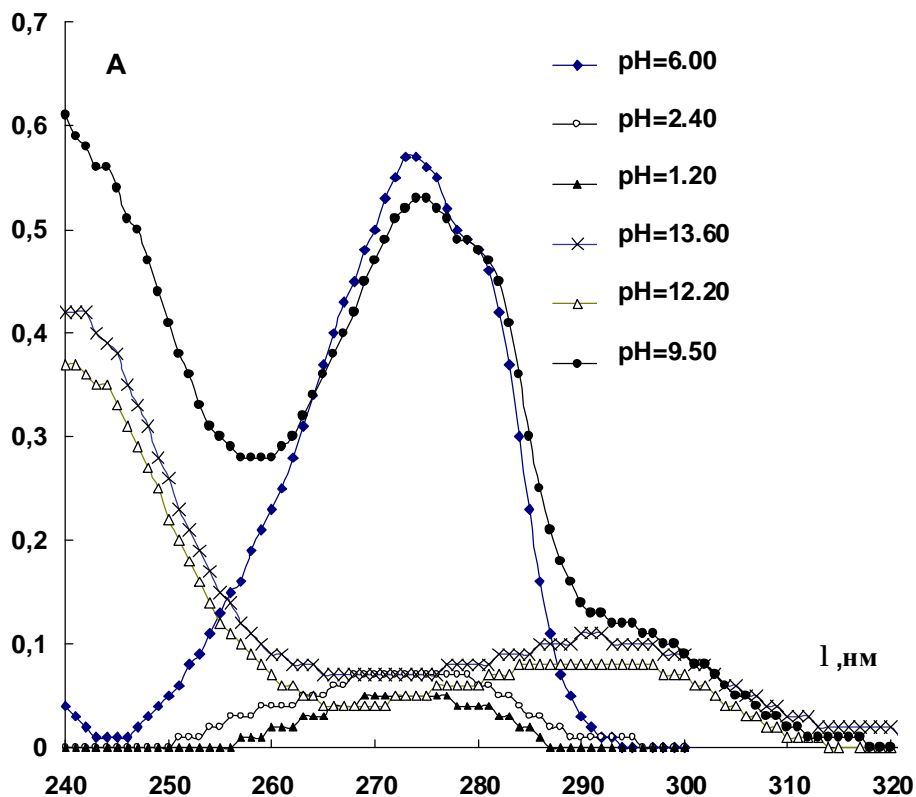


Рис.12. Спектры поглощения растворов тирозина с концентрацией  $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ моль/дм}^3$  при разных значениях pH

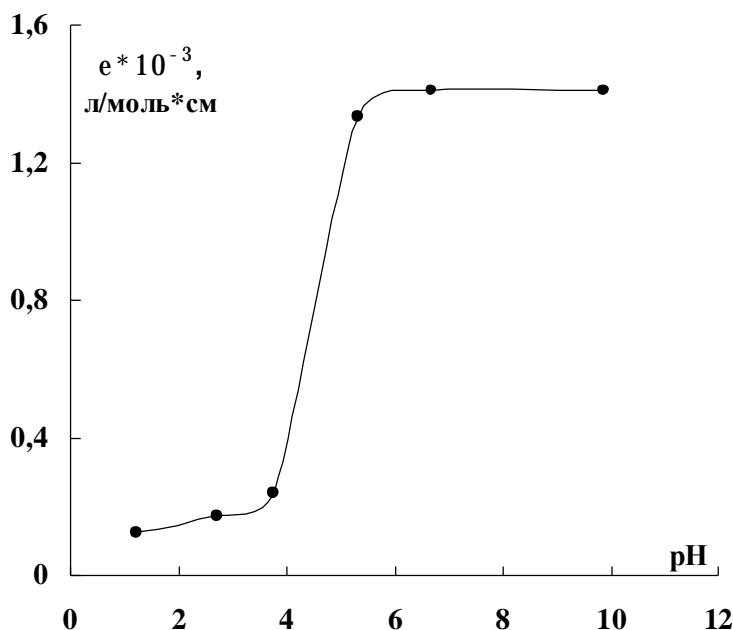


Рис.13. Зависимость молярного коэффициента поглощения от pH для растворов тирозина с концентрацией  $0,4 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>

**Определение времени установления равновесия в водном растворе тирозина.** На рис.14 приведена кинетическая кривая образования водного раствора тирозина. Согласно экспериментальным данным, равновесие в растворе аминокислоты наступает в течение 10 минут. Значения молярного коэффициента поглощения не изменяются (значения его находятся в пределах ошибки метода) в течение 24 часов. Выдерживание раствора тирозина более суток приводит к уменьшению молярного коэффициента поглощения и уширению максимума.

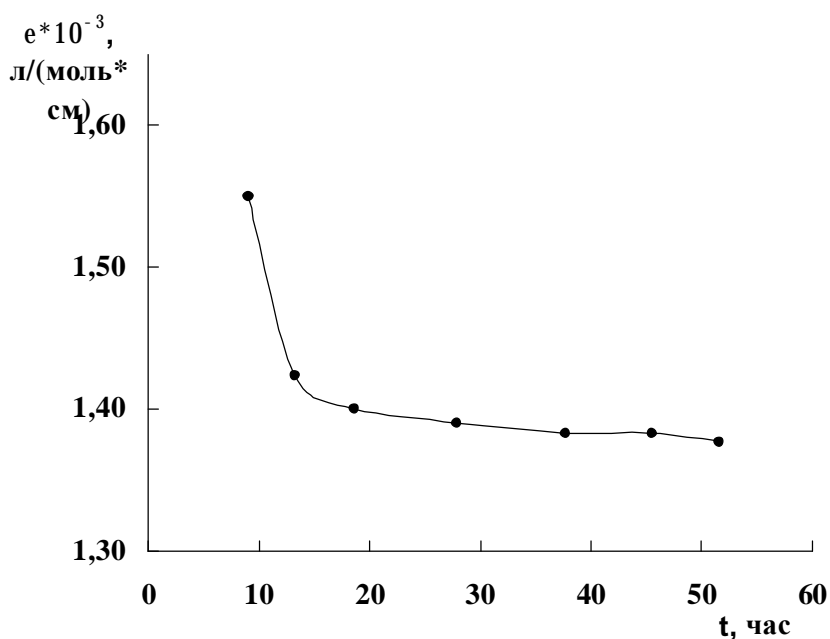


Рис.14. Зависимость молярного коэффициента поглощения от времени выдерживания в растворе тирозина, pH = 5,70,  $I = 274$  нм,  $c = 0,25 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>

### 6.3. Определение триптофана

На рис.15 приведен спектр поглощения триптофана. Для него характерно наличие слабых полос поглощения при 196 и 279 нм и интенсивной полосы поглощения с максимумом 219 нм. Величина  $\epsilon$  для полосы поглощения в максимуме поглощения при 219 нм имеет величину  $\epsilon_{279} = 5,63 \cdot 10^3 \pm 0,17 \cdot 10^3$  л/моль·см.

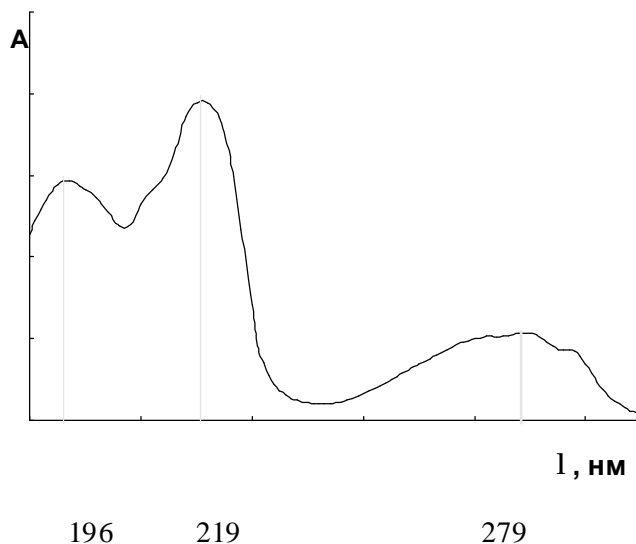


Рис.15. Спектр поглощения триптофана

Для определения области концентраций, в которой соблюдается основной закон светопоглощения и абсорбционность имеет оптимальные значения, используют раствор с концентрацией  $0,15 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Затем методом последовательного разбавления получают стандартные растворы в области концентраций  $0,04 \cdot 10^{-3} - 0,15 \cdot 10^{-3}$  моль/л, для которых величина абсорбционности линейно зависит от концентрации и имеет оптимальное значение (рис.16).

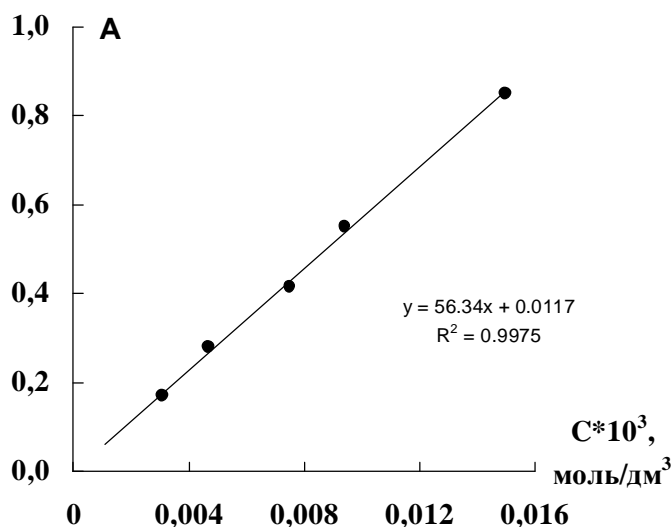


Рис.16.  
Градуировочный  
график для определения  
триптофана в водном  
растворе при

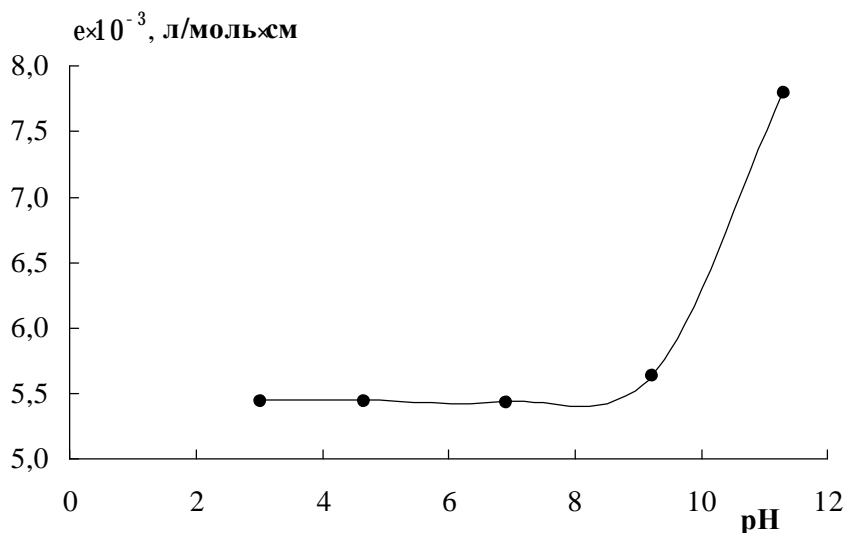
$\lambda = 279$  нм,

$pH = 5,77$ ,

$C = 0,04 - 0,15$   
ммоль/дм<sup>3</sup>,

$\epsilon = 5,63 \cdot 10^3 \pm 0,17 \cdot 10^3$   
л/(ммоль·см)

**Влияние pH раствора на спектральные характеристики.** Для водных растворов триптофана положение основного максимума поглощения и величина  $\epsilon$  сохраняются неизменными в интервале  $3,0 < \text{pH} < 9,2$  (рис.17). Значения pH раствора более 9,2 приводят к возрастанию величины поглощения, при этом положение максимума полосы поглощения не изменяется.



*Рис.17. Зависимость молярного коэффициента светопоглощения триптофана от pH раствора с концентрацией Trp  $0,15 \cdot 10^3$  моль/дм<sup>3</sup>*

**Определение времени установления равновесия в водном растворе триптофана.** В случае образования водного раствора триптофана равновесие наступает через 18 часов с момента приготовления раствора (рис.18). При хранении водного раствора триптофана более трех суток спектральные характеристики его изменяются (наблюдается увеличение интенсивности поглощения и некоторое смещение одного максимума в длинноволновую область спектра).

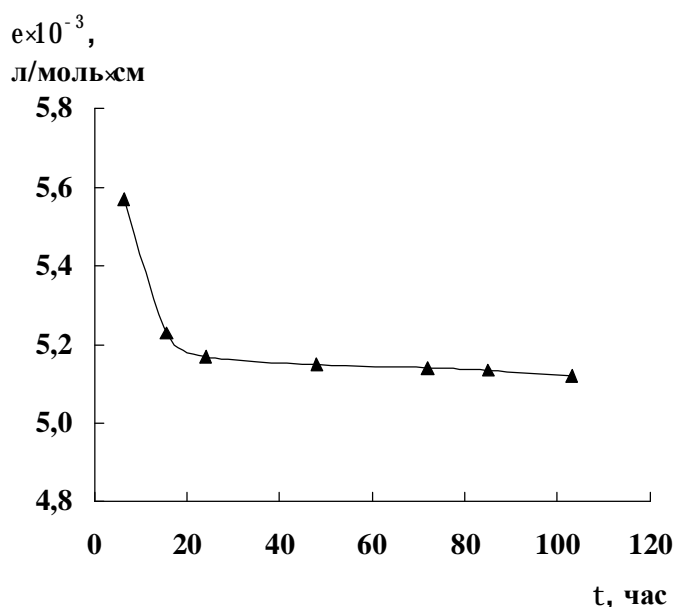


Рис.18.  
Зависимость  
молярного  
коэффициента  
свопоглощения  
от времени  
выдерживания  
раствора  
триптофана с  
концентрацией  
 $0,12 \cdot 10^3$  моль/дм<sup>3</sup>,  
 $pH=5,77$ ,  
 $l = 279$  нм.

#### 6.4. Определение гистидина

Для спектра поглощения гистидина (рис.19) характерно наличие двух максимумов поглощения при 190 и 210 нм. Аналитической длине волны соответствует максимум при 210 нм, так как является наиболее широким и характеризуется большей величиной интенсивности поглощения. Для выбранной длины волны величина  $\epsilon$  имеет значение  $\epsilon_{210} = 4,0 \cdot 10^3 \pm 0,20 \cdot 10^3$  л/моль·см.

Для построения градуировочного графика используют исходный раствор гистидина с концентрацией  $0,20 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>. Линейность концентрационной зависимости величины абсорбционности в области 0,2-0,9 соблюдается в интервале концентраций гистидина  $0,04 \cdot 10^{-3} - 0,20 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> (рис.20).

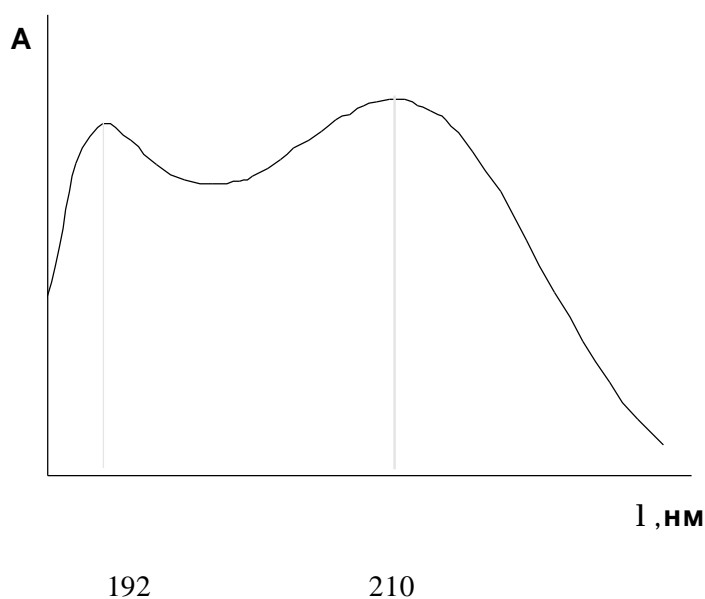


Рис. 19. Спектр поглощения гистидина

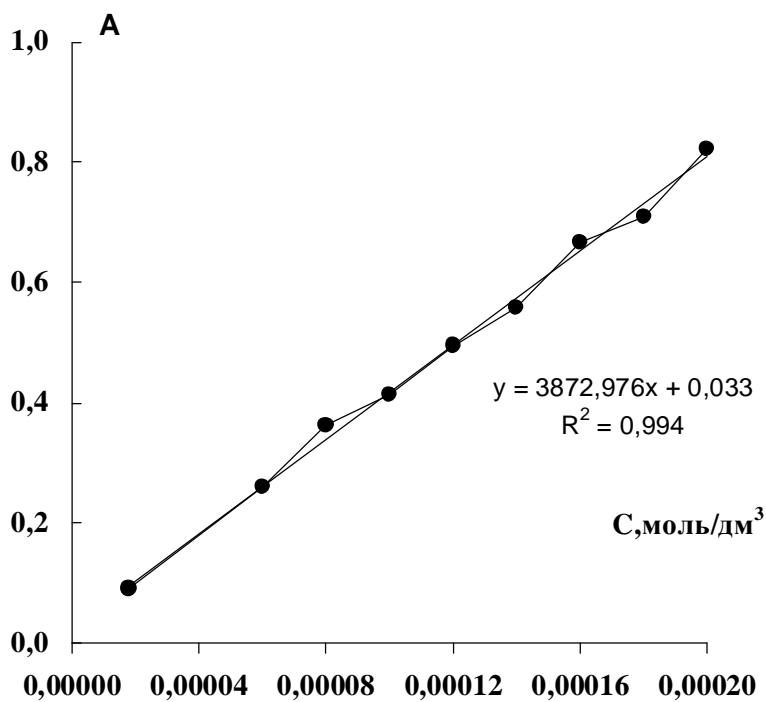


Рис.20.  
Градуировочный  
график для  
определения  
гистидина в  
водном растворе  
при  $\lambda = 210$  нм,  
 $C = 0,04 \cdot 10^{-3} -$   
 $0,2 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>,  
 $pH = 6,01$ ,  
 $\varepsilon = 4,00 \cdot 10^3 \pm$   
 $0,2 \cdot 10^3$   
л/(ммоль·см)

**Влияние pH раствора на спектральные характеристики.** Спектры поглощения при различных значениях pH приведены на рис.21. Аналитическая длина волны (210 нм) сохраняется при изменении значений pH раствора от 3,5 до 7,5. Следует отметить, что для этих растворов величина коэффициента поглощения не зависит от pH раствора

аминокислоты (рис.22). Снижение величины рН до 2,0 приводит к некоторому повышению интенсивности поглощения. Дальнейшее снижение рН раствора оказывает влияние на вид спектра поглощения гистидина. На спектре аминокислоты основная полоса поглощения проявляется в виде порога. Для полосы при 190 нм наблюдается смещение в длинноволновую область спектра и увеличение интенсивности максимума. Значения рН раствора более 7,5 оказывают влияние на величину коэффициента поглощения.

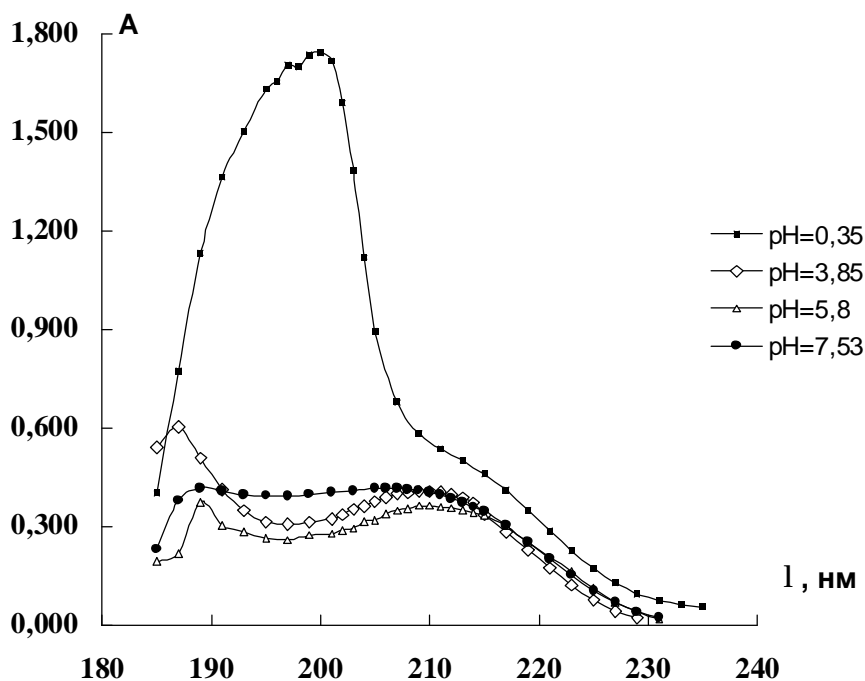


Рис.21. Спектры поглощения растворов гистидина с концентрацией  $0,1 \text{ моль/дм}^3$  и различными значениями рН

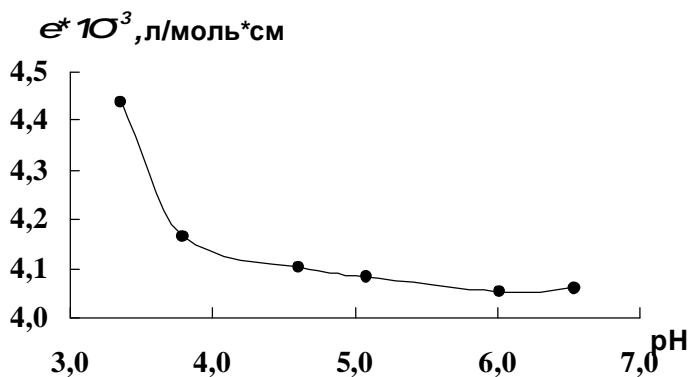
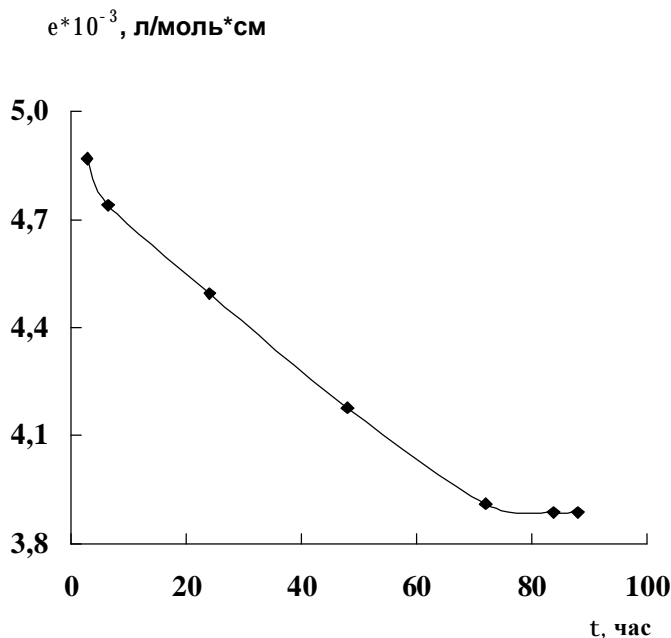


Рис.22. Зависимость молярного коэффициента светопоглощения гистидина от рН среды,  $C = 0,10 \text{ моль/дм}^3$ ,  $l = 210 \text{ нм}$

**Определение времени установления равновесия в растворе гистидина.** Согласно экспериментальным данным (рис.22), равновесие в растворе при растворении гистидина наступает в течение 72 часов с момента приготовления раствора. Увеличение длительности процесса установления равновесия при растворении гистидина может определяться образованием в растворе мезомерных форм аминокислоты. Переход от одной формы к другой при образовании раствора His сопровождается изменениями в электронных спектрах поглощения, что и проявляется в изменении спектральных характеристик водного раствора аминокислоты.



*Рис.22. Зависимость молярного коэффициента светопоглощения от времени выдерживания раствора гистидина  
( $c = 0,25$  ммоль/дм<sup>3</sup>,  $I = 210$  нм)*

### 6.5. Определение цистеина

Для спектра поглощения цистеина (рис.23) характерно наличие одного максимума поглощения при 193 нм. Для данной длины волны величина  $\epsilon$  имеет значение  $\epsilon_{193} = 2,30 \cdot 10^3 \pm 0,20 \cdot 10^3$  л/моль·см.



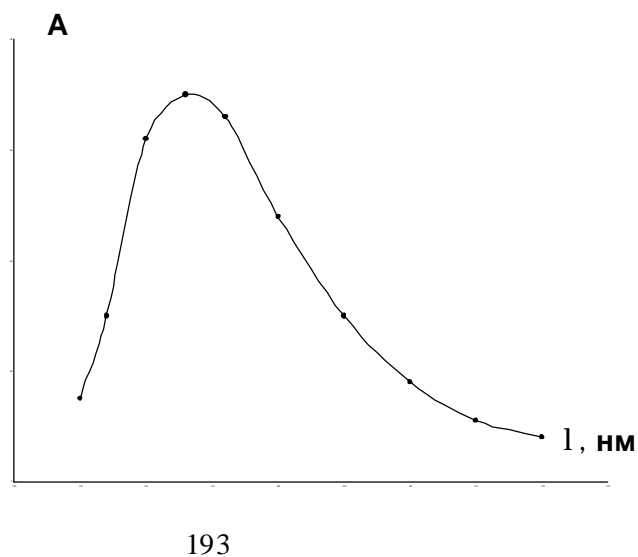


Рис.23. Спектр поглощения цистеина

Для построения градуировочного графика используют исходный раствор цистеина с концентрацией  $1,0 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup>. Линейность концентрационной зависимости величины абсорбционности в области 0,2 - 0,9 соблюдается в интервале концентраций цистеина  $0,04 \cdot 10^{-3} - 0,30 \cdot 10^{-3}$  моль/дм<sup>3</sup> (рис.24).

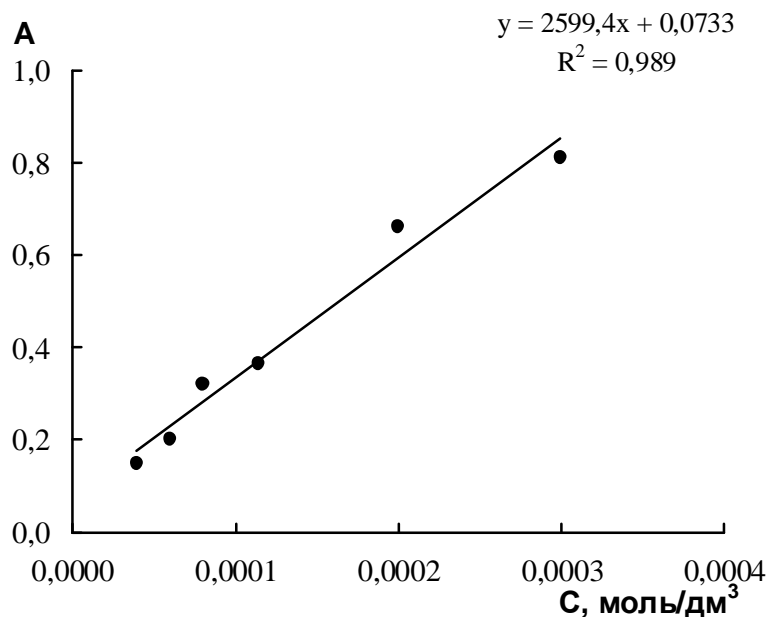


Рис.24. Градуировочный график для определения цистеина в водном растворе при  $\lambda = 193 \text{ нм}$ ,  $C = 0,04 - 0,3 \text{ ммоль/дм}^3$ ,  $\text{pH} = 5,02$ ,  
 $\varepsilon = 2,3 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3 \text{ л/(моль} \cdot \text{см)}$

**Влияние pH раствора на спектральные характеристики.** Смещение максимума поглощения при изменении pH представлено в таблице 2.

Таблица 2.

Зависимость длины волны максимума поглощения раствора цистеина от pH

pH	1	3	4	5	6	12
$\lambda_{\text{max}}$ , нм	200	195	193	193	192	199

Для растворов аминокислоты, в которых цистеин присутствует в основном в форме катиона ( $\text{pH} < 3$ ) или в форме аниона ( $\text{pH} > 7$ ), характерно увеличение абсорбционности во всем исследованном интервале длин волн, уширение и сдвиг максимума полосы поглощения в более длинноволновую область спектра. Для растворов цистеина с pH 3 - 7 (область преобладания  $\text{Cys}^{\pm}$ ) не наблюдается изменений в его спектрах поглощения.

**Определение времени установления равновесия в растворе цистеина.** Согласно экспериментальным данным, равновесие в растворе при растворении цистеина наступает в течение 48 часов с момента приготовления раствора. Увеличение длительности процесса установления равновесия при растворении Cys вызывает уменьшение интенсивности и уширение максимума светопоглощения.

Таким образом, при выборе оптимальных условий количественного анализа аминокислот следует учитывать влияния рН среды, времени установления равновесия при образовании раствора аминокислоты в определенном интервале концентрации при соблюдении основного закона светопоглощения (абсорбционность должна находиться в пределах 0,2 - 0,8).

Для количественного определения исследуемых аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана, гистидина и цистеина) следует применять способ градуировочного графика. Для водных растворов, содержащих смесь индивидуальных ароматических и гетероциклических аминокислот, величина абсорбционности будет представлять собой сумму абсорбционностей определяемых компонентов. Этот принцип аддитивности Фирордта выполняется при отсутствии между этими компонентами химического или другого типа взаимодействия, оказывающего влияния на спектральные характеристики поглощающих веществ.

В данном учебном пособии излагаются основы метода абсорбционной спектроскопии (спектрофотометрии) в современном аспекте. Приведены примеры применения абсорбционно-спектрофотометрического метода для изучения равновесий в растворах аминокислот, а также дан ряд конкретных примеров определения констант диссоциации регентов, констант устойчивости комплексов и их состава. Показано нахождение селективных условий определения изучаемых аминокислот в водных растворах.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Скуг Д. Основы аналитической химии / Д. Скуг, Д. Уэст. М.: Мир, 1979. Т.2. 438 с.
2. Васильев В.П. Аналитическая химия/ В.П. Васильев. М.: Высшая школа, 1989. Т.2. 384 с.
3. Основы аналитической химии. Методы химического анализа: Учеб. для вузов/ Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др.; Под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высшая школа, 1999. 494 с.
4. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии / О.В. Свердлова. Л: Химия, 1985. 248 с.
5. Штерн Э. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии / Э. Штерн, К. Тиммонс. М.: Мир, 1974. 296 с.
6. Бернштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Бернштейн, Ю.Л. Каминский. Л.: Химия, 1975. 232 с.
7. Сайдов Г.В. Практическое руководство по молекулярной спектроскопии / Г.В. Сайдов, О.В. Свердлова. Л.: ЛГУ, 1980. 136 с.
8. Григорьев Я.М. Спектрохимия внутри- и межмолекулярных взаимодействий / Я.М. Григорьев, О.В. Свердлова, О.И. Богачева. Л., 1964. С. 206-228.
9. Полинг Л. Общая химия / Л. Полинг. М., 1964. С.370-372.
10. Савицкая Е.М. Ионнообменная технология биологически активных веществ / Е.М. Савицкая, Л.Ф. Яхонтова, П.С. Ныс. // Ионный обмен. М., 1981. С. 229-248.
11. Гурская Г.В. Структура аминокислот / Г.В. Гурская. М.: Наука, 1966. 159 с.
12. Самсонов Г.В. Ионный обмен. Сорбция органических ионов / Г.В. Самсонов, Е.Б. Тростянская, Г.Э. Елькин Г.Э. Л.: Наука, 1969. 336 с.
13. Селеменев В.Ф. Обменные процессы и межмолекулярные взаимодействия в системе ионит – вода – аминокислота: Автореф. дис.... докт. хим. наук / В.Ф. Селеменев. Воронеж, 1993. 587 с.
14. Hecht D. Correlating hydration shell structure with amino acid hydrophobicity / D. Hecht, L. Tadesse, L. Walters // J. Am. Chem. Soc. 1995. V. 115. P. 3336-3337.
15. Эйзенберг Д. Структура и свойства воды / Д. Эйзенберг, В. Кауцман. Л.: Гидрометеиздат, 1975. 289 с.
16. Бирштейн Т.М. Гидрофобное взаимодействие неполярных молекул / Т.М. Бирштейн // Состояние и роль воды в биологических объектах. М., 1967. С. 16-30.
17. Достижения и проблемы теории сольватации: структурно-термодинамические аспекты / В.К. Абросимов, А.Г. Крестов, Г.А. Альпер и др. М.: Наука, 1998. 247 с.

18. Хургин Ю.И. Гидрофобная гидратация алифатических аминокислот / Ю.И. Хургин, А.А. Баранов, М.М. Воробьев // Известия АН СССР. Сер.хим. 1994. №11. С. 2031-2033.
19. ИК - спектроскопическое изучение состояния воды в диоксане и ацетонитриле / В.А. Сироткин, Б.Н. Соломонов и др. // Журн. структ.химии. 2000. Т.41, №6. С. 1205-1212.
20. Исследование гидратации  $\alpha$  – аминокислот методом абсорбционной миллиметровой спектроскопии / М.М. Воробьев, А.А. Баранов, В.М. Беликов и др. // Известия АН СССР. Сер.хим. 1996. №3. С.618-622.
21. Чабан И.А. Концентрационный интервал разрушения сетки водородных связей воды в водных растворах неэлектролитов / И.А. Чабан, М.Н. Родникова, В.В. Жакова // Биофизика. 1996. Т. 41, вып 2. С. 6.
22. Райхард К. Растворители и эффекты среды в органической химии / К. Райхард. М.: Мир, 1991. 763 с.
23. Каррер П. Курс органической химии / П. Каррер. Л.: Госхимиздат, 1962. 1216 с.
24. Несмеянов А.Н. Начала органической химии / А.Н. Несмеянов, Н.А. Несмеянов. М.: Химия, 1974. Т.2. 744 с.
25. Риман В. Ионнообменная хроматография в аналитической химии / В. Риман, Г. Уолтон; Пер. с англ. Н.К. Галкиной, Г.М. Колосовой и др. М.: Мир, 1973. 375 с.
26. Даванков В.А. Лигандообменная хроматография / В.А. Даванков, Дж. Наврватил, Х. Уолтон. М.: Мир, 1990. 294 с.
27. Определение некоторых  $\alpha$  – аминокислот методами проточно-инжекционного и непрерывного проточного анализа с использованием мембранной экстракции / Н.А. Фицева, И.И. Стойков, И.М. Фицев И.М. и др. // Журн. аналит. химии. 1998. Т.53, №7. С. 729-733.
28. О возможности вольтамперометрического определения  $\alpha$  – аминокислот / В.К. Швядас, И.Ю. Галаев, Н.И. Ляпунова и др. // Вестник МГУ. Сер.2.Химия, 1984. Вып.25, №1. С. 56-58.
29. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот/ В.Ф. Селеменев, В.Ю. Хохлов, О.В. Бобрешова и др. Москва: СТЕЛАЙТ, 2001. 300 с.
30. Казицина Л.А. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопии в органической химии / Л.А. Казицина, Н.Б. Куплетская. М.: Изд-во МГУ, 1979. 240 с.
31. Денисов Г.С. Молекулярная спектроскопия / Г.С. Денисов, Б.С. Терушкин. Л., 1981. Вып.5. С. 232-267.
32. Бахшиев Н.Г., Глебовский Д.Н., Бедрина М.Е. // Журнал прикл. спектроскопии. 1983. Т.38, №5. С. 251-255.
33. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер. М.: Химия. 1985. 946 с.

- 34.Спектрофотометрическое определение цистеина в водном растворе/ О.И. Рожнова, Д.Л. Котова, В.Ф. Селеменев, Т.А. Крысанова // Журн. аналит. химии. 1999. Т.54,№12. С. 1265-1267.
- 35.Спектрофотометрическое определение фенилаланина и тирозина/ В.Ф. Селеменев, В.Ю. Хохлов, Н.Я. Коренман, Е.В. Ловчиновская // Журн. аналит.химии. 1994. Т.49, №4. С. 446-447.
- 36.Абросимов В.К. Влияние связанных с гидратацией  $\alpha$  – аминокислот структурных изменений воды на термодинамические характеристики растворения аргона при 283 – 328 К / В.К. Абросимов, Г.В. Сибрина // Структурная химия. 1990. Т.31, №3. С. 60.
- 37.Гидратационные характеристики ароматических аминокислот / Д.Л. Котова, Д.С. Бейлина, В.Ф. Селеменев и др. // Хим.- фарм. журнал. 2001. Т.35, № 4.С. 44 – 45.
- 38.Спектрофотометрическое определение ароматических и гетероциклических аминокислот в их смесях / А.В. Казначеев, О.Н. Хохлова, В.Ф. Селеменев, В.Ю. Хохлов, Н.Я. Мокшина // Журн. аналит.химии. 2000. Т.55, №4. С. 375-377.

Авторы: Котова Диана Липатьевна  
Крысанова Татьяна Анатольевна  
Елисеева Татьяна Викторовна

Редактор Тихомирова О.А.