**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Спектроскопия кругового дихроизма** |  | **ОФС.1.2.1.1.0013** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0013.18** |

|  |
| --- |
|  |

Спектроскопия кругового дихроизма (КД-спектроскопия) основана на анизотропии оптически активных молекул при пропускании света, поляризованного по правому или левому кругу.

**Область применения**

КД-спектроскопию используют в основном для изучения структуры органических молекул, обладающих оптической изомерией. С помощью данного метода можно дифференцировать вклады полос поглощения различных изомеров в суммарную оптическую активность исследуемого образца. Этот метод используют для анализа смесей оптических изомеров биологически активных веществ, для контроля качества лекарственных средств. Кроме того, КД-спектроскопию широко используют для определения количества белка и контроля за его вторичной структурой в растворах (т.е. за денатурационными изменениями).

**Метод**

При прохождении через любую оптически активную среду плоскополяризованного света он становится эллиптически поляризованным. Данное явление связано с различными величинами поглощения средой двух волн, составляющих этого света, с противоположной круговой поляризацией. Разность этих величин поглощения называют круговым дихроизмом. Полученные в ходе эксперимента спектры кругового дихроизма сравнивают со стандартными спектрами КД. Благодаря этому получают качественный и количественный состав исследуемого образца. Метод КД обладает высокой чувствительностью (вплоть до анализа десятков микрограммов субстанции).

***Методика***

Из образцов готовят растворы одинаковой концентрации. Концентрацию подбирают таким образом, чтобы при максимуме поглощения исследуемого вещества оптическая плотность составляла примерно 1.

Растворы помещают в кварцевую кювету и проводят измерение КД на соответствующем приборе в указанном диапазоне длин волн. Далее проводят анализ полученных спектров, сравнивая их со стандартными спектрами.

Непосредственное измерение оптической плотности даёт следующее выражение:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $ΔA=A₁-A₂$, |  |
| где | *ΔA* | – | оптическая плотность кругового дихроизма;  |
|  | *A*1 | − | оптическая плотность для света с левой круговой поляризацией; |
|  | *A*2 | − | оптическая плотность для света с правой круговой поляризацией. |

Величину кругового дихроизма рассчитывают по следующей формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $Δε=ε₁-ε₂=\frac{ΔA}{с·l} $, |  |
| где | *Δε* | – | молярный круговой дихроизм или молярный дифференциальный дихроичный коэффициент поглощения, л/моль−1/см−1;  |
|  | *ε*1 | − | молярный коэффициент поглощения для света с левой круговой поляризацией; |
|  | *ε*2 | − | молярный коэффициент поглощения для света с правой круговой поляризацией; |
|  | *c* | − | концентрация испытуемого раствора, моль/л−1; |
|  | *l* | − | длина оптического пути, см. |

Кроме того, для характеристики кругового дихроизма также используют следующие единицы:

*Коэффициент асимметрии*:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $g=\frac{Δε}{ε}$*,* |  |
| где | *ε* | – | молярный коэффициент поглощения.  |

*Молярная эллиптичность*

Некоторые типы приборов непосредственно показывают величину молярной эллиптичности *Θ*, выраженную в градусах. При использовании таких приборов молярная эллиптичность может быть рассчитана по следующему уравнению:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $[Θ]=\frac{Θ·M}{c·l·10}$*,* |  |
| где | *[Θ]* | – | величина молярной эллиптичности, градус/см2/децимоль-1;  |
|  | *Θ* | − | величина эллиптичности, показываемая прибором; |
|  | *M* | − | относительная молекулярная масса исследуемого вещества; |
|  | *c* | − | концентрация испытуемого раствора, г/мл; |
|  | *l* | − | длина оптического пути, см. |

Молярная эллиптичность также связана с молярным круговым дихроизмом уравнением:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$[Θ]=2,303·Δε·\frac{4500}{π}≈3300·Δε$$ |  |

Молярную эллиптичность используют в анализе белков и нуклеиновых кислот. В этом случае молярную концентрацию, выраженную в единицах мономерных остатков, рассчитывают исходя из отношения молекулярной массы к числу аминокислот.

Для белков среднее значение относительной молекулярной массы мономерного остатка составляет от 100 до 120 (обычно 115), для нуклеиновых кислот (в виде натриевой соли) – около 330.

**Оборудование**

Основные составляющие КД-спектрометра или, по-другому, дихрографа:

- источник излучения (обычно ксеноновая лампа);

- система круговой поляризации света (двойной монохроматор, кварцевые призмы, двоякопреломляющий модулятор);

- детектор (фотоумножитель);

- усилитель сигнала.

Источником излучения (S) является ксеноновая лампа (рис. 1). Свет проходит через двойной монохроматор (М), оснащённый кварцевыми призмами (Р1, Р2). Линейный пучок, пройдя через первый монохроматор, разделяется на 2 части, поляризованные под прямыми углами во втором монохроматоре. Поляризованный и монохроматический свет проходит через двоякопреломляющий модулятор (Cr), в результате чего получается переменный свет с круговой поляризацией. Затем пучок проходит через испытуемый образец (С) и достигает фотоумножителя (PM), после чего попадает на усилитель, который производит 2 электрических сигнала: одним является прямой ток Vc, а другим – переменный ток с частотой модуляции Vac, характерной для испытуемого образца. Отношение Vac/Vc пропорционально изменению поглощения *ΔА*, которое создаёт сигнал.

Дихрограф способен производить измерения в диапазоне длин волн от 170 нм до 800 нм.



Рисунок 1 – Оптическая схема дихрографа

**Калибровка прибора**

Для проверки *правильности шкалы оптической плотности* используют раствор изоандростерона в диоксане (10 мг изоандростерона растворяют в 10,0 мл диоксана). Снимают КД-спектр в диапазоне от 280 нм до 360 нм. Величина *Δε*, измеренная при 304 нм, должна быть равна +3,3. Возможно также использование раствора (1*S*)-(+)-10-камфорсульфоновой кислоты.

*Линейность модуляции* проверяют обычно с помощью раствора (1*S*)-(+)-10-камфорсульфоновой кислоты в воде (10 мг кислоты растворяют в 10,0 мл воды). Сначала спектрофотометрически определяют точную концентрацию камфорсульфоновой кислоты, используя удельный показатель поглощения при 285 нм, равный 1,49. Далее снимают КД-спектр в диапазоне от 185 нм до 340 нм. Величина *Δε*, измеренная при 290,5 нм, должна быть равна от +2,2 до +2,5, а измеренная при 192,5 нм – от −4,3 до −5. Также возможно использование (1*S*)-(+)- или (1*R*)-(−)-аммония 10-камфоросульфоната.