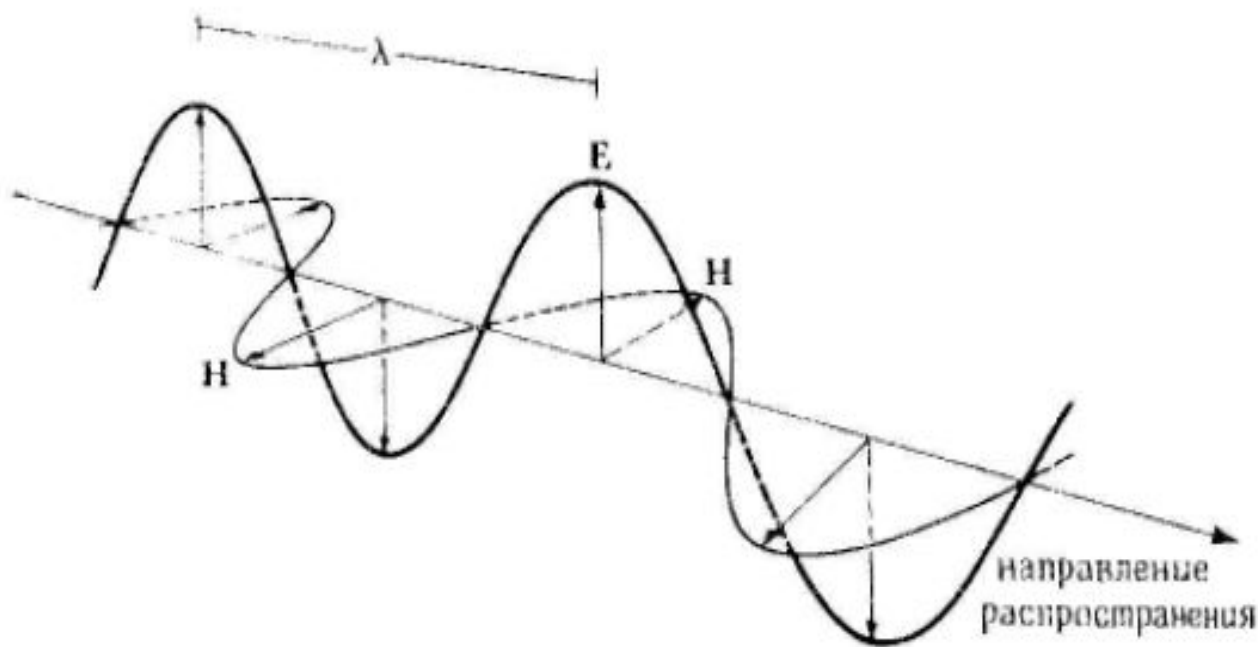


Абсорбционная спектроскопия

(поглощение света веществом)

Параметры электромагнитных излучений



λ [нм]

ν [Гц, s^{-1}]

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]

E [Дж, кал]

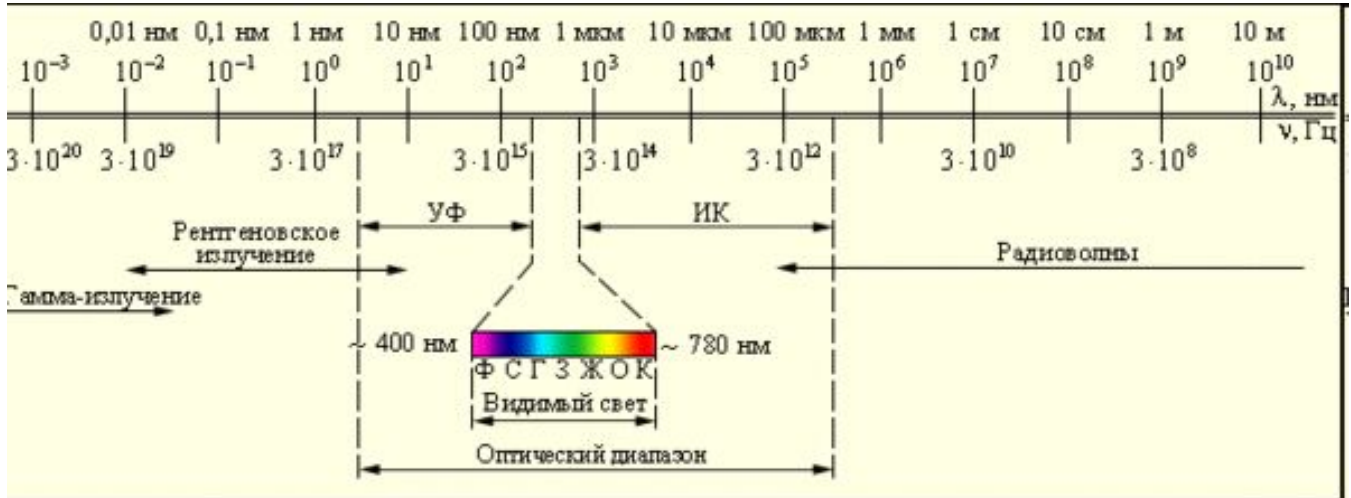
$$\nu = c / \lambda$$

$$\tilde{\nu} = 1 / \lambda$$

$$\Delta E = hc / \lambda = h\nu$$

$$h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Дж*с}$$

Шкала электромагнитных излучений, используемая для исследований в области биологии



- 1) γ – спектроскопия
- 2) Рентгеновская спектроскопия
- 3) Оптическая спектроскопия:
 - УФ-спектроскопия (электронные переходы)
 - Спектроскопия видимого диапазона (электронные переходы)
 - ИК-спектроскопия (колебательные и вращательные переходы)
- 4) Радиочастотная спектроскопия:
 - ЯМР
 - ЭПР

Шкала электромагнитных излучений, используемая для исследований в области биологии

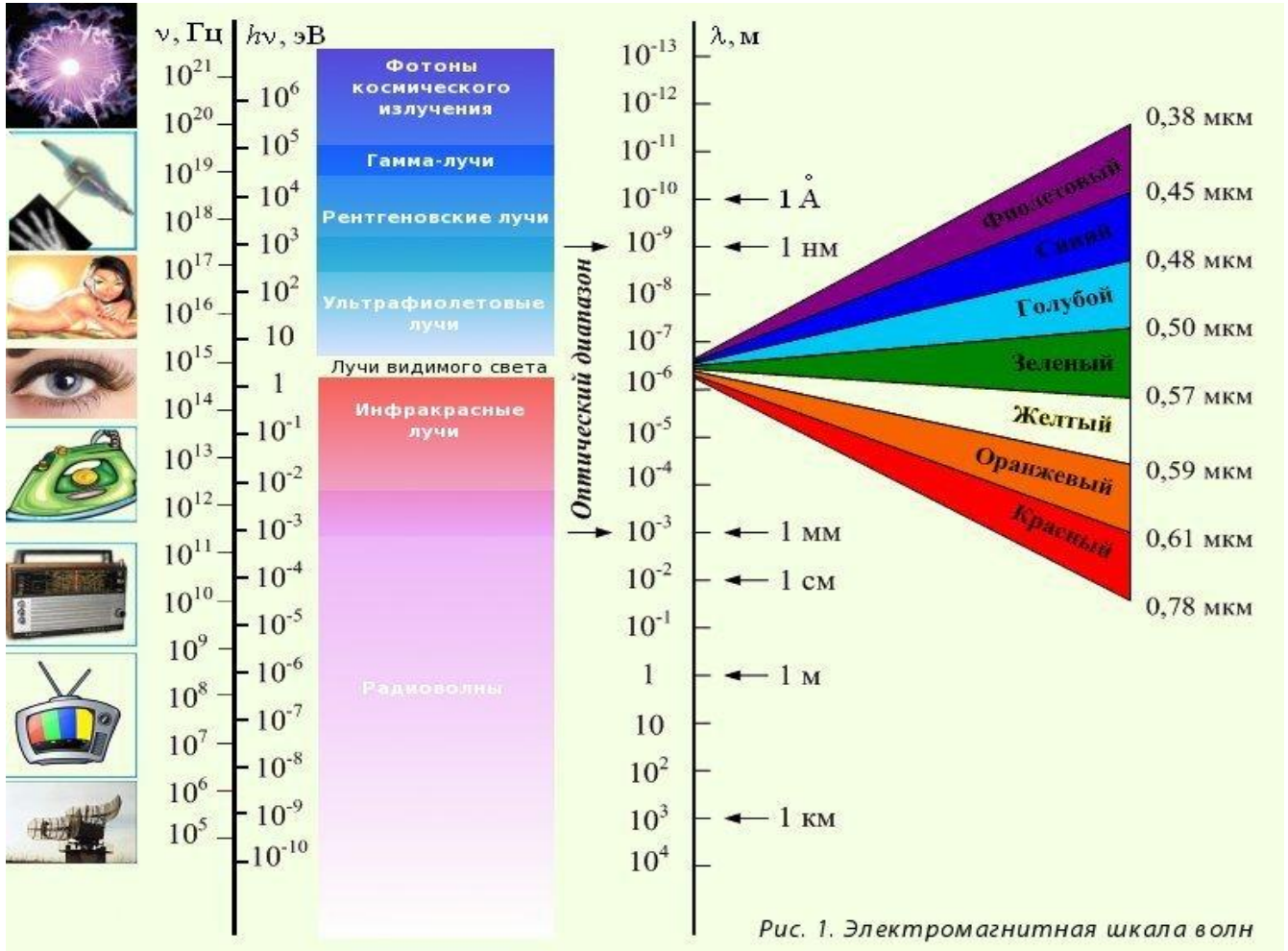
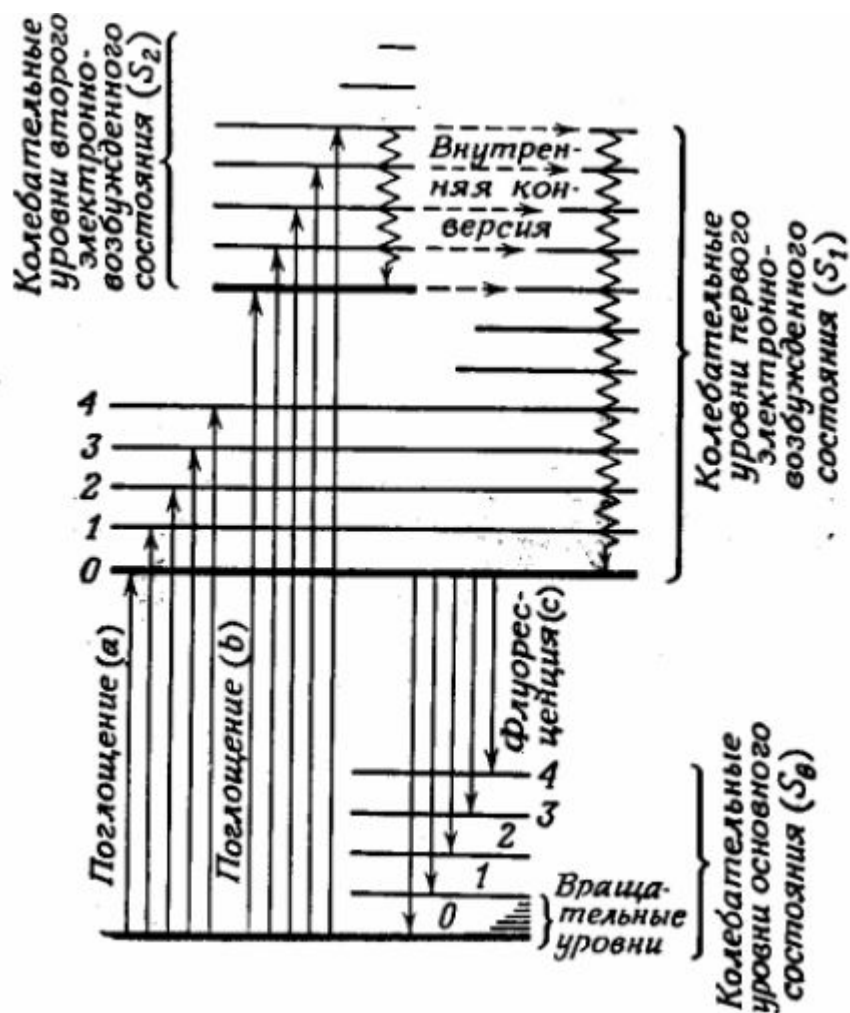
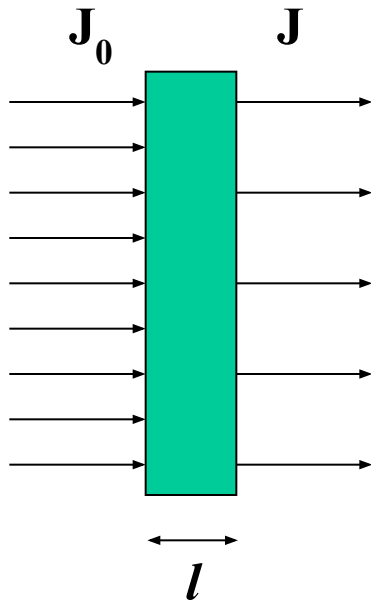


Рис. 1. Электромагнитная шкала волн



Переходы, при которых возникают спектры поглощения и спектры испускания флуоресценции.

Поглощение света. Закон Бугера–Ламберта – Бера



$$J = J_0 10^{-Kl} = J_0 10^{-\varepsilon c_M l}$$

K , ε – коэффициенты поглощения и молярного поглощения,
 c_M – концентрация вещества

$$T = (J / J_0) \cdot 100\% \quad \text{- коэффициент пропускания}$$

$$D = -Lg(T) \quad \text{- оптическая плотность}$$

$$D = \varepsilon c_M l$$

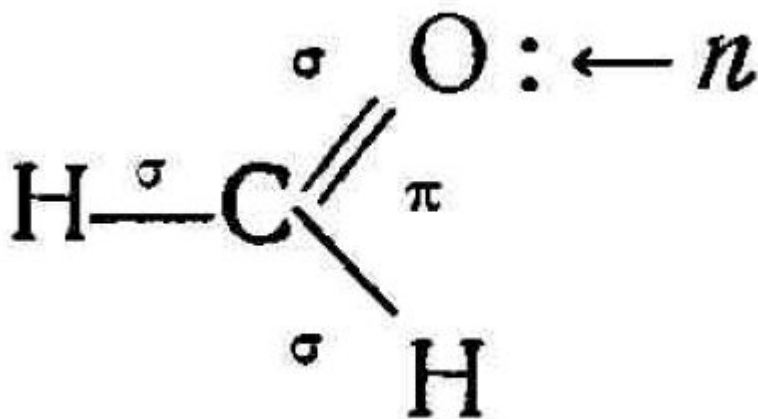
Группы, поглощающие свет в оптическом диапазоне

Хромофоры – химические группы, отвечающие за поглощение света веществом

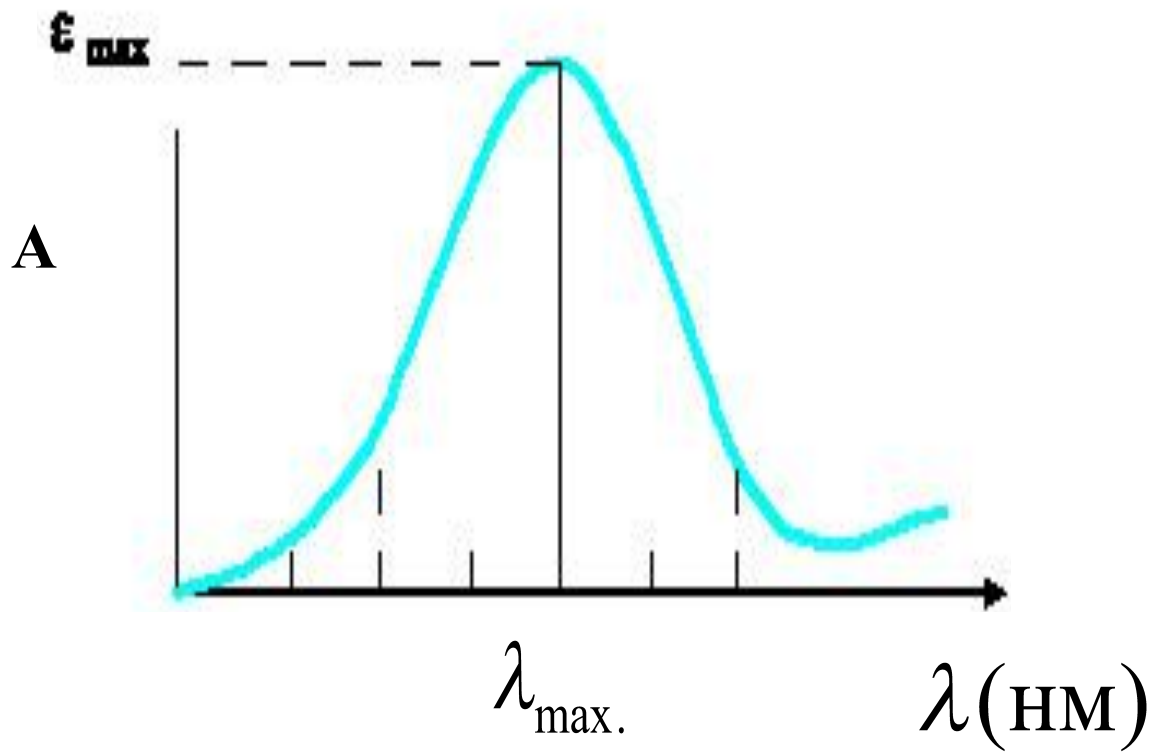
ароматические группы

сопряженные двойные связи

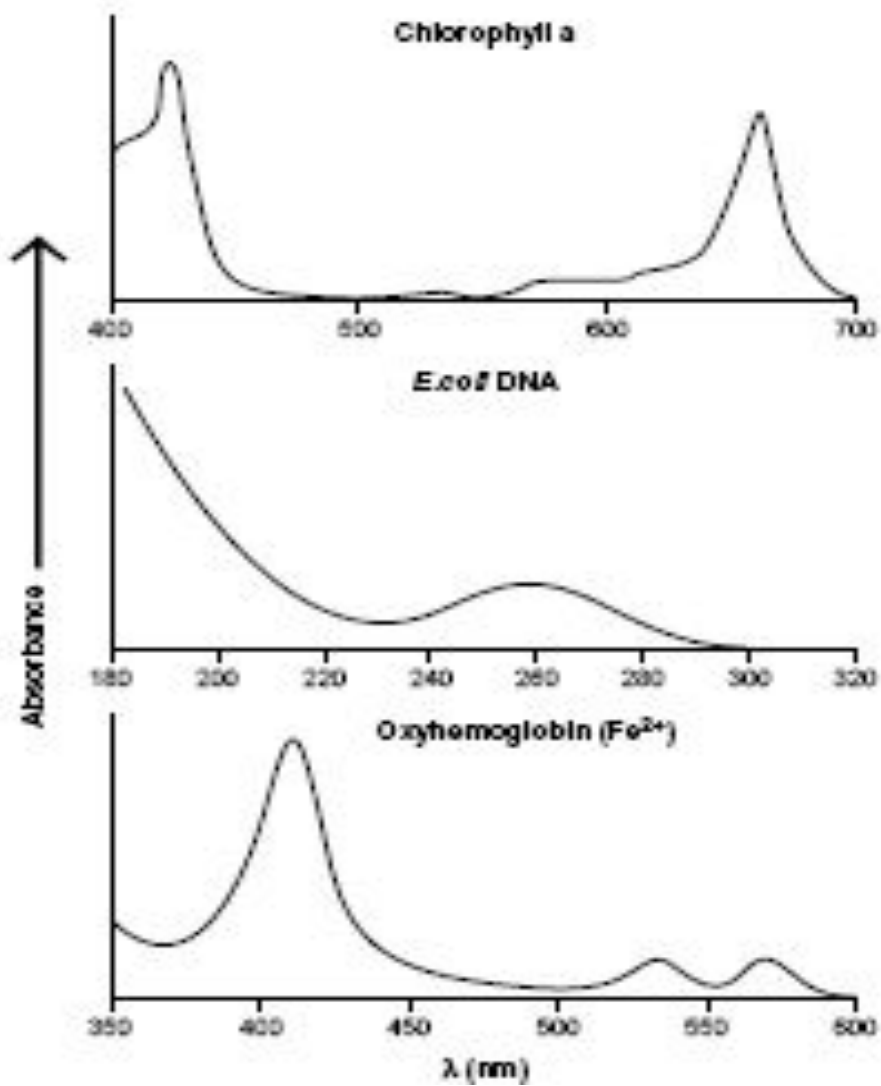
неподеленные пары электронов

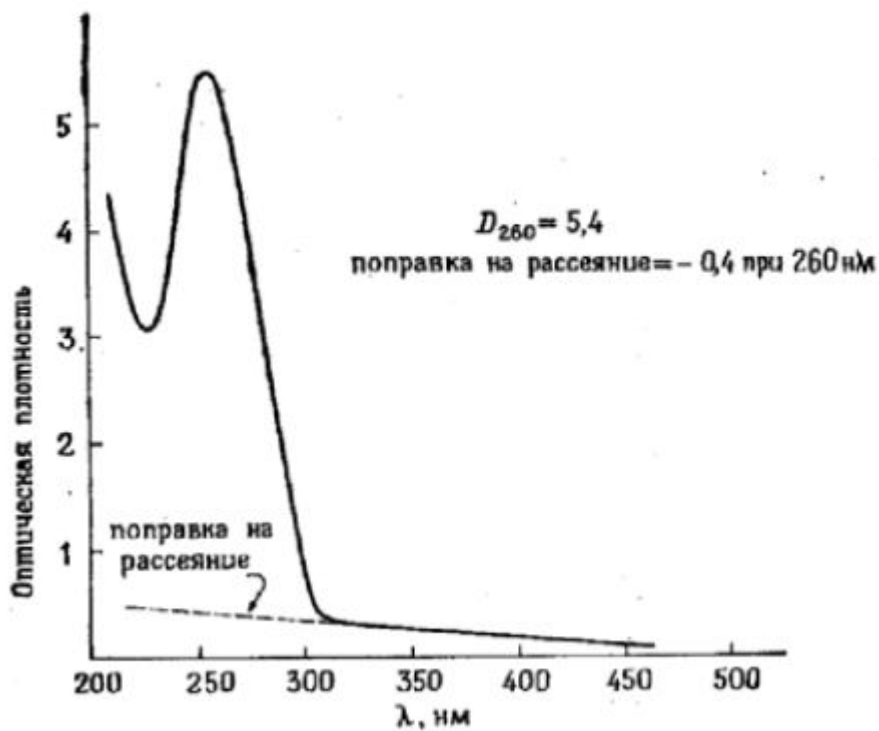


СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ



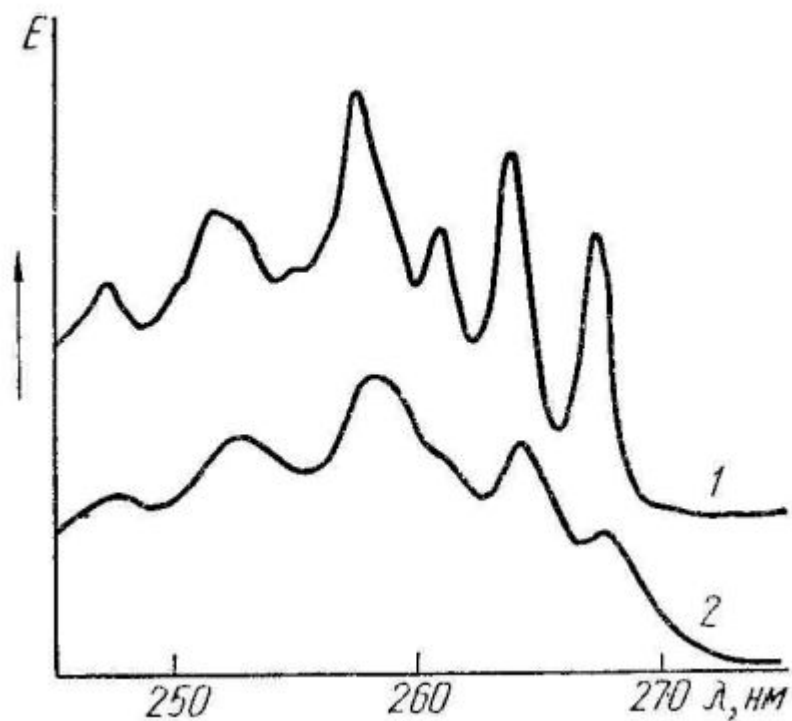
Спектры поглощения биомолекул





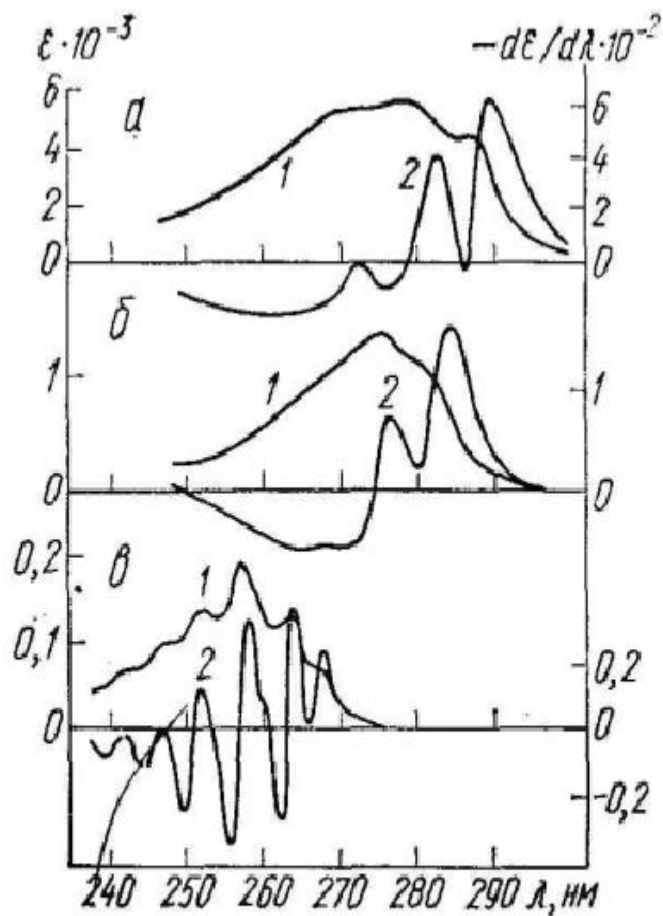
Спектр поглощения фага T7 *E. coli*.

Улучшение разрешения максимумов при снижении температуры



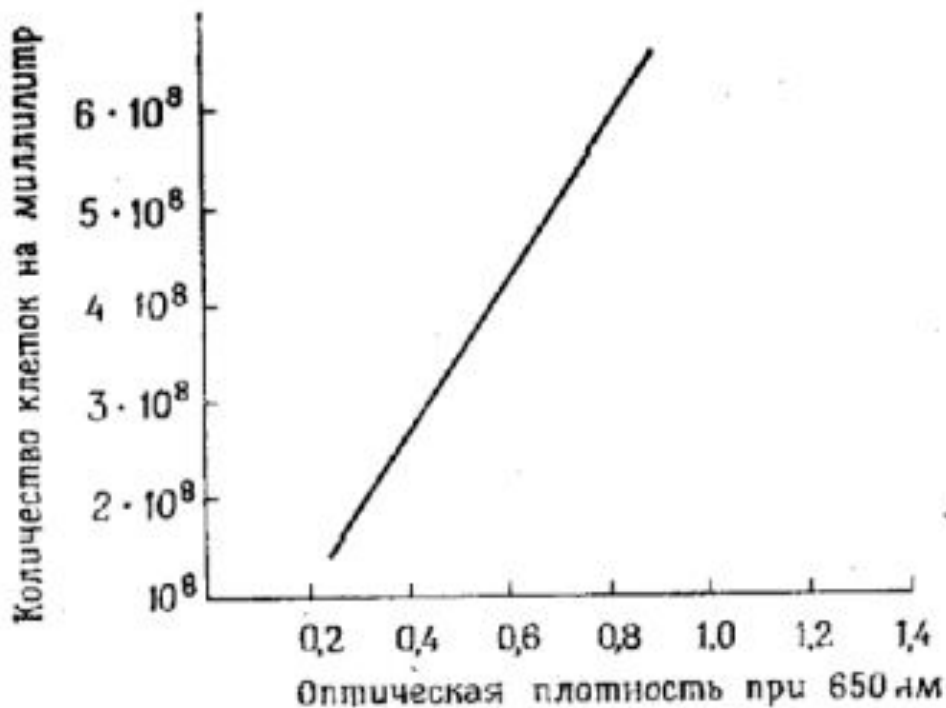
Спектры поглощения *N*-ацетилфенилаланинамида в смеси метанол — глицерин (9 : 1) при 77° (1) и 298° К (2)

Улучшение разрешения максимумов при математической обработке спектров



Спектры поглощения (1) и первые производные их (2) триптофана (а), тирозина (б) и фенилаланина (в) Растворитель — вода, температура 10° С.

Определение концентрации бактерий путем измерения оптической плотности



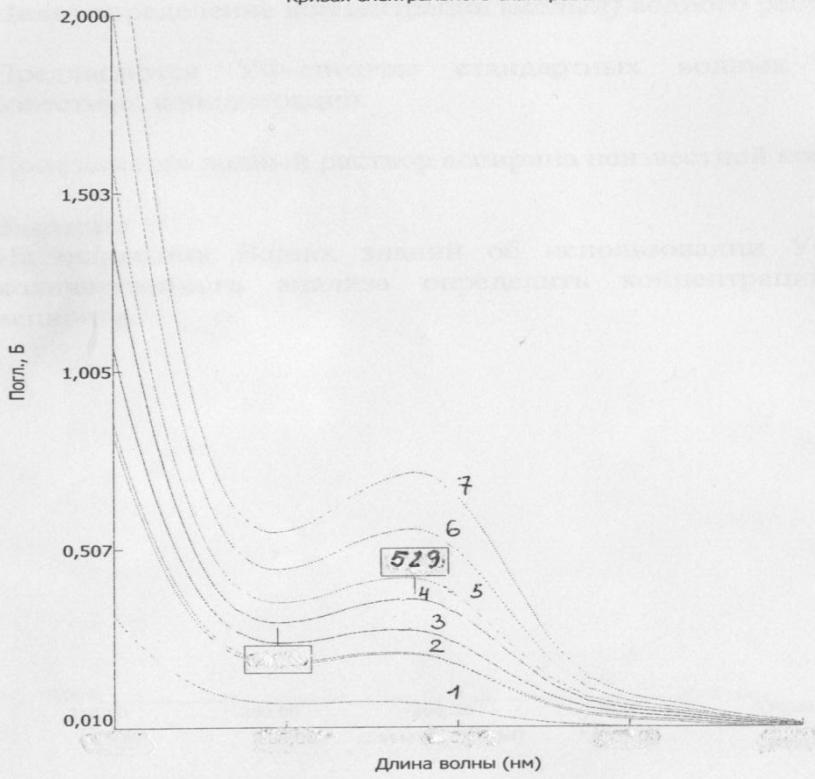
Одно из основных применений УФ-спектроскопии на сегодняшний день – **измерение концентрации биополимеров**.

Для этого используется **закон Бугера-Ламберта-Бера**:

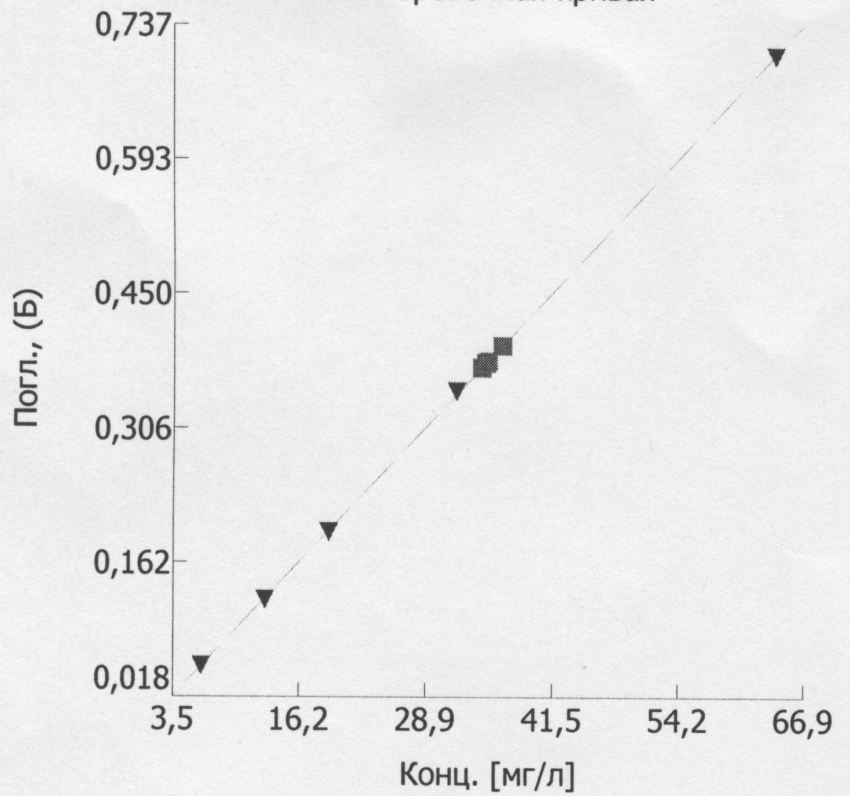
$$D = \varepsilon c_M l$$

как правило коэффициенты экстинкции известны.

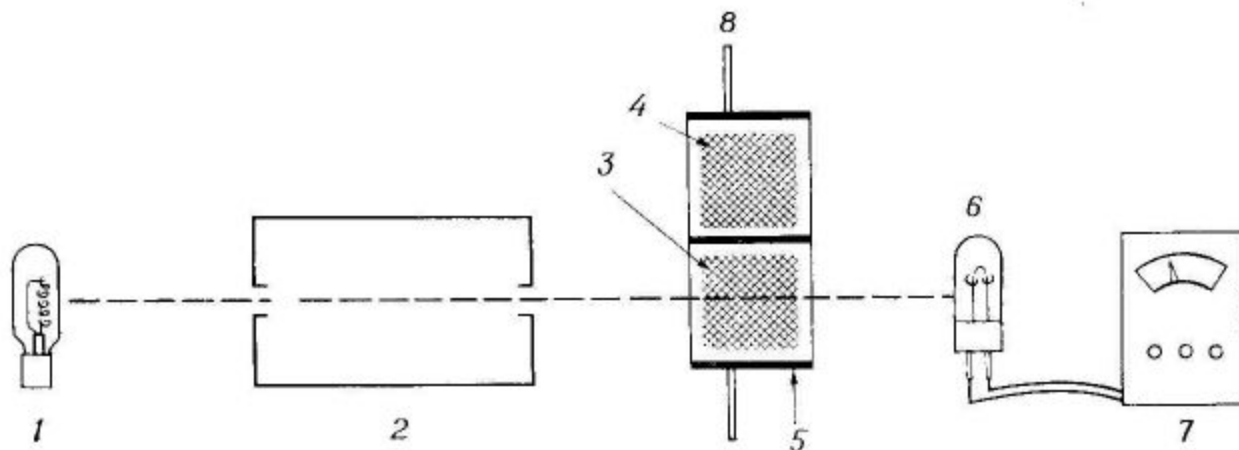
Кривая спектрального сканирования



Калибровочная кривая

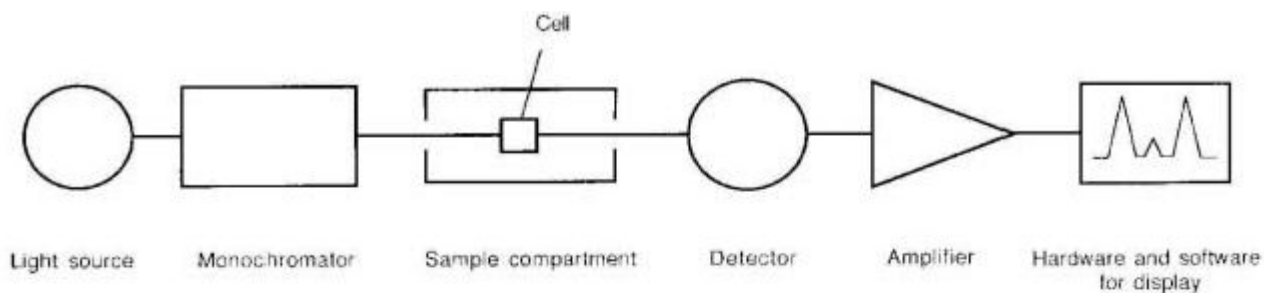


Схематическое устройство спектрофотометра

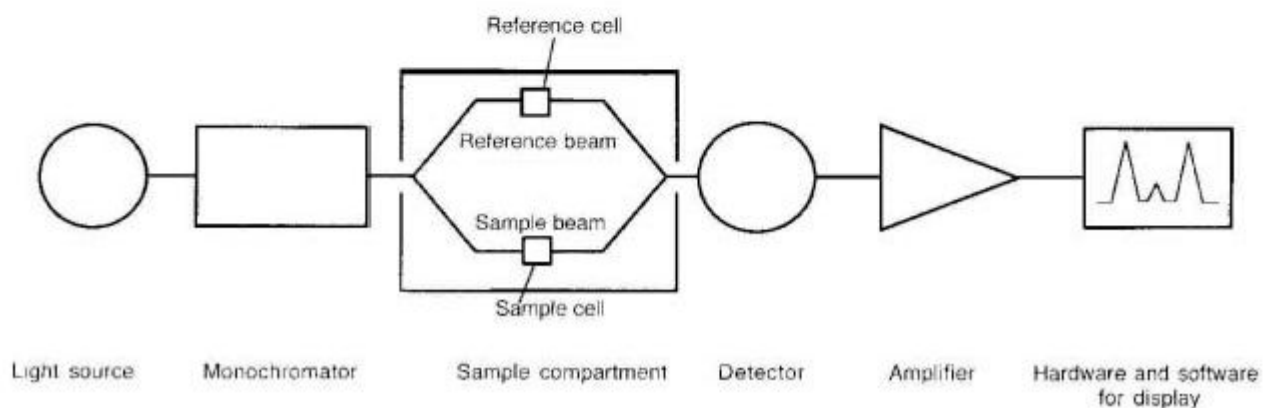


Свет от лампы 1 проходит через монохроматор 2 для выделения пучка света с определенной длиной волны. Образец 3 и растворитель 4 содержатся в двух кюветах, помещенных в держатель кювет 5. Свет проходит через кювету и падает на фотоэлемент 6, выходной сигнал которого регистрируется измерительным прибором 7. Держатель кюветы находится на направляющих 8, так что каждая кювета может быть независимо помещена в пучок лучей.



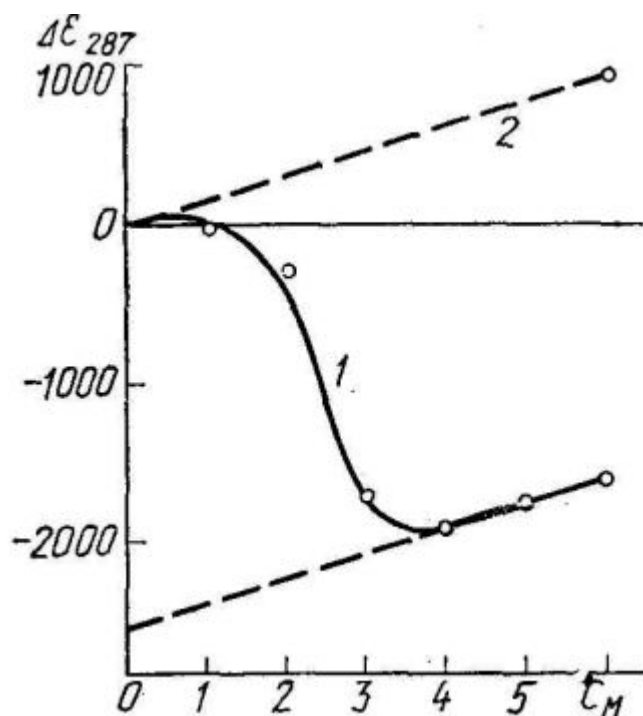


Components and their arrangement in a single beam spectrophotometer.



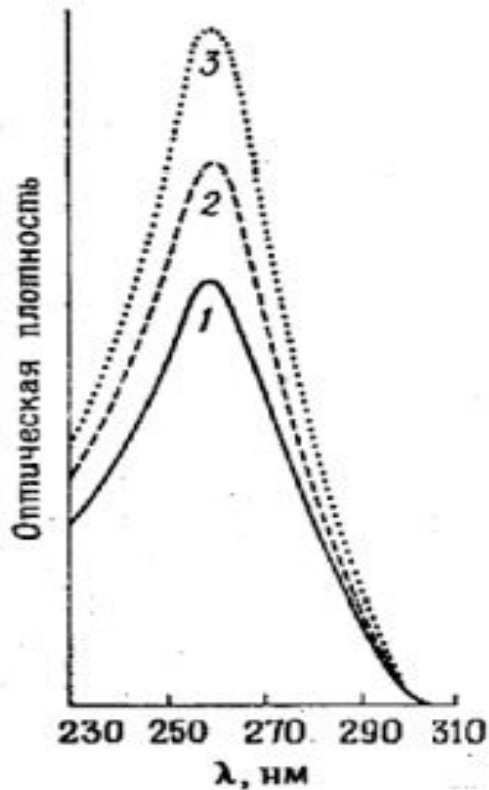
На спектры биополимеров влияет их **локальное окружение**, например, изменение конформации биополимера, изменение среды в которую они помещены (рН, полярность растворителя и т.д.), взаимодействие с другими хромофорами. Данные факторы необходимо учитывать при анализе спектров биополимеров.

Денатурация белка



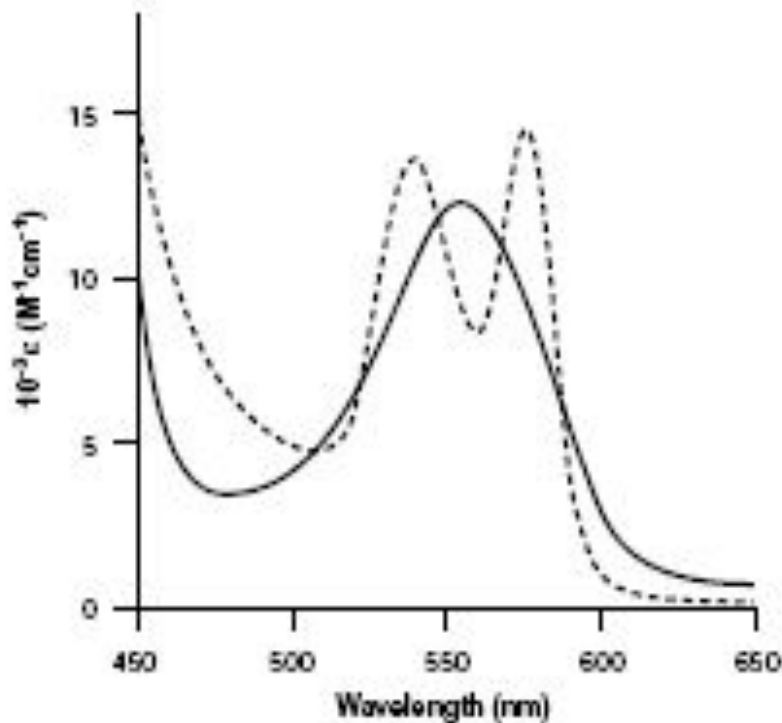
Зависимость $\Delta\epsilon_{287}$ дифференциального спектра рибонуклеазы от концентрации гуанидинхлорида

Денатурация ДНК



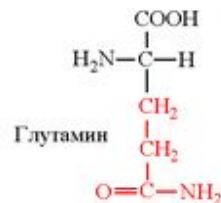
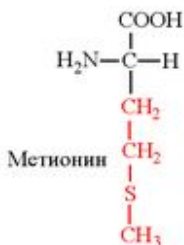
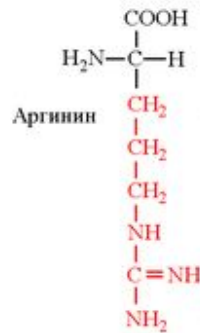
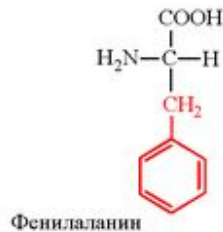
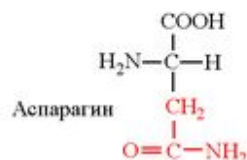
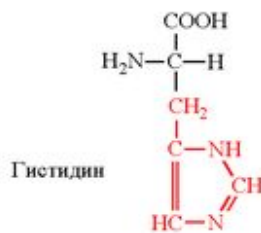
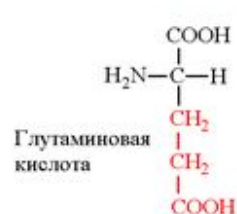
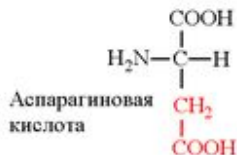
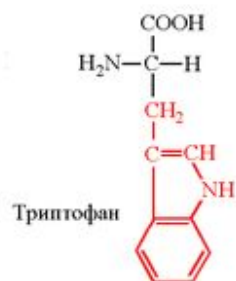
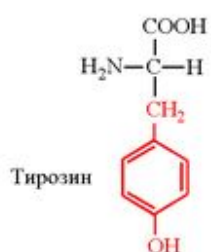
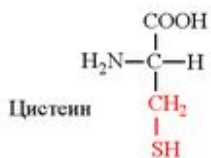
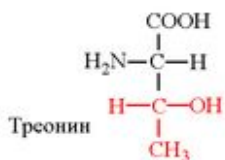
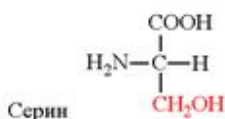
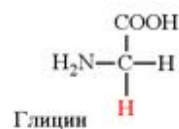
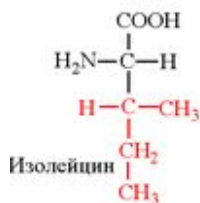
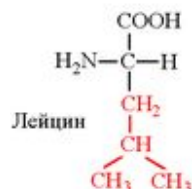
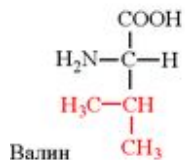
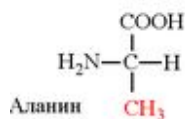
Спектры поглощения ДНК фага Т7 в двухцепочечной (1) и одноцепочечной (2) формах, а также после гидролиза до свободных нуклеотидов (3), показывающие понижение оптической плотности (гипохромия), которое сопровождается образованием более упорядоченной структуры. Спектры получены при одинаковой концентрации.

Окисление гемоглобина

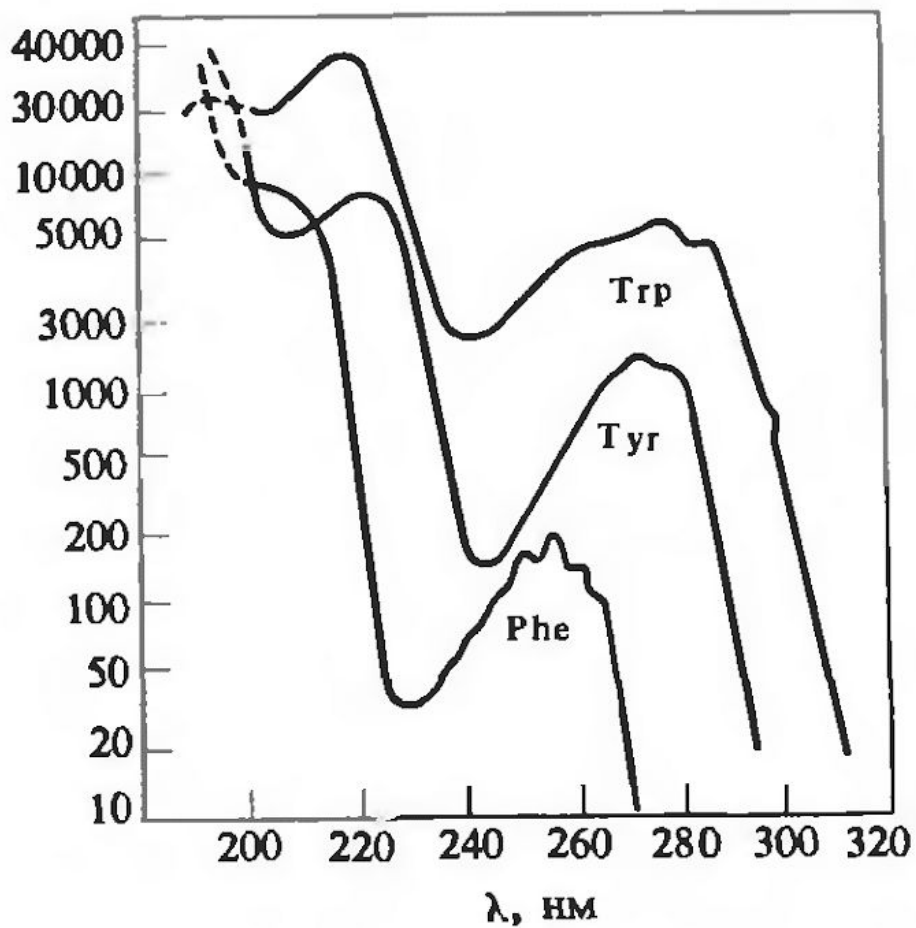


На спектры биополимеров влияет их **локальное окружение**, например, изменение конформации биополимера, изменение среды в которую они помещены (pH, полярность растворителя и т.д.), взаимодействие с другими хромофорами. Данные факторы необходимо учитывать при анализе спектров биополимеров.

Спектры поглощения аминокислот



Спектры поглощения аминокислот



Нуклеиновые кислоты: поглощение в УФ области определяется гетероциклическими основаниями

Спектры поглощения нуклеотидов

