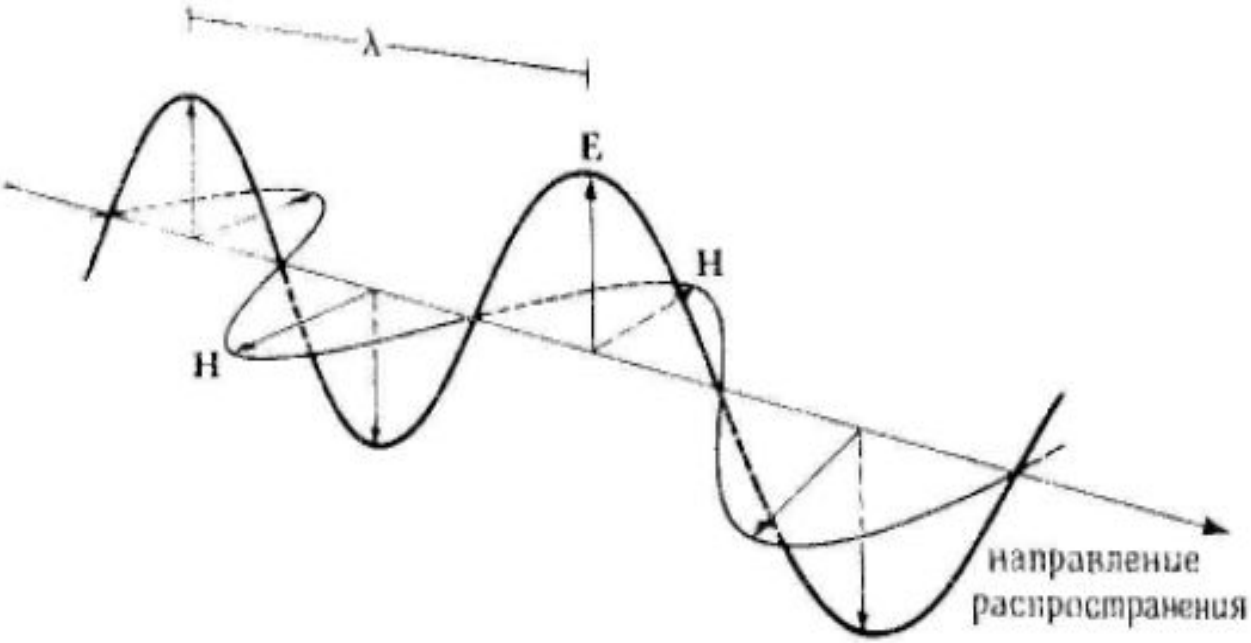
Абсорбционная спектроскопия

(поглощение света веществом)

Параметры электромагнитных излучений



λ [нм]

ν [Гц, c^{-1}] $\nu = c / \lambda$

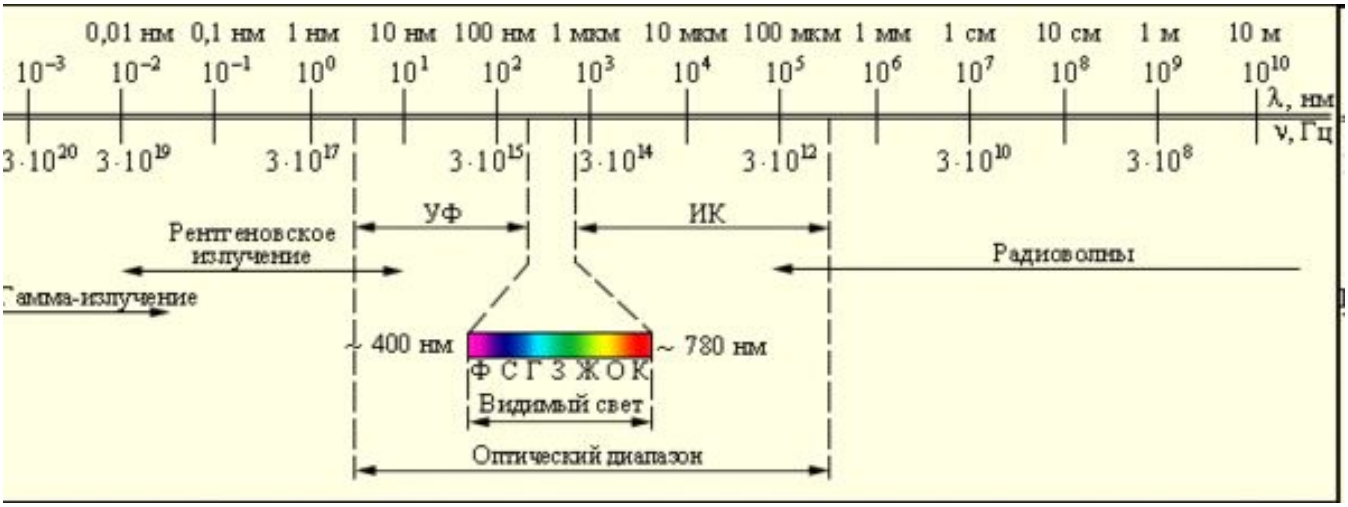
$\bar{\nu}$ [$см^{-1}$] $\tilde{\nu} = 1 / \lambda$

E [Дж, кал]

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

$$h = 6{,}626 \bullet 10^{-34}$$ **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 перходы)

4) Радиочастотная спектроскопия:
   - ЯМР
   - ЭПР

Шкала электромагнитных излучений, используемая для исследований в области биологии

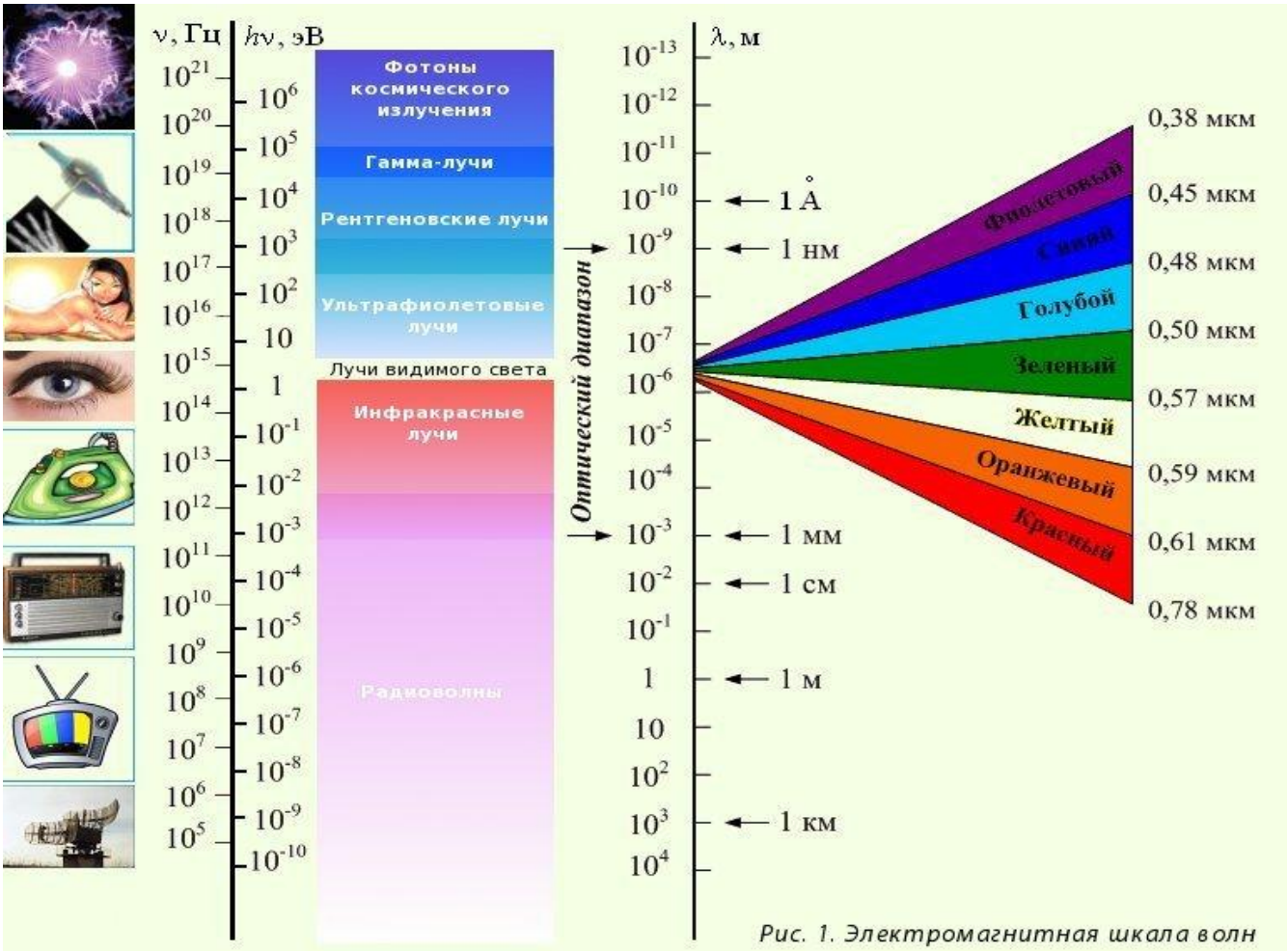
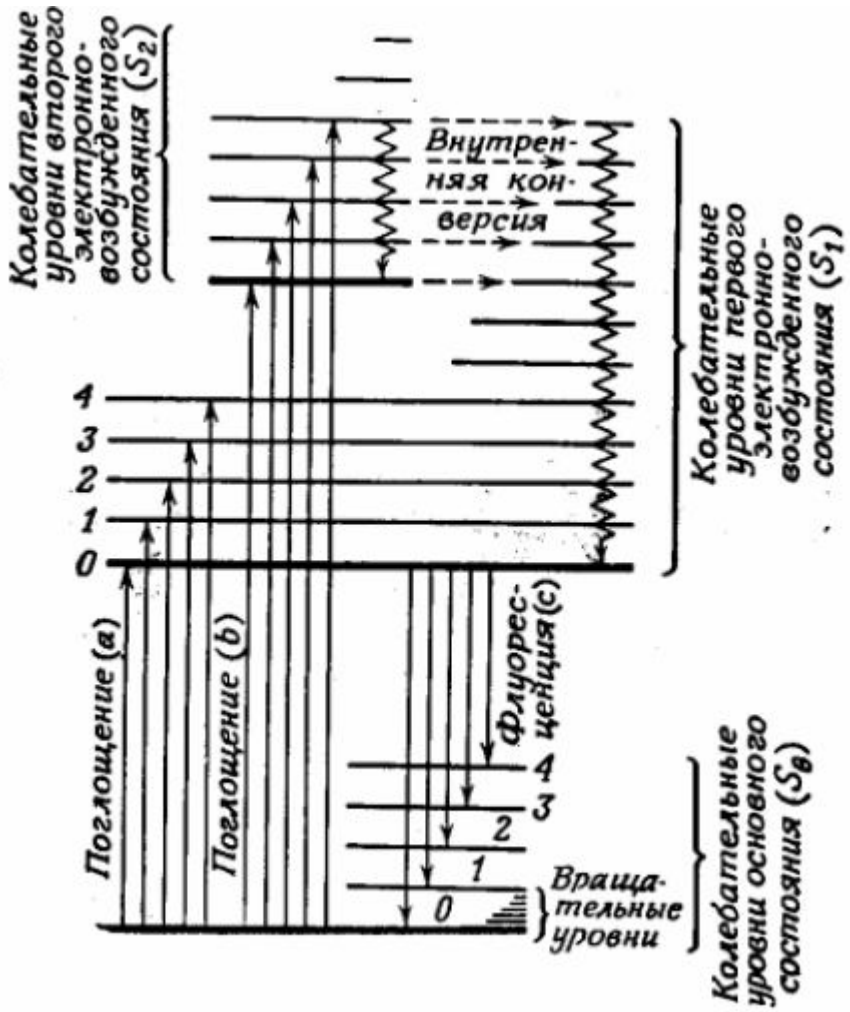
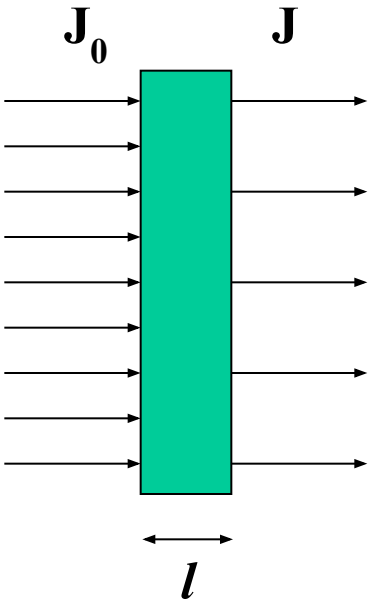


Рис. 1. Электромагнитная шкала волн



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

$$T = (J / J_0) \cdot 100\%$$ -коэффициент пропускания

$$D = -Lg(T)$$ - оптическая плотность

$$D = \varepsilon c_M l$$

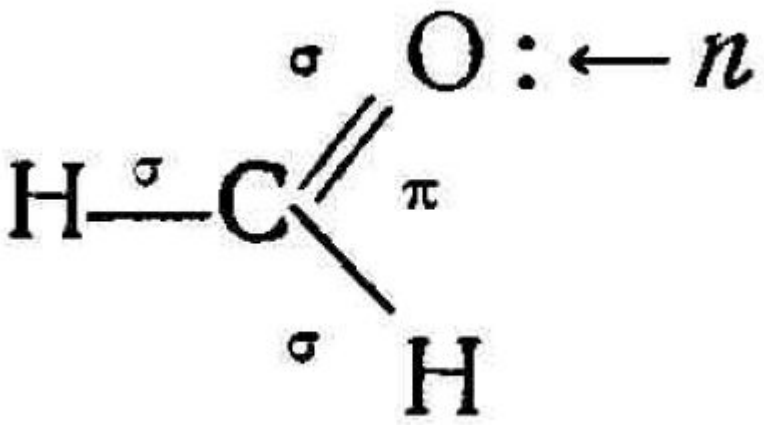
Группы, поглощающие свет в оптическом диапазоне

Хромофоры – химические группы, отвечающие за поглощение света веществом

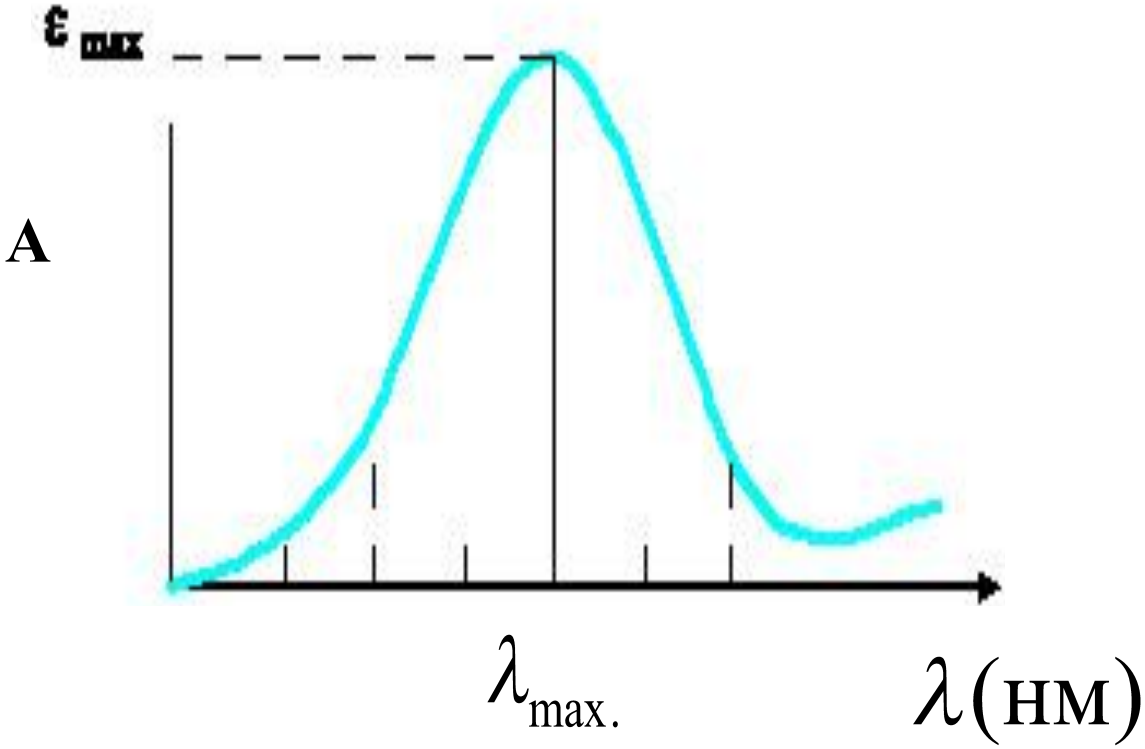
ароматические группы

сопряженные двойные связи

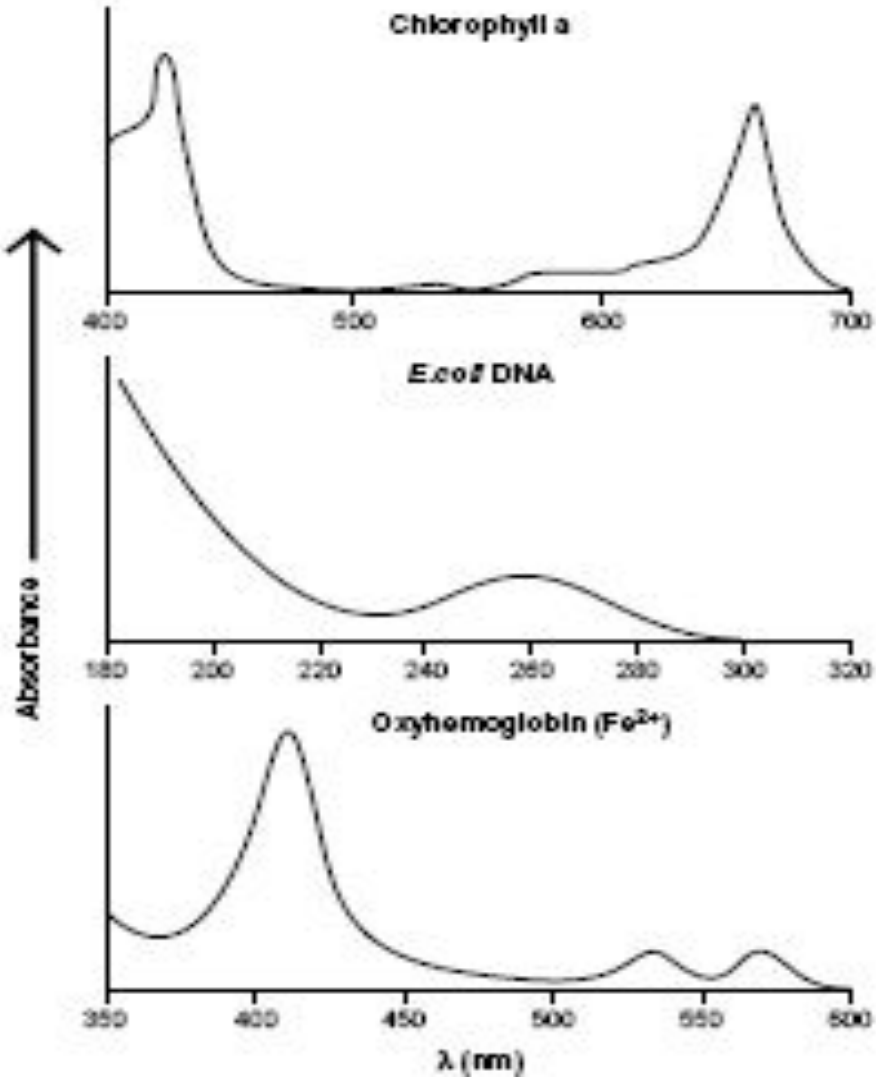
неподеленные пары электронов

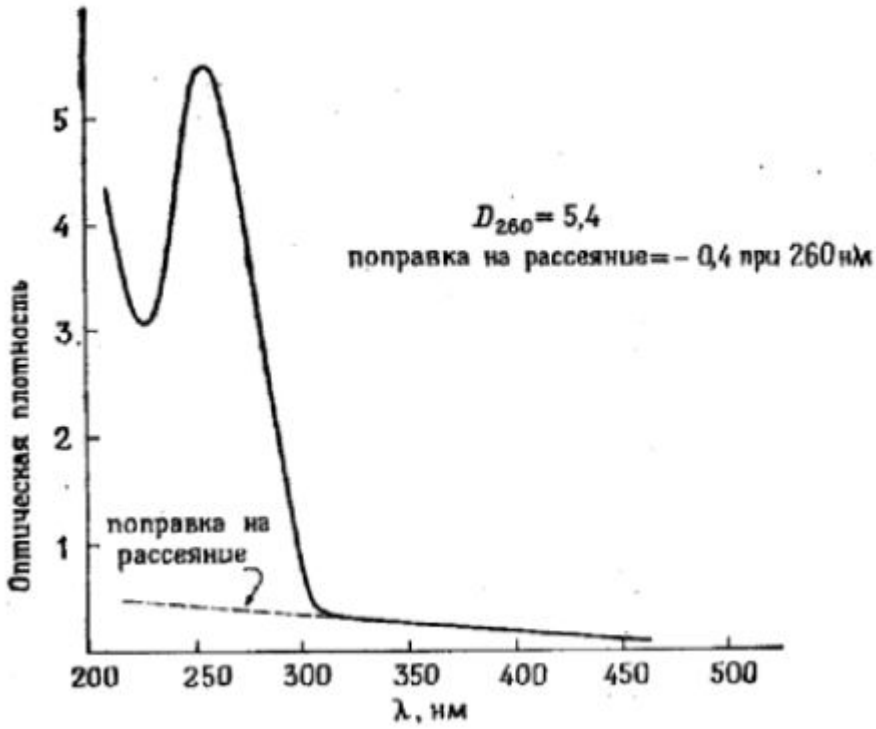


СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ



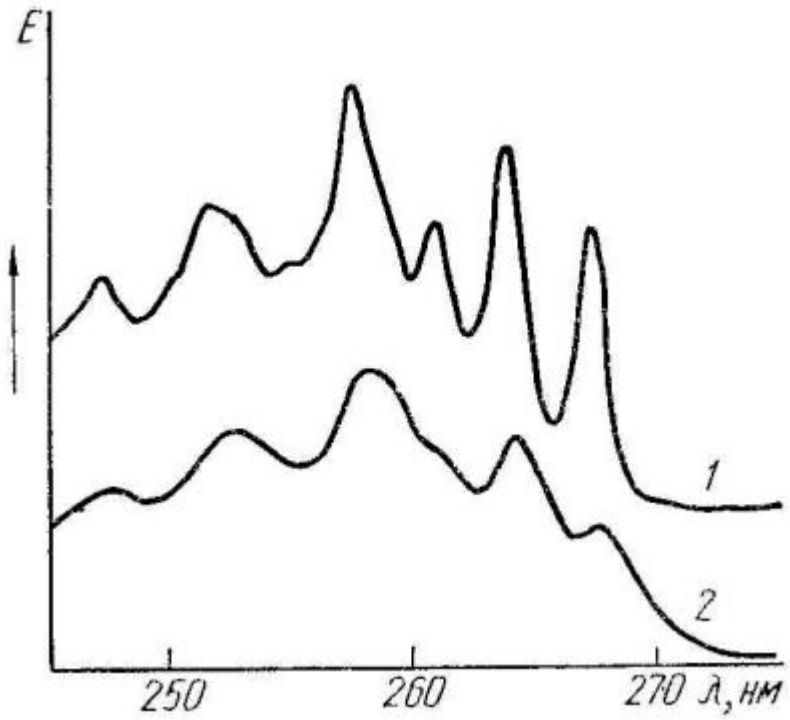
Спектры поглощения биомолекул





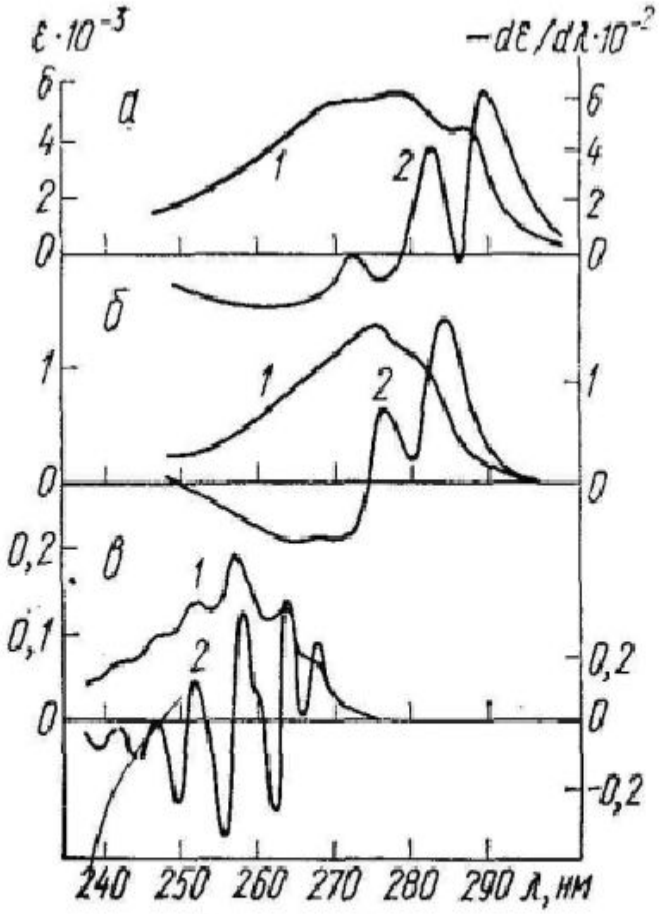
Спектр поглощения фага T7 *E. coli*.

Улучшение разрешения максимумов при снижении температуры



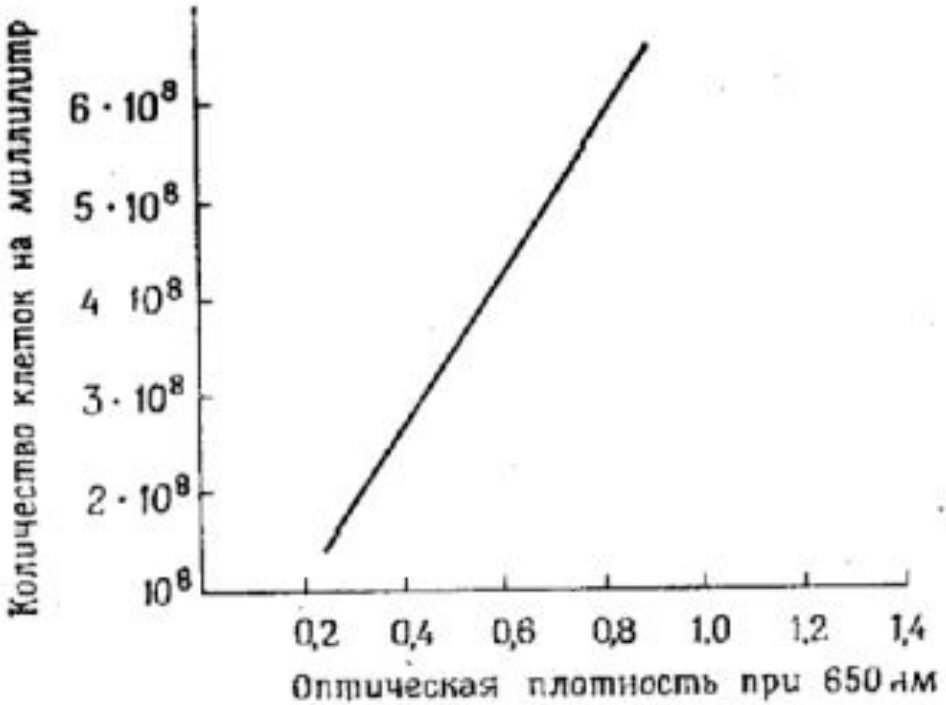
Спектры поглощения *N*-ацетилфенилаланинамида в смеси метанол — глицерин (9 : 1) при 77° (*1*) и 298° К (*2*)

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

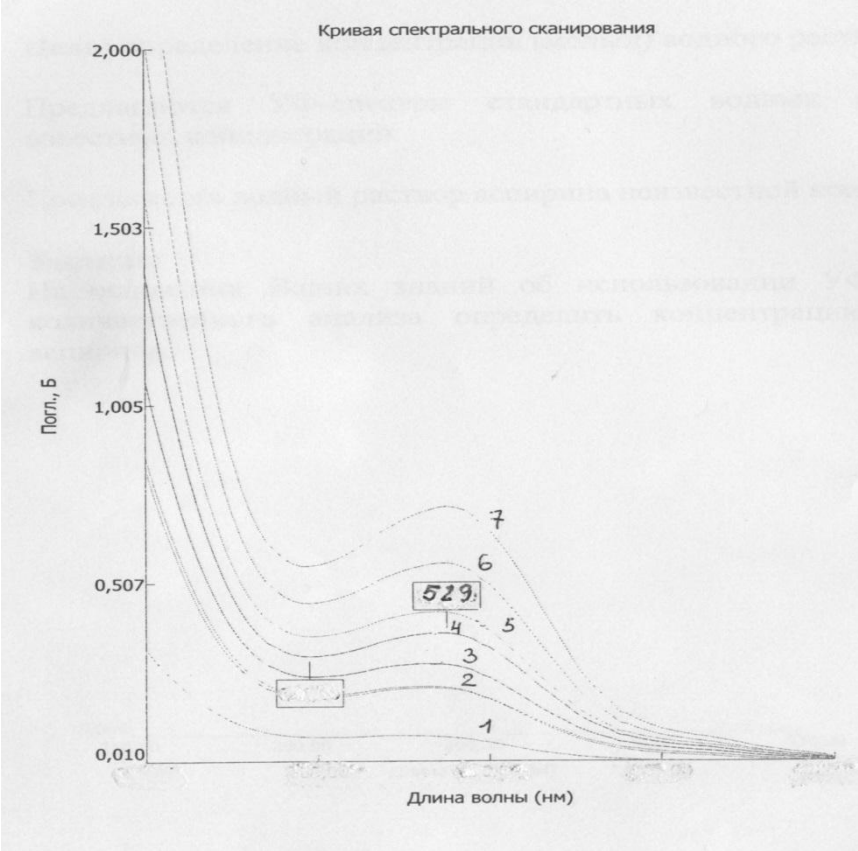


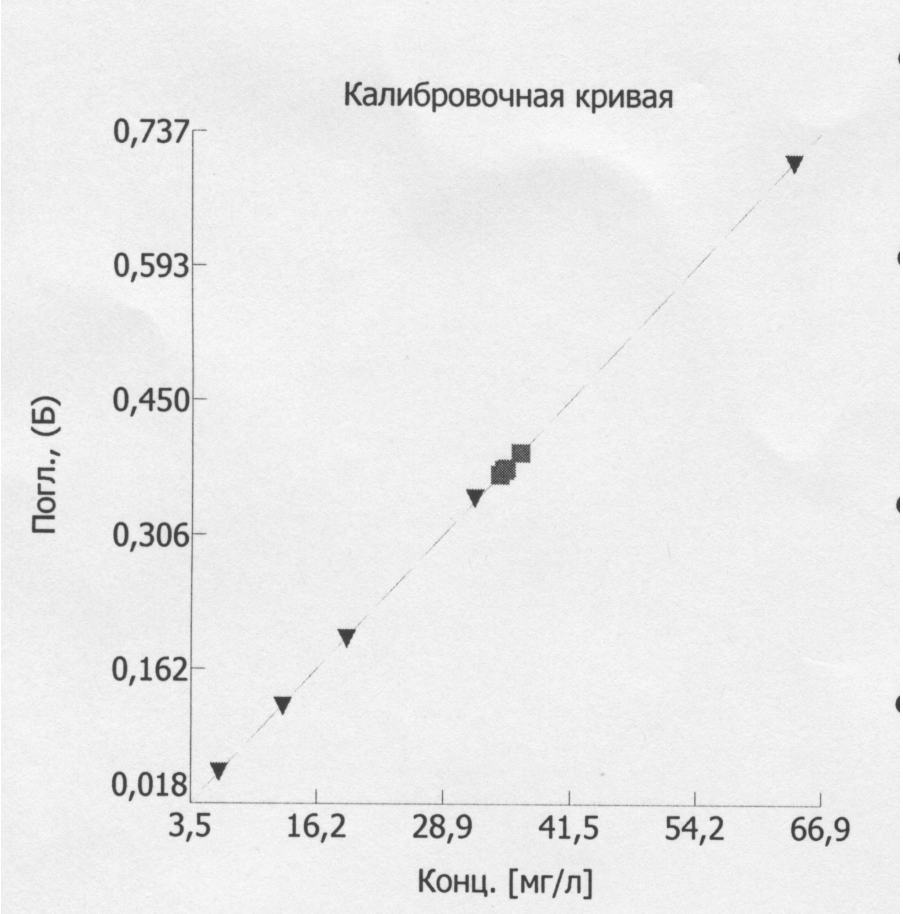
Одно из основных применений УФ-спектроскопии на сегодняшний день – измерение концентрации биополимеров.

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

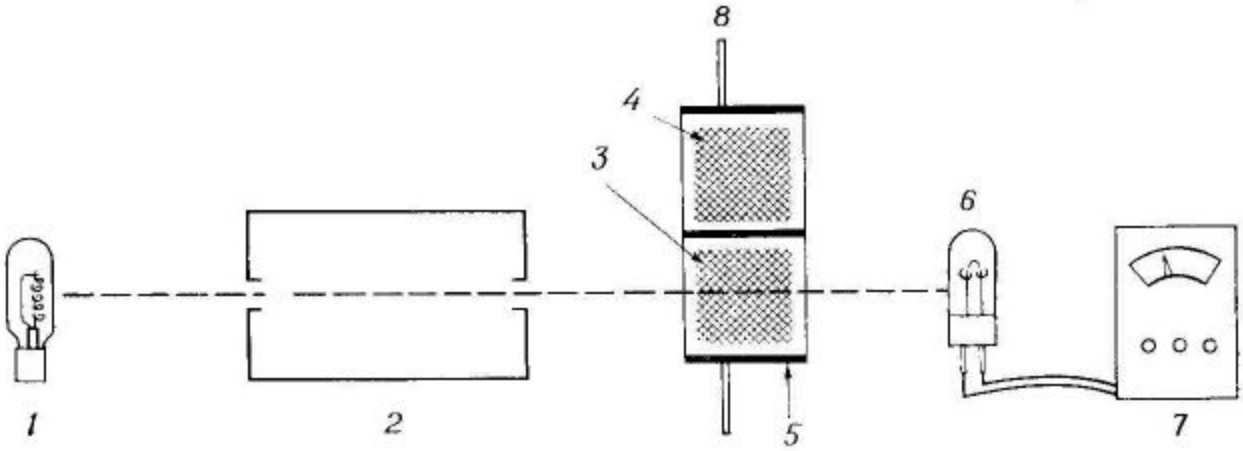
$$D = \varepsilon c_M l$$

как правило коэффициенты экстинкции известны.

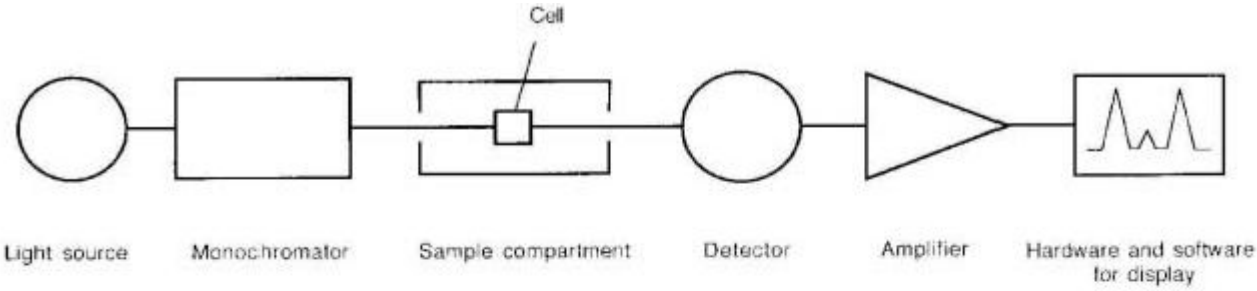

Кривая спектрального сканирования
2,000
1,503
1,005
0,507
0,010
Погл., Б
Длина волны (нм)
7
6
529
5
4
3
2
1


Калибровочная кривая
0,737
0,593
0,450
0,306
0,162
0,018
Погл., (Б)
3,5
16,2
28,9
41,5
54,2
66,9
Конц. [мг/л]

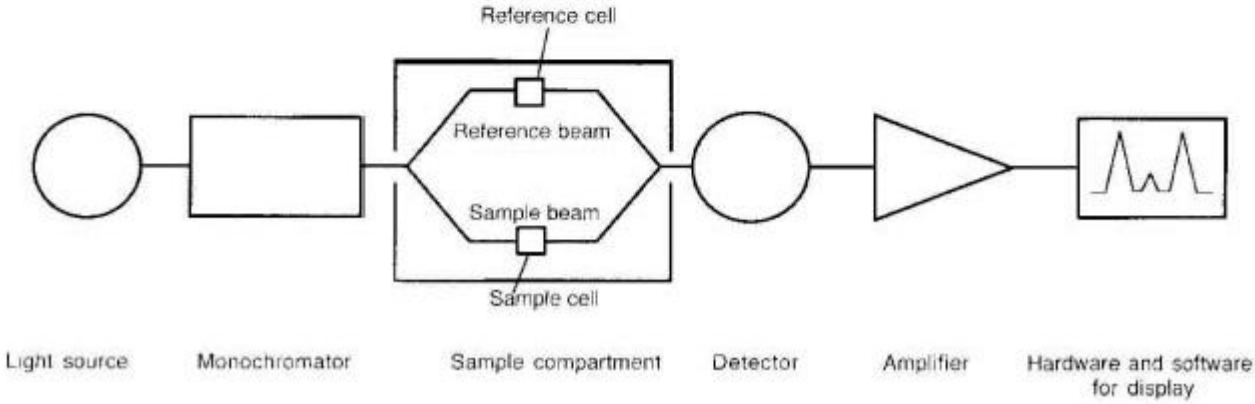
Схематическое устройство спектрофотометра



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.

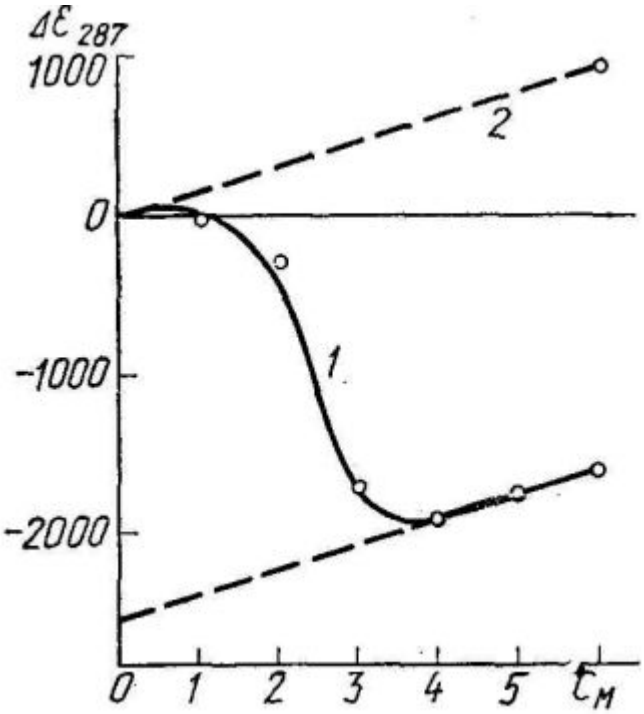


Components and their arrangement in a single beam spectrophotometer.



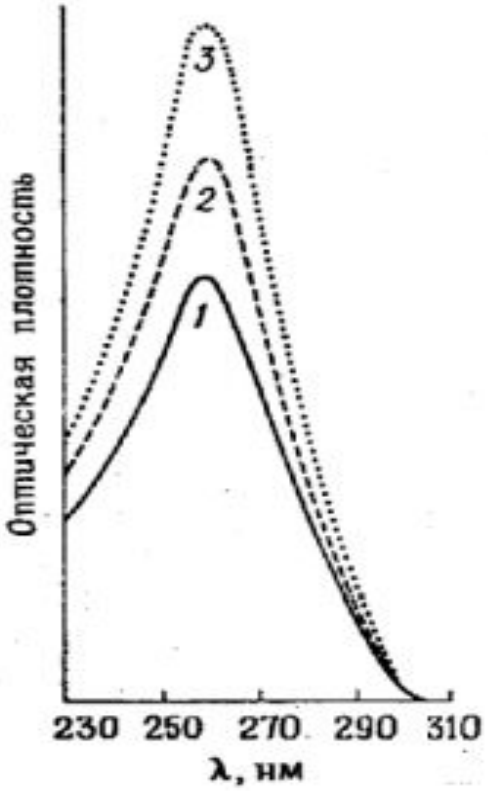
На спектры биополимеров влияет их **локальное окружение**, например, изменение конформации биополимера, изменение среды в которую они помещены (pH, полярность растворителя и т.д.), взаимодействие с другими хромофорами. Данные факторы необходимо учитывать при анализе спектров биополимеров.

Денатурация белка



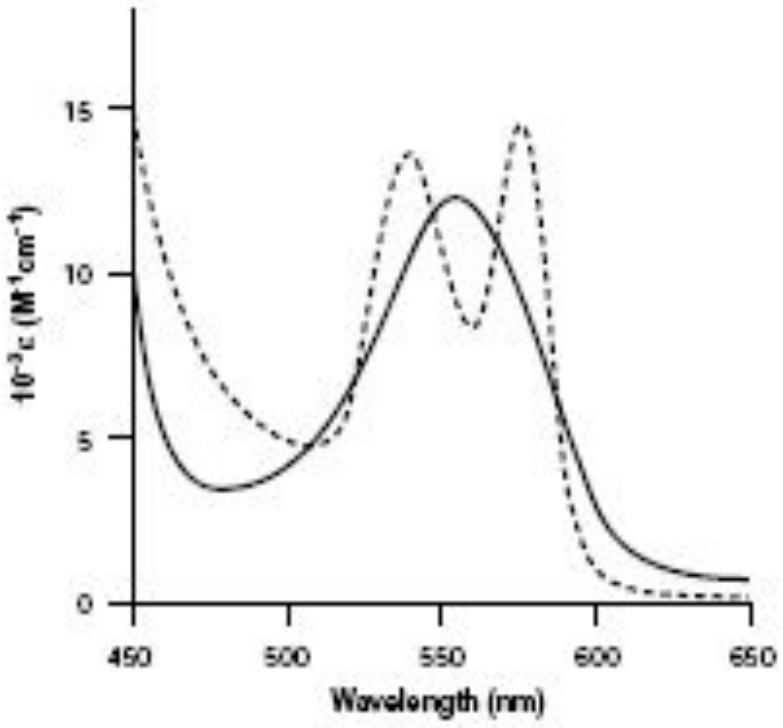
Зависимость $\Delta\varepsilon_{287}$ дифференциального спектра рибонуклеазы от концентрации гуанидинхлорида

Денатурация ДНК



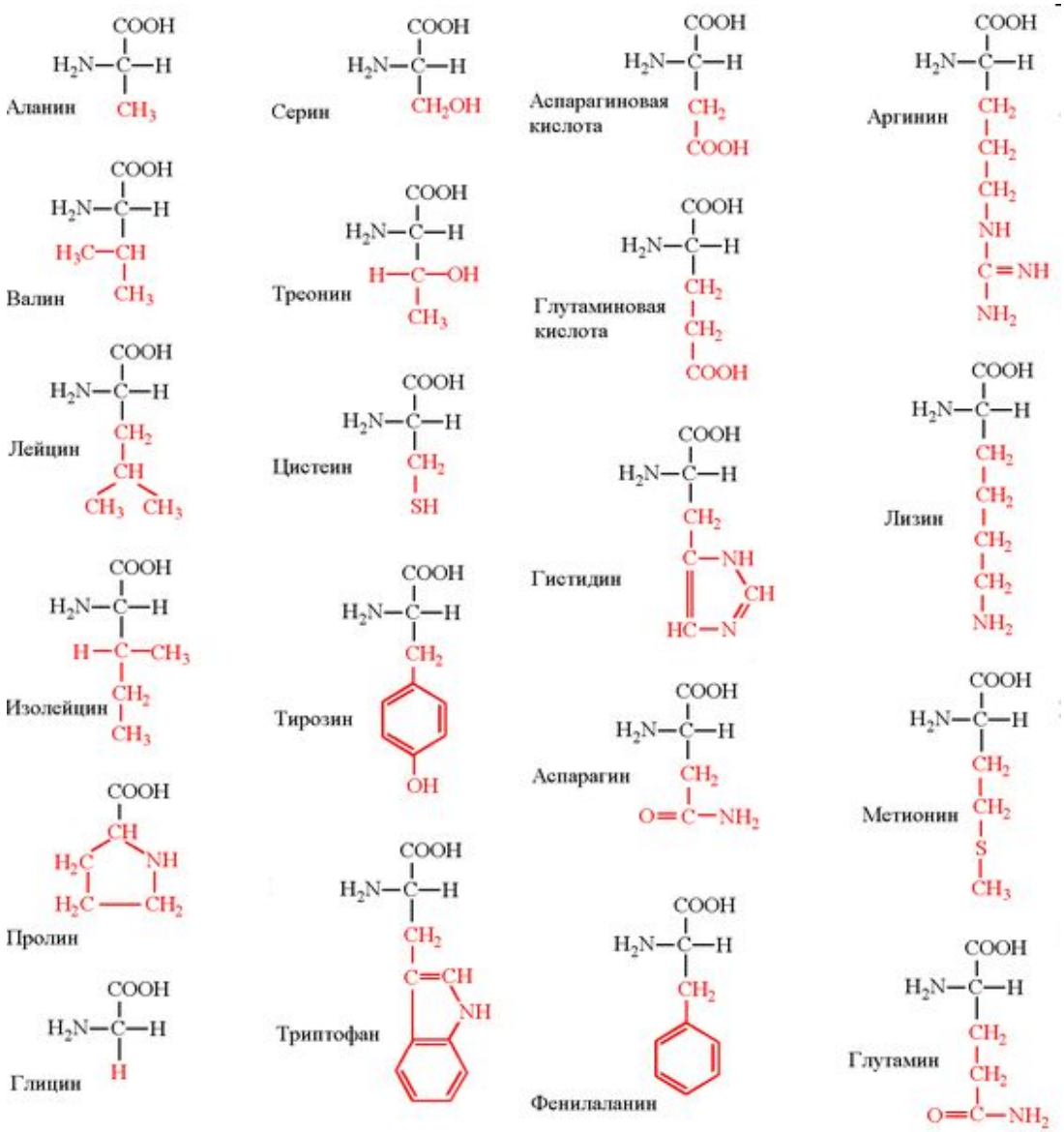
Спектры поглощения ДНК фага Т7 в двухцепочечной (*1*) и одноцепочечной (*2*) формах, а также после гидролиза до свободных нуклеотидов (*3*), показывающие понижение оптической плотности (гипохромию), которое сопровождает образование более упорядоченной структуры. Спектры получены при одинаковой концентрации.

Окисление гемоглобина

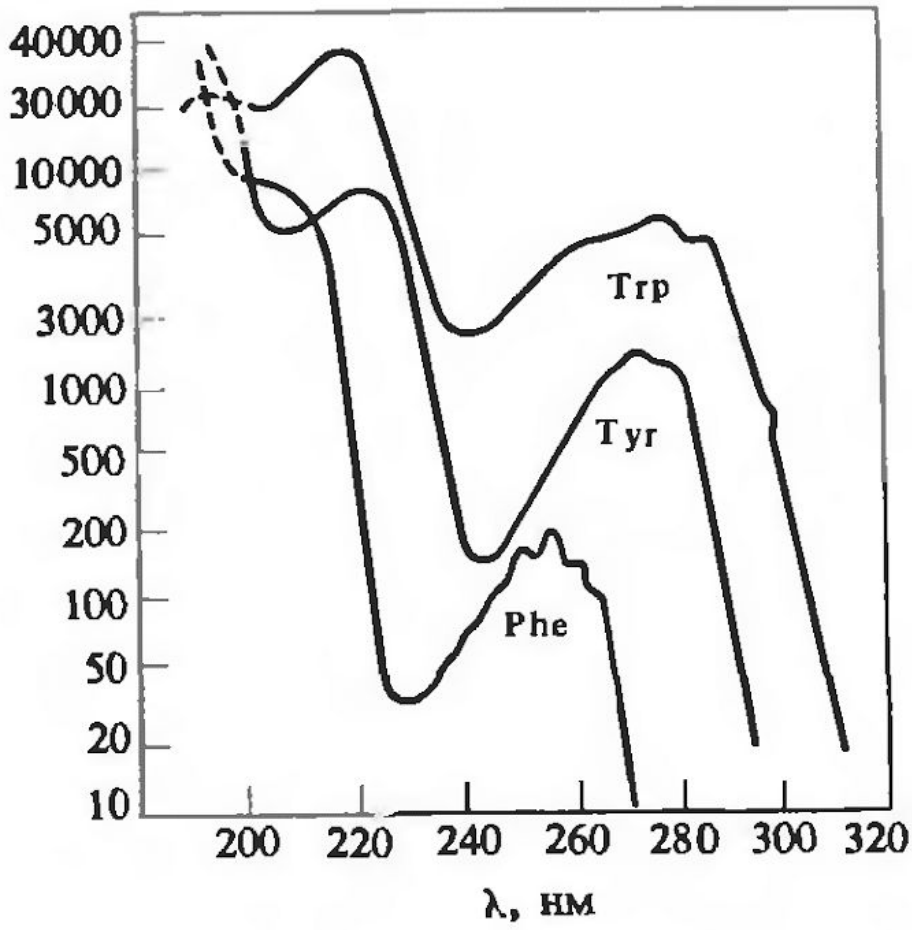


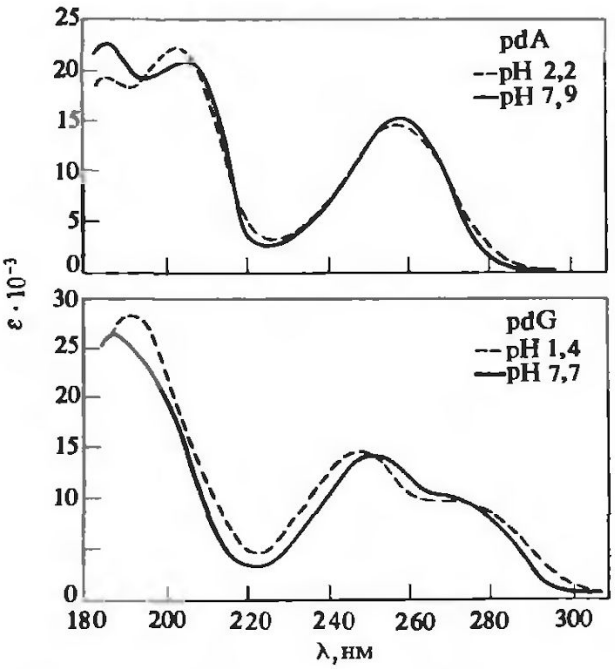
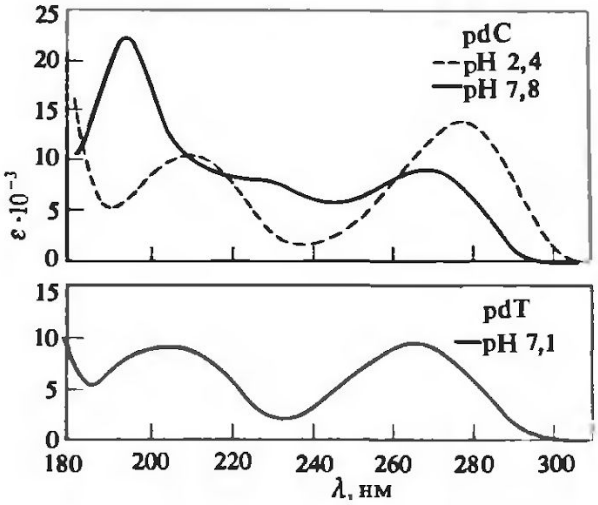
На спектры биополимеров влияет их **локальное окружение**, например, изменение конформации биополимера, изменение среды в которую они помещены (pH, полярность растворителя и т.д.), взаимодействие с другими хромофорами. Данные факторы необходимо учитывать при анализе спектров биополимеров.

Спектры поглощения аминокислот



Спектры поглощения аминокислот



Нуклеиновые кислоты: поглощение в УФ области определятся гетероциклическими основаниями

Спектры поглощения нуклеотидов