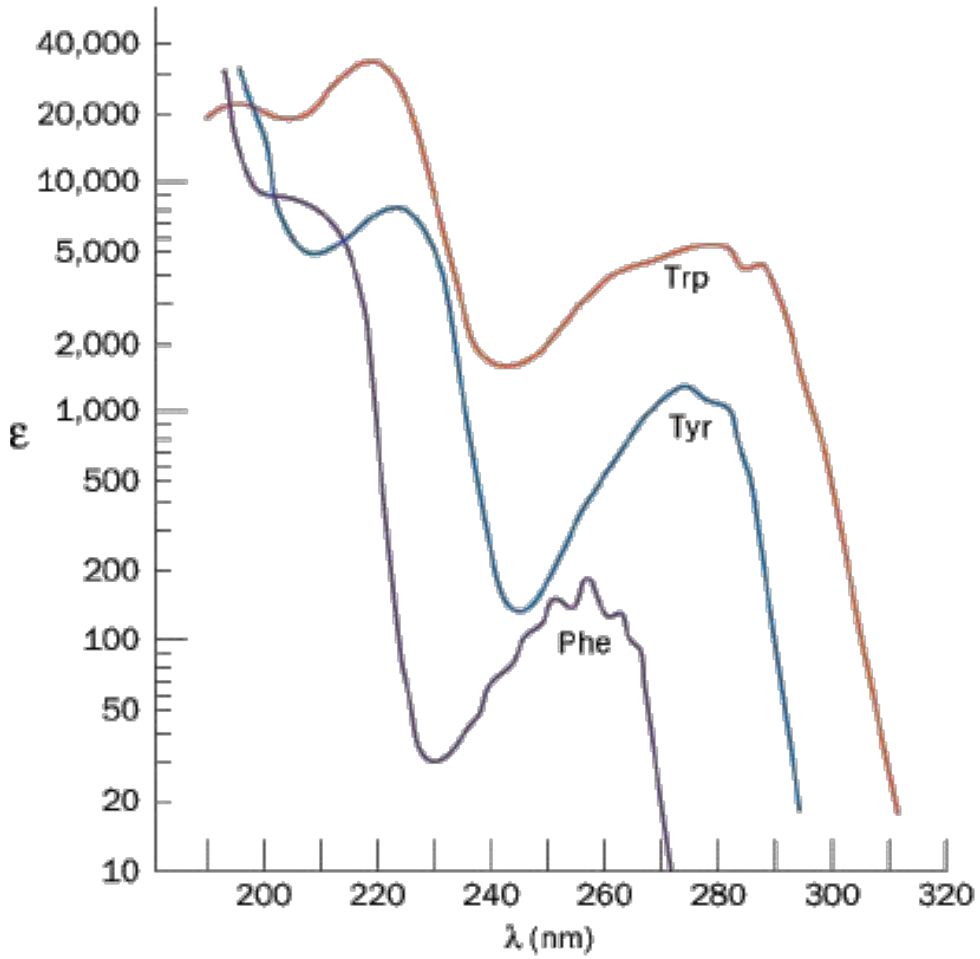
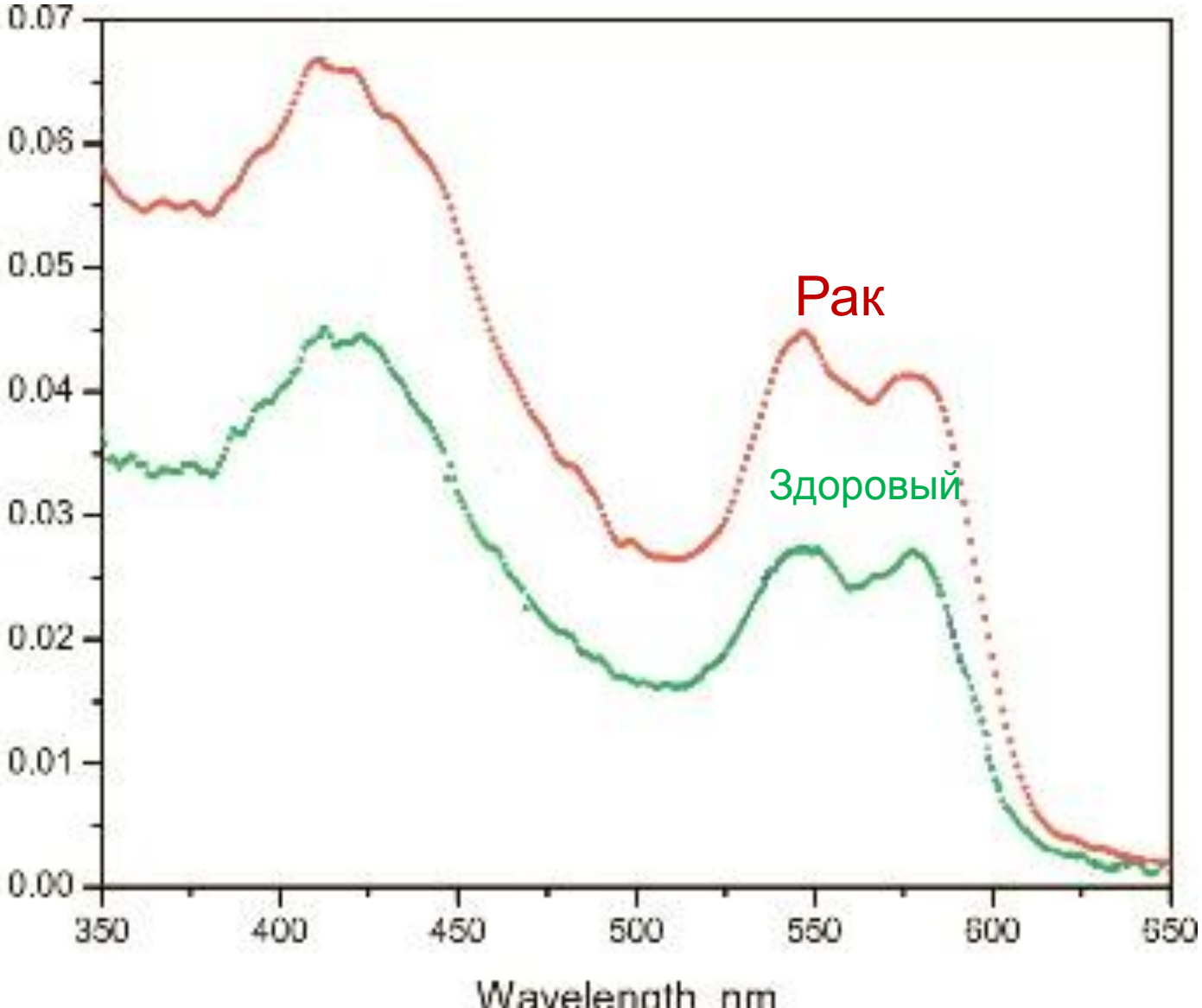
Абсорбционная спектроскопия белков (диагностики заболеваний)



УФ спектры ароматических аминокислот: фенолаламина, триптофана, и тирозина

Спектры поглощения крови

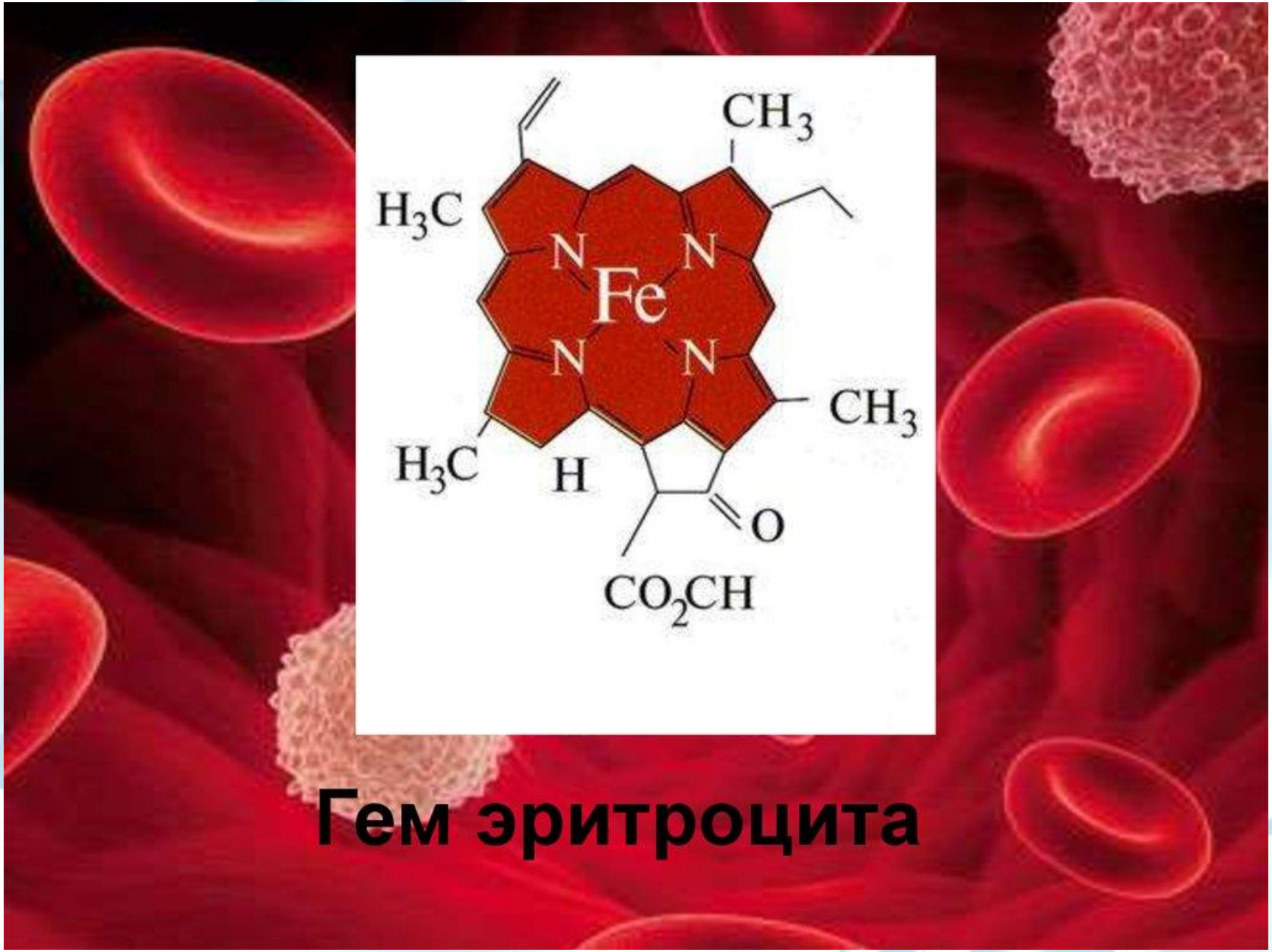


гемовые белки

Гемовые белки играют жизненно важную роль в физиологии млекопитающих. Они хранят и транспортируют кислород в кровотоке и транспортируют электроны в митохондриях для синтеза высокоэнергетических молекул, используемых для управления клеточными процессами.

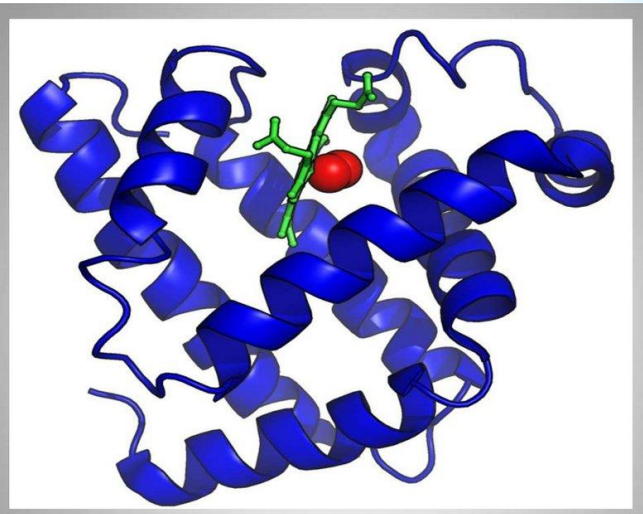
Гем-белки могут нести до четырех молекул кислорода, при этом конформация белка различается в зависимости от присутствия молекулы кислорода и количества связанных молекул кислорода. Таким образом, спектроскопия является полезным инструментом для измерения уровня кислорода в крови. Это важно во множестве медицинских применений, включая ситуации, когда пациенты находятся в состоянии седативного действия, находятся в коме или иным образом не могут выражать тошноту или обморок, которые являются общими признаками низкой оксигенации крови

Гемы (от др.-греч. αἷμα — «кровь») — комплексные соединения порфиринов с двухвалентным железом



Миоглобин

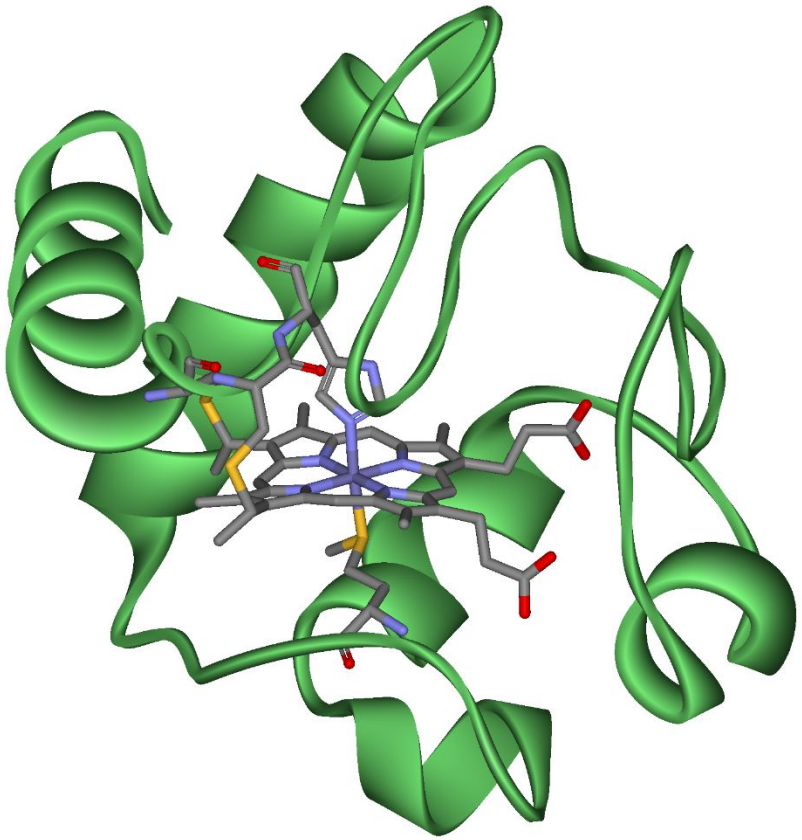
Кислородосвязывающий белок скелетных мышц и мышцы сердца. Функция миоглобина заключается в создании в мышцах кислородного резерва, который расходуется по мере необходимости, восполняя временную нехватку кислорода

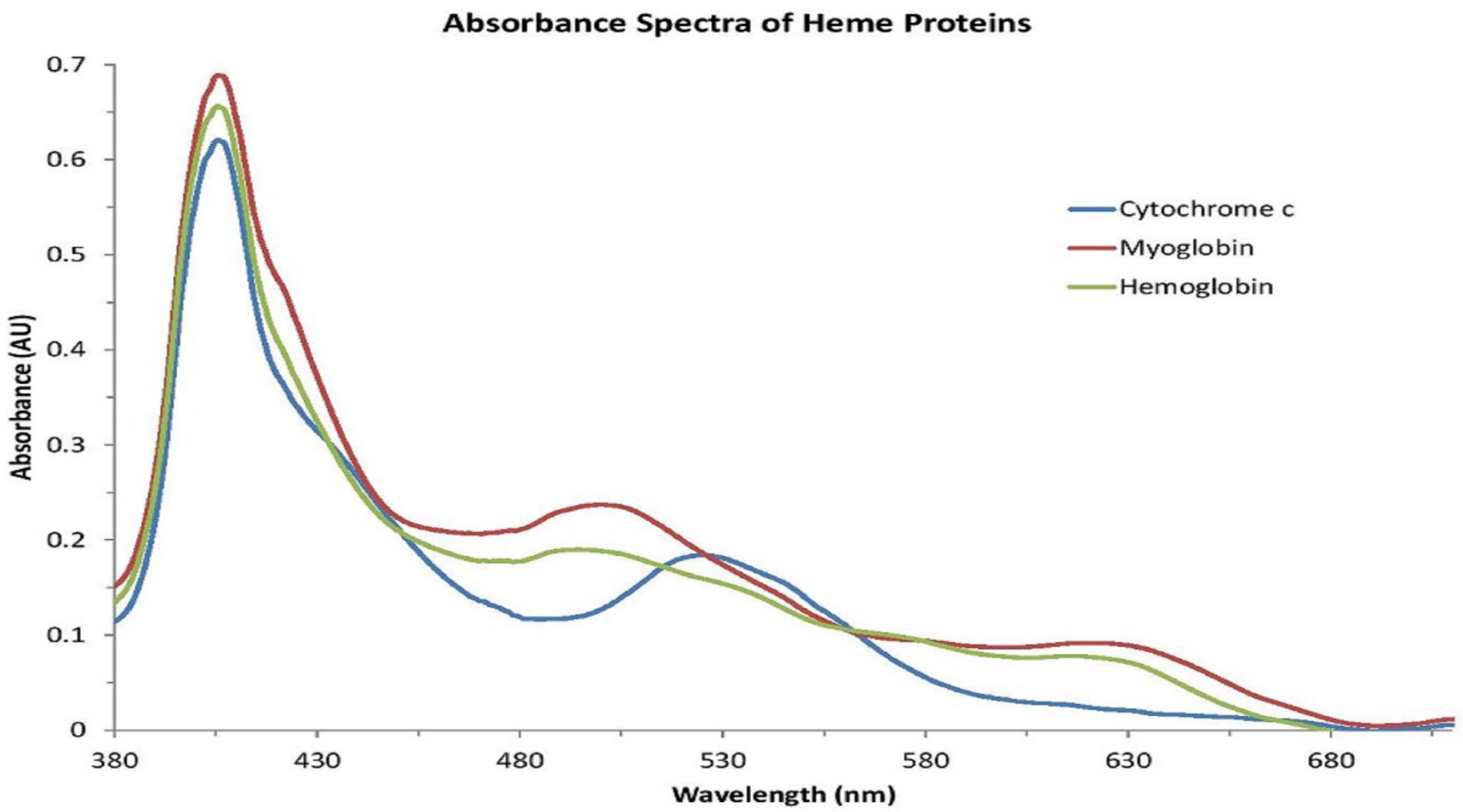


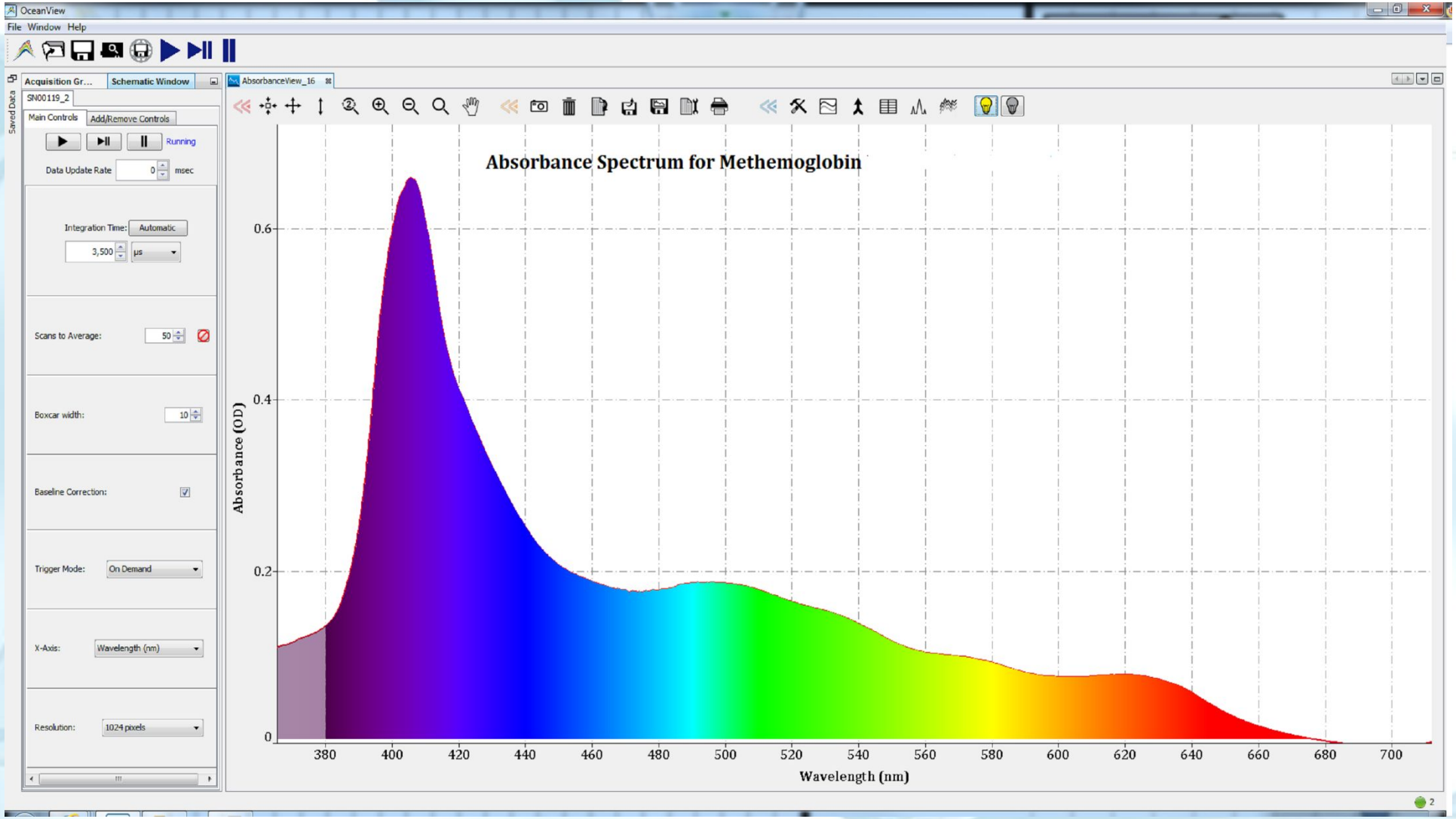
Миоглобин

Цитохром с

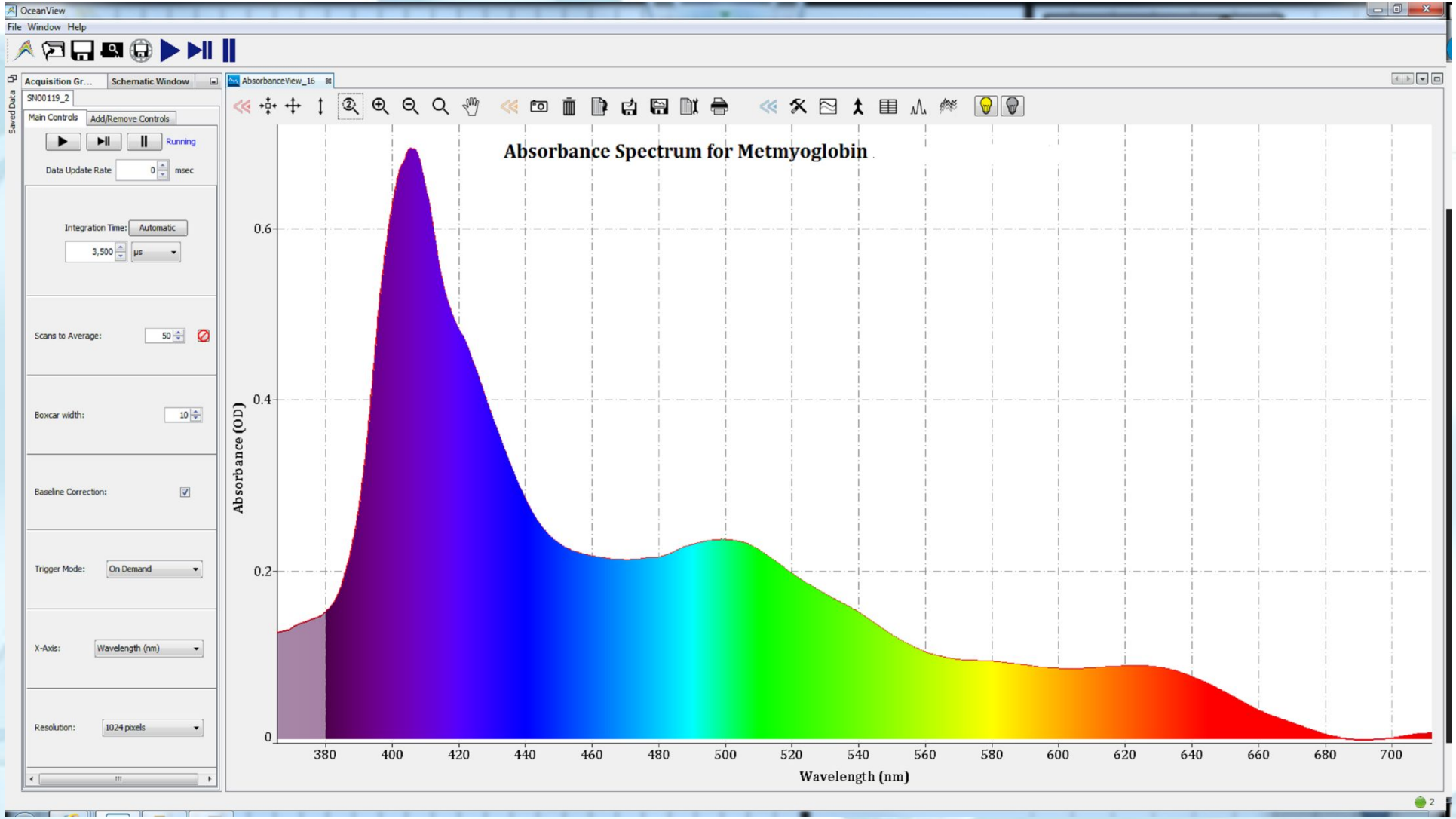
Небольшой гем-содержащий белок, относится к классу цитохромов, содержит в структуре гем типа с. Выполняет в клетке две функции. Является одноэлектронным переносчиком, свободно связанным с внутренней мембраной митохондрий, и необходимым компонентом дыхательной цепи.. С другой стороны, при определённых условиях он может отсоединяться от мембраны, переходить в раствор в межмембранном пространстве.



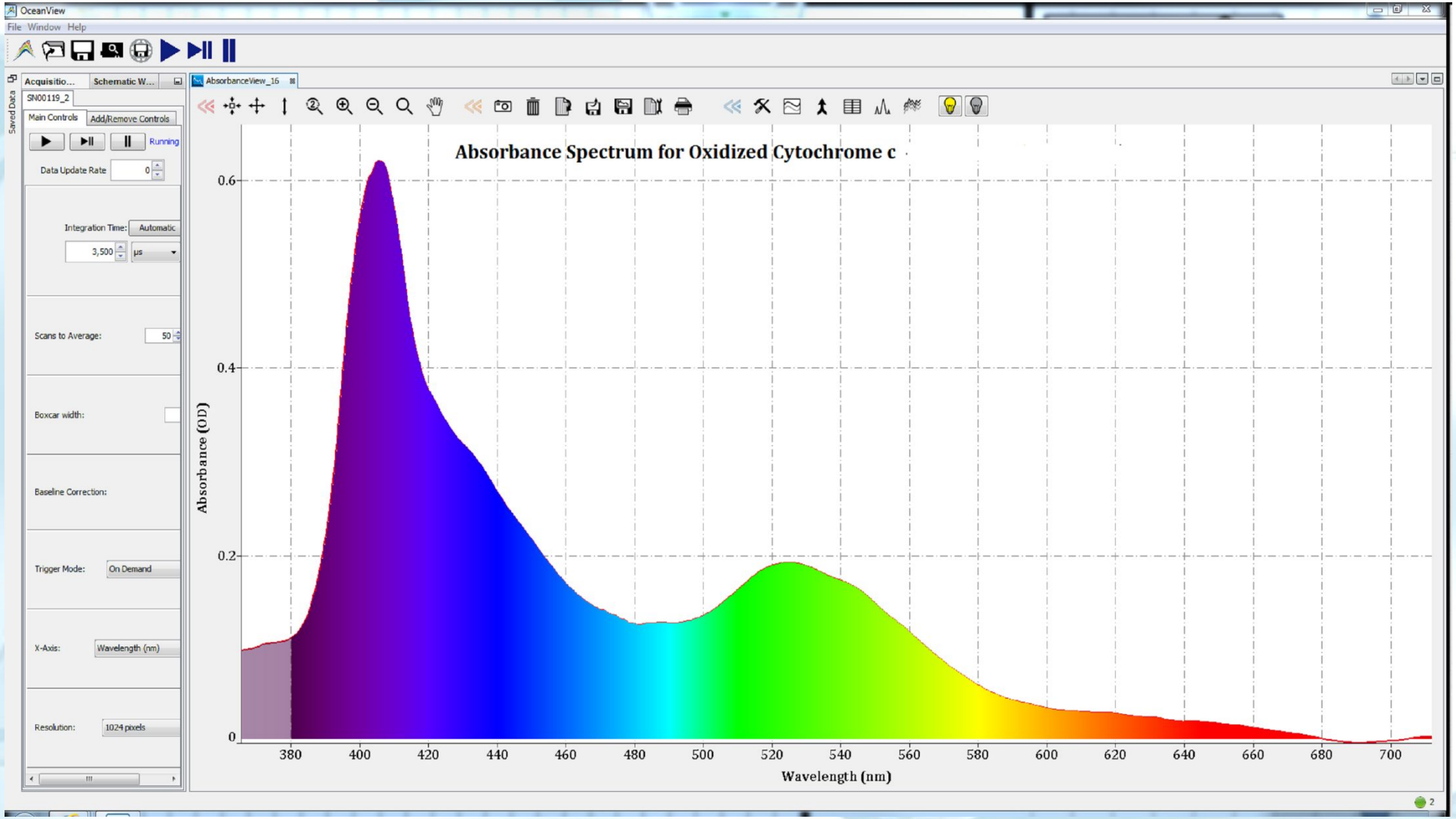

Absorbance Spectra of Heme Proteins
Absorbance (AU)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
380
430
480
530
580
630
680
Wavelength (nm)
Cytochrome c
Myoglobin
Hemoglobin



Окисление атома железа в гемовой группе металлопротеинов привело к спектрам, соответствующим метгемоглобину.



Окисление атома железа в гемовой группе металлопротеинов привело к спектрам, согласующимся с метмиоглобином.



Спектр поглощения цитохрома с после окисления

Люминесценция

Люминесценция – свечение атомов, молекул, ионов и других более сложных комплексов, возникающее в результате электронного перехода в этих частицах при их возвращении из возбужденного состояния в основное

Классификация процессов люминесценции

классификация типов люминесценции

- продолжительность процесса
- виды возбуждения
- кинетика люминесценции

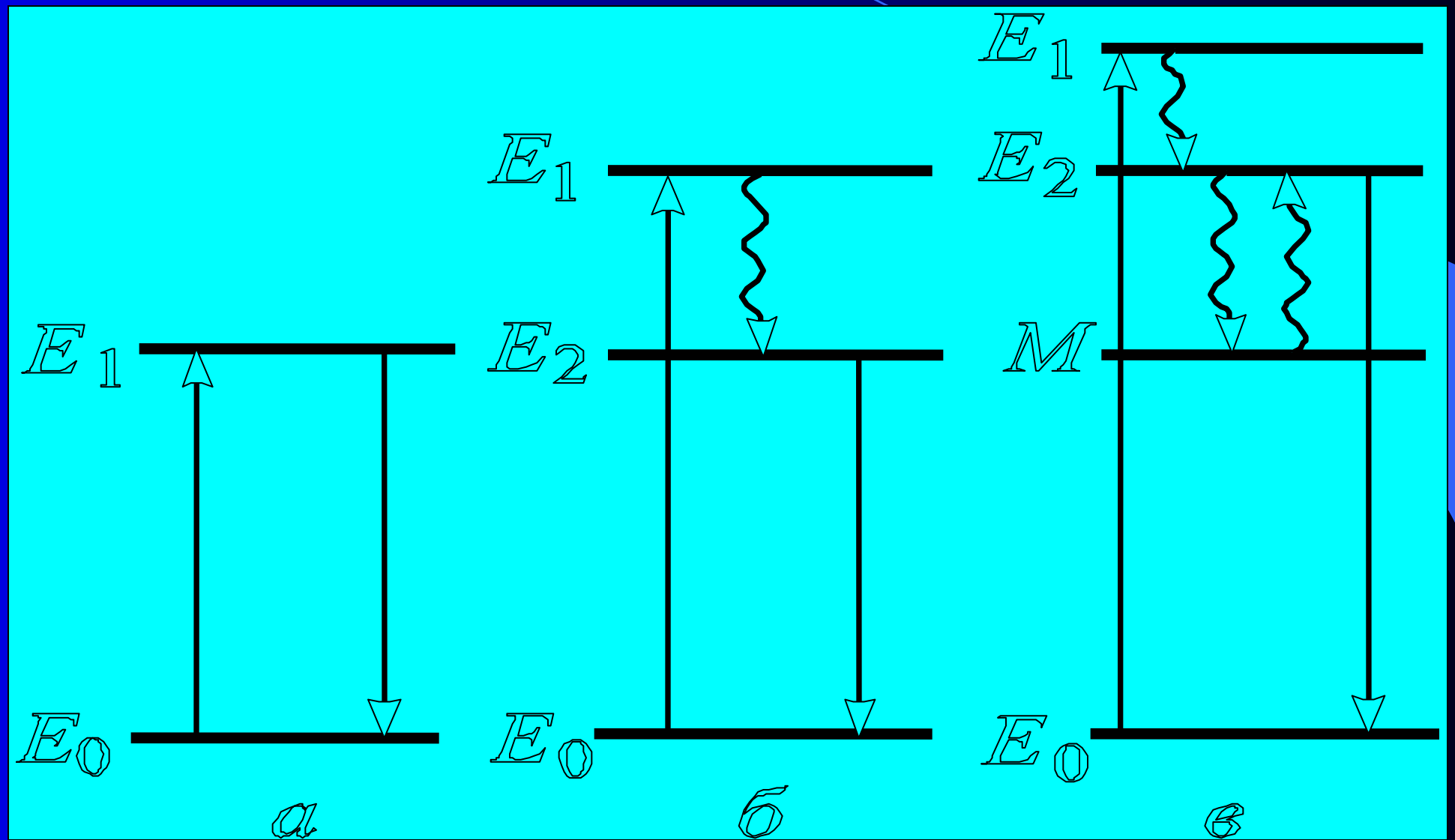
Виды возбуждения

- Фотолюминесценция
- Катодолюминесценция
- Хемилюминесценция
- Рентгенолюминесценция

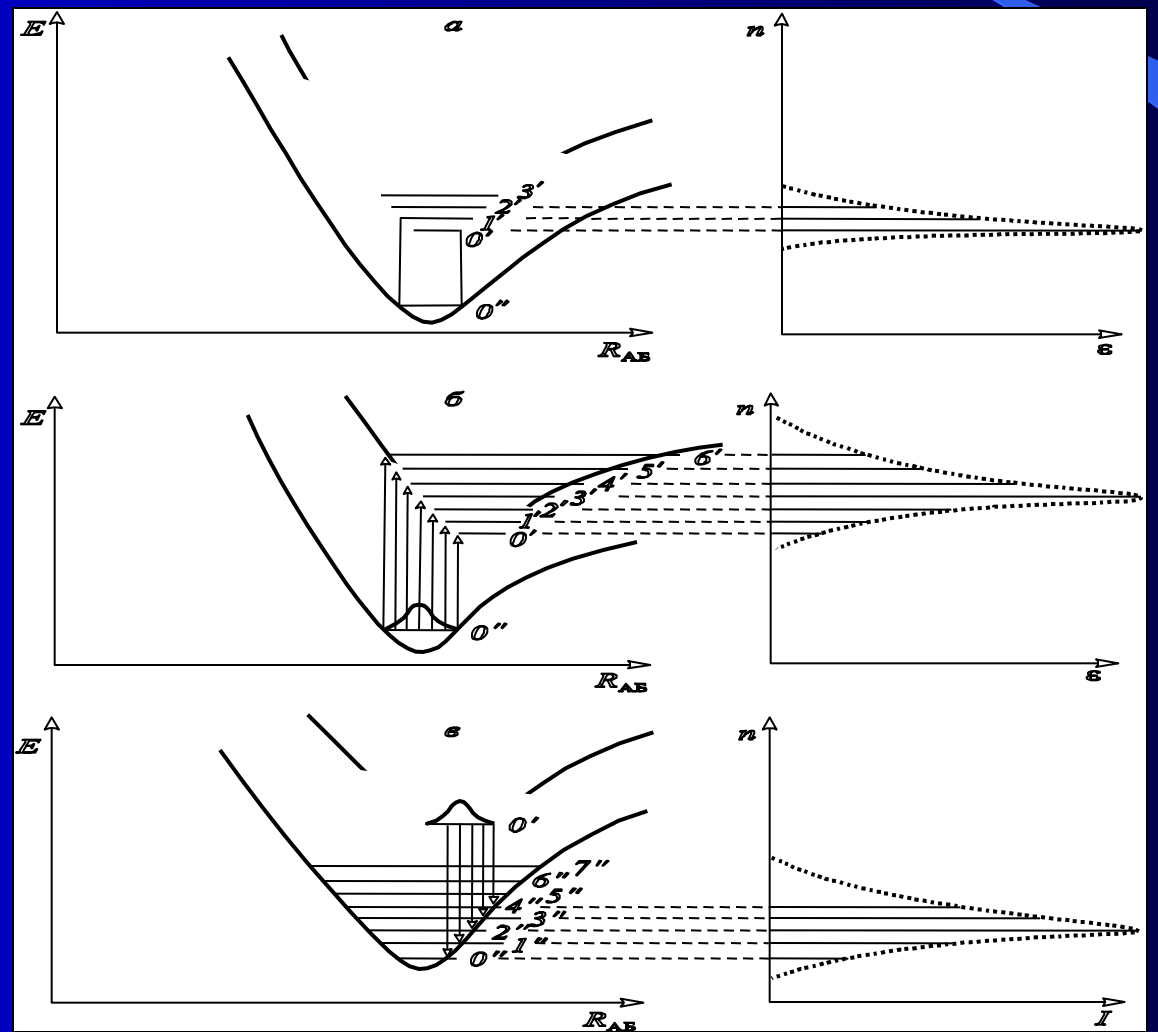
Длительность

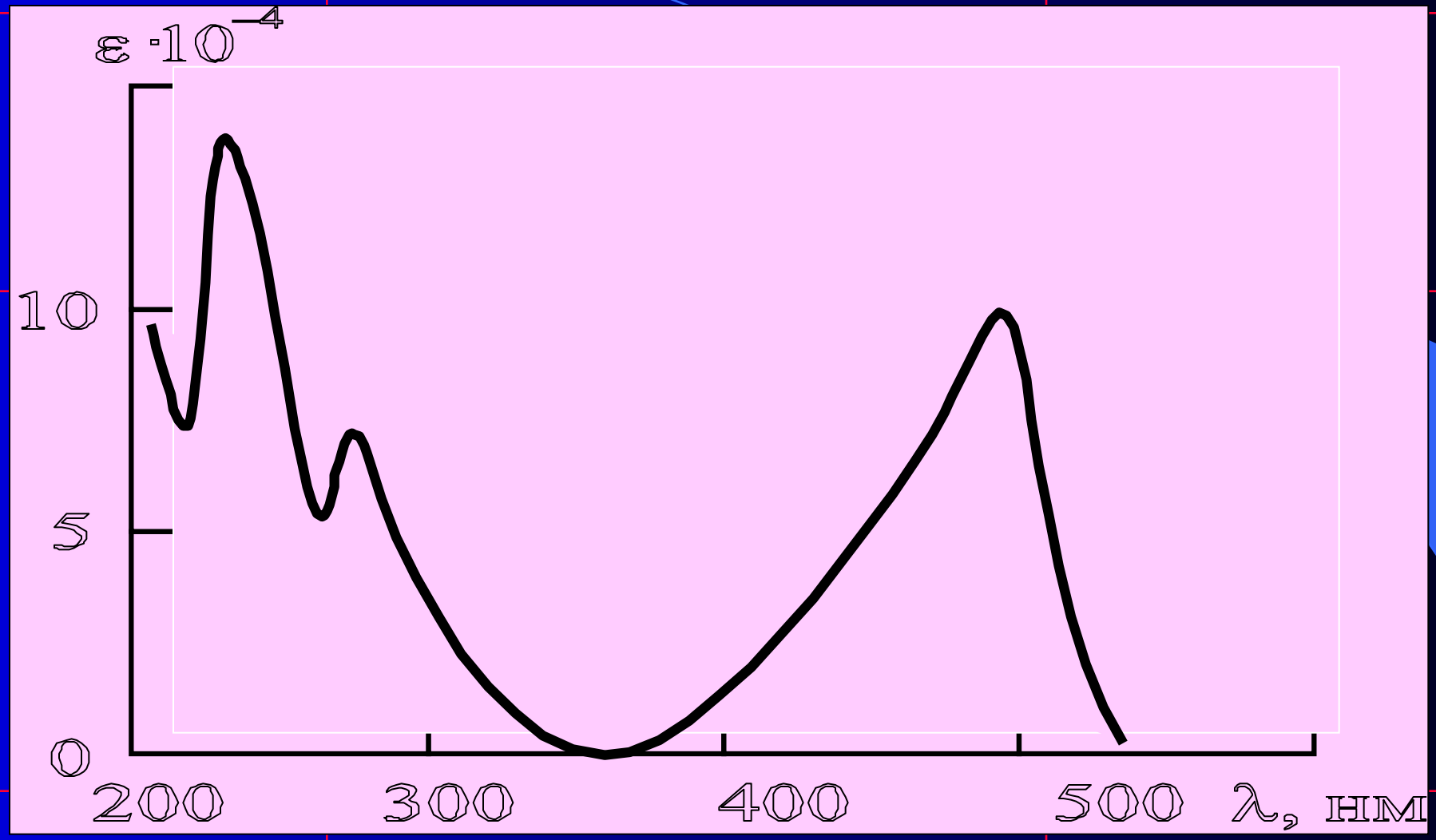
- Флуоресценция
- Фосфоресценция
- Замедленная флуоресценция

Кинетика

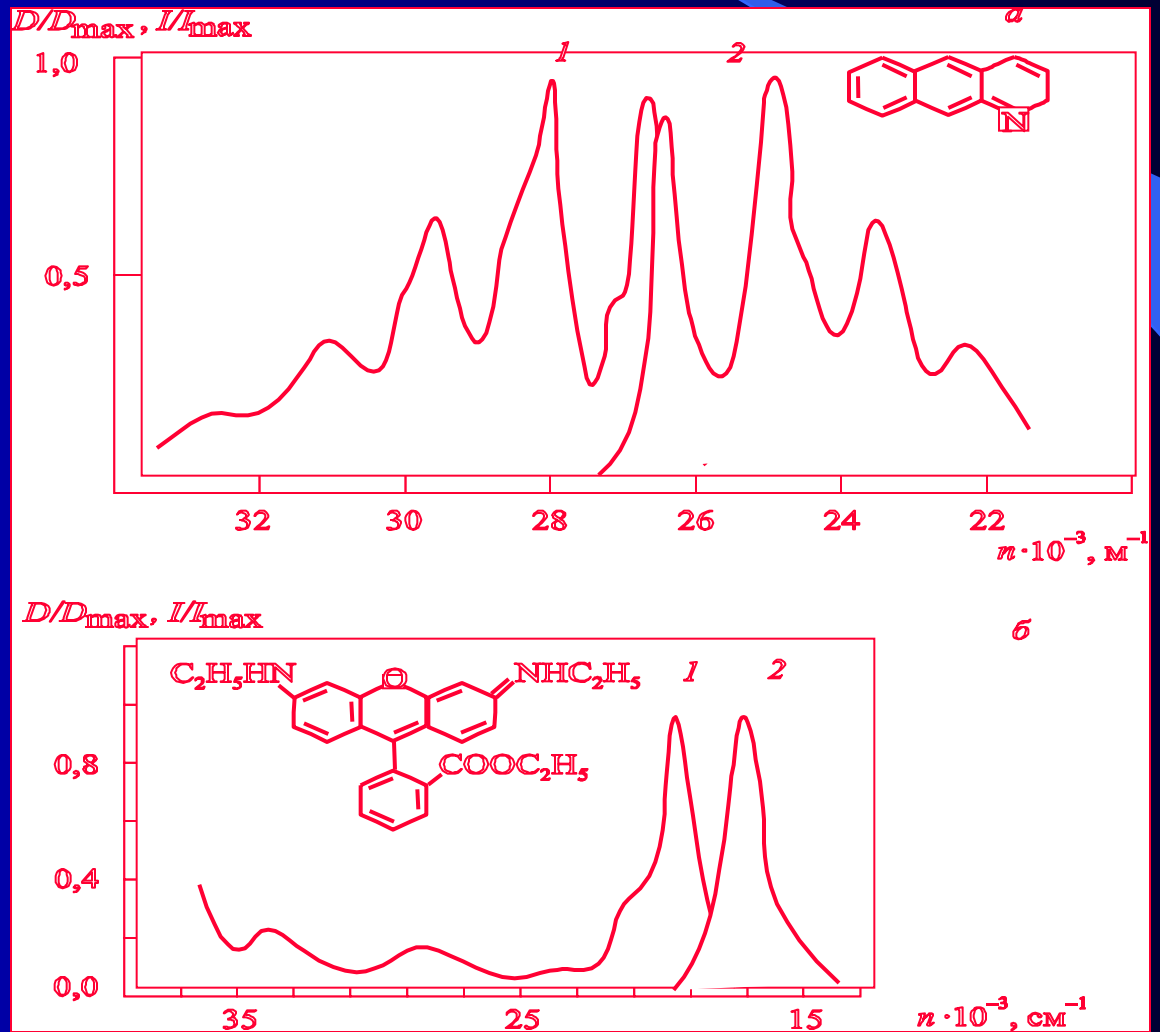


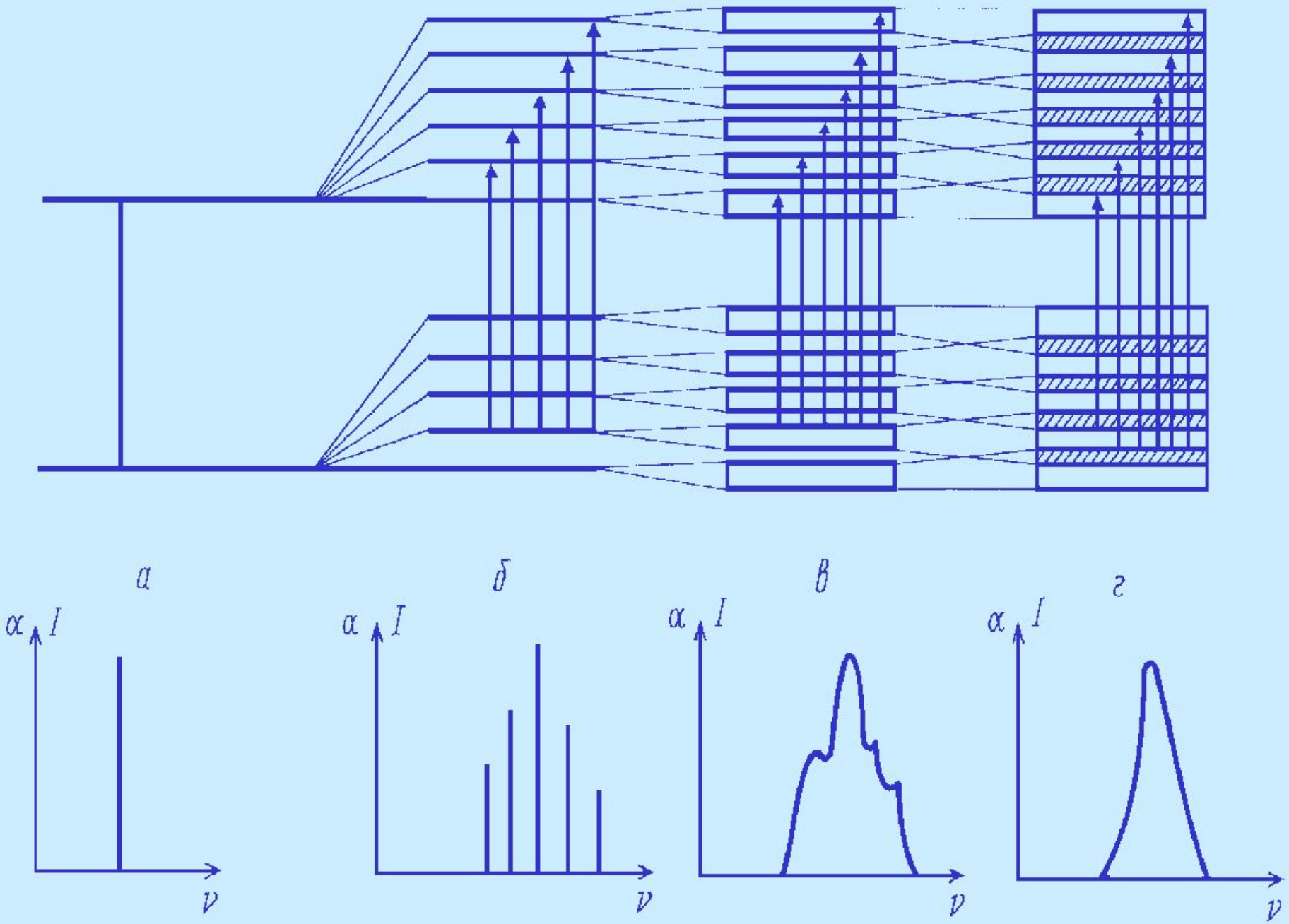
Принцип Франка-Кондона

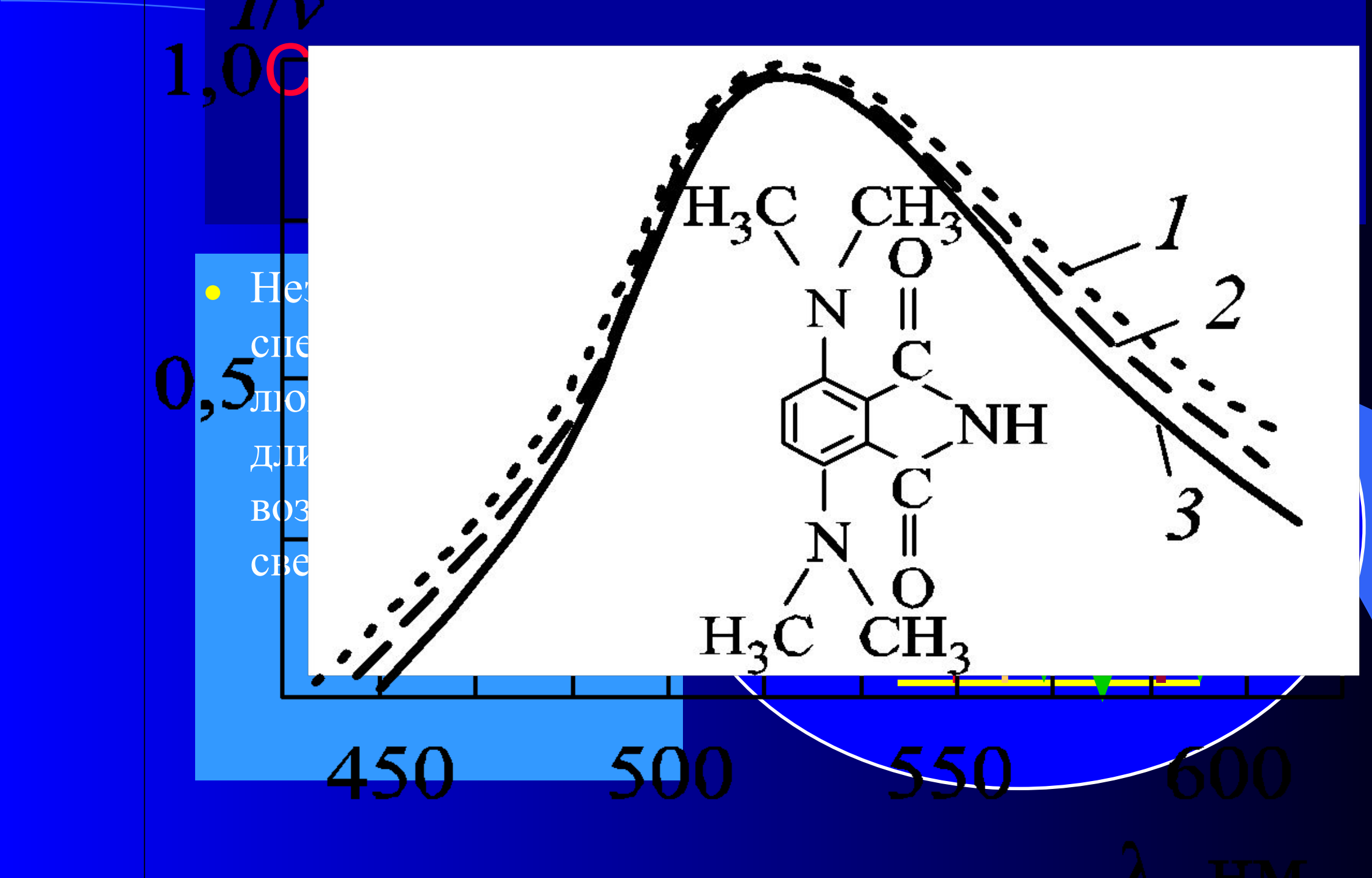



ε ·10⁻⁴
10
5
0
200
300
400
500
λ, нм

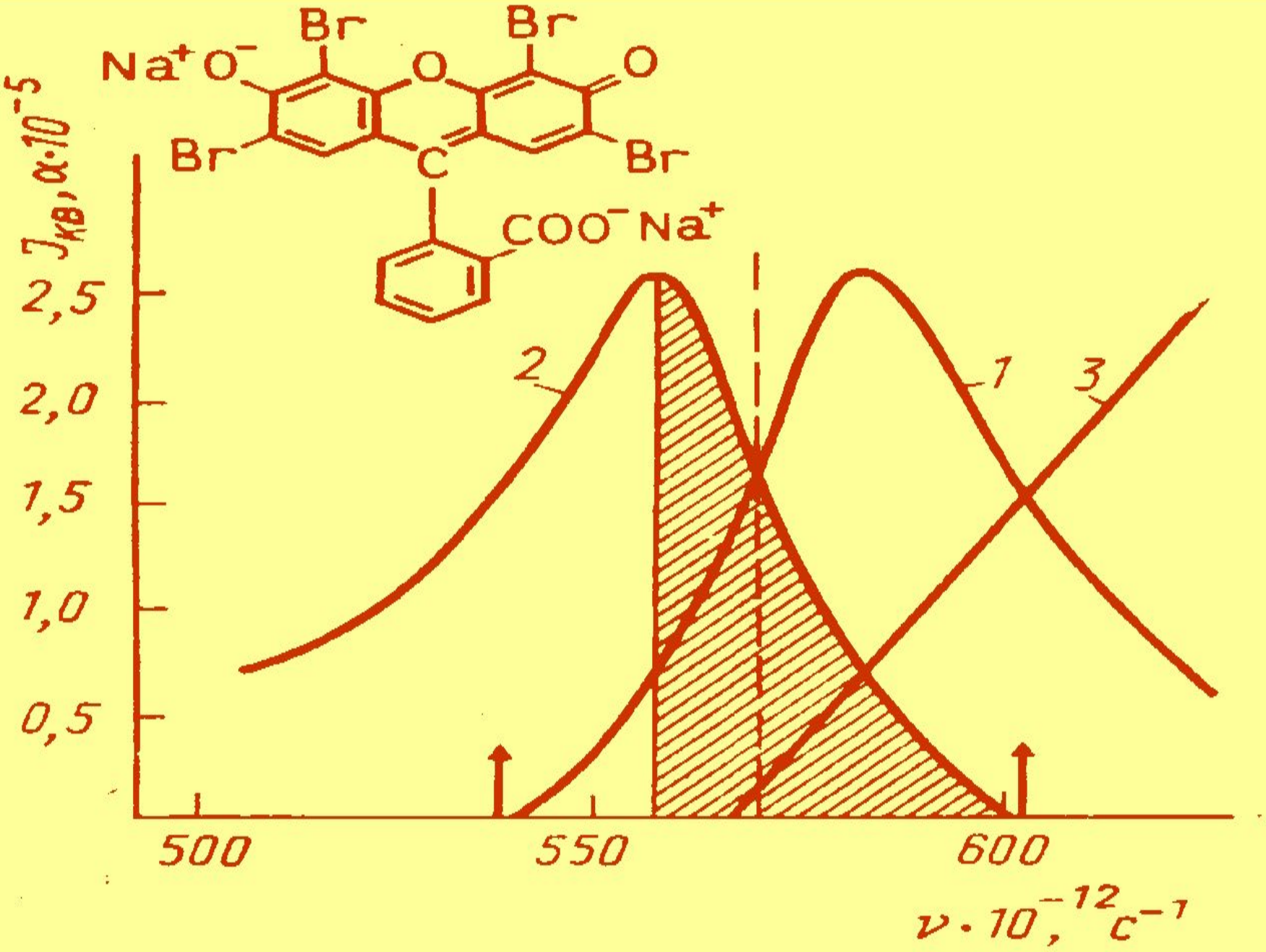
Спектры


D/Dmax, I/Imax
а
1,0
0,5
1
2
N
32
30
28
26
24
22
n·10⁻³, м⁻¹
D/Dmax, I/Imax
б
C2H5HN
O
NHC2H5
COOC2H5
1
2
0,8
0,4
0,0
35
25
15
n·10⁻³, см⁻¹

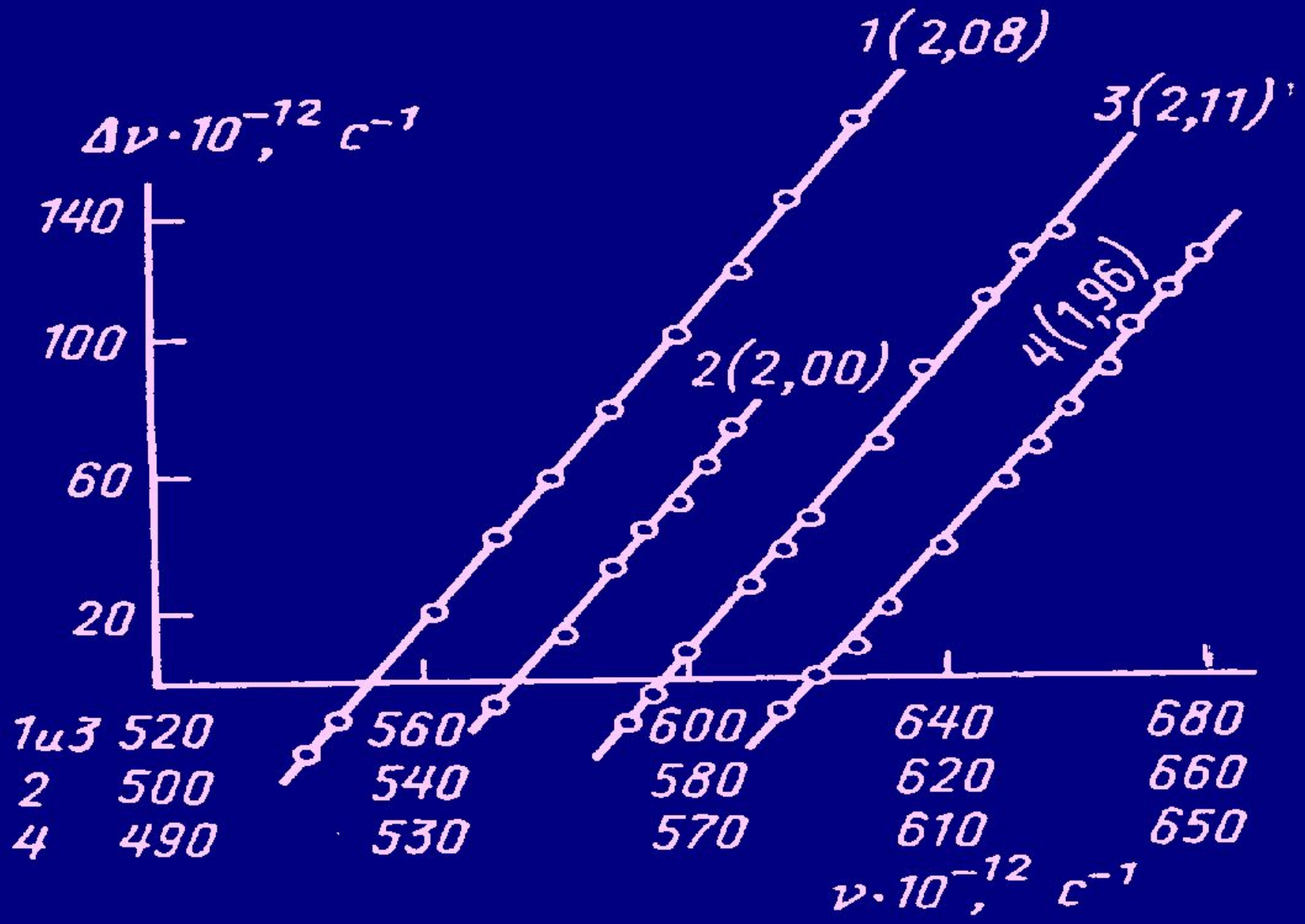

а
б
в
г
α I
ν



- Не
спе
лю
дли
воз
све


Na+O−
Br
Br
O
O
Br
Br
C
COO−Na+
$J_{кв}, \alpha \cdot 10^{-5}$
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
2
1
3
500
550
600
$\nu \cdot 10^{-12}, c^{-1}$

- П
с


1(2,08)
3(2,11)
2(2,00)
4(1,96)
Δν·10⁻¹², с⁻¹
140
100
60
20
1и3 520 560 600 640 680
2 500 540 580 620 660
4 490 530 570 610 650
ν·10⁻¹², с⁻¹

Спектральные закономерности люминесценции

- Универсальное соотношение Степанова

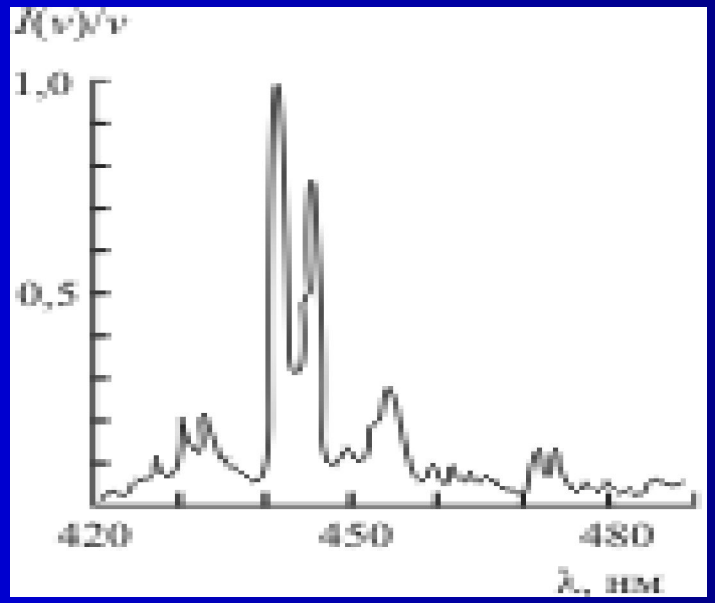
$$\frac{I}{\alpha} = D(T)\,\nu^{3}\exp\left(-\frac{h\nu}{kT}\right)$$

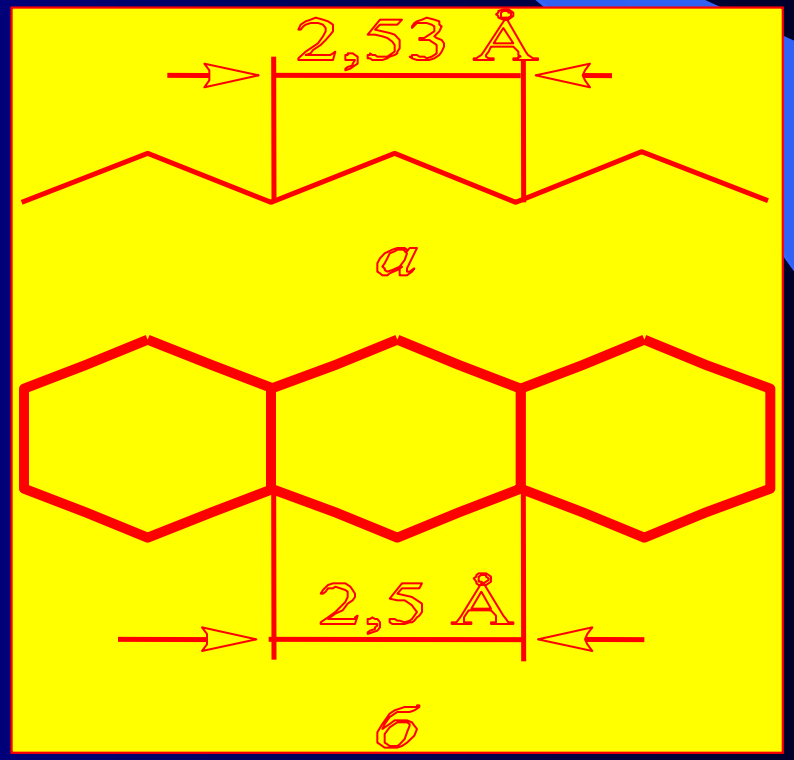
Спектральные закономерности люминесценции

- Независимость спектра люминесценции от длины волны возбуждающего света
- Закон Стокса-Люммеля
- Правило зеркальной симметрии
- Универсальное соотношение Степанова

Квазилинейчатые спектры поглощения и люминесценци

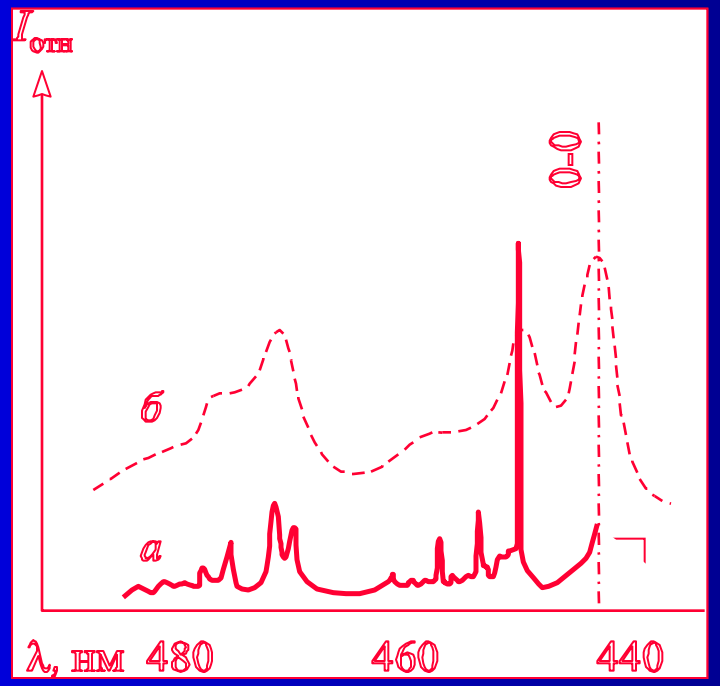
- Эффект Шпольского

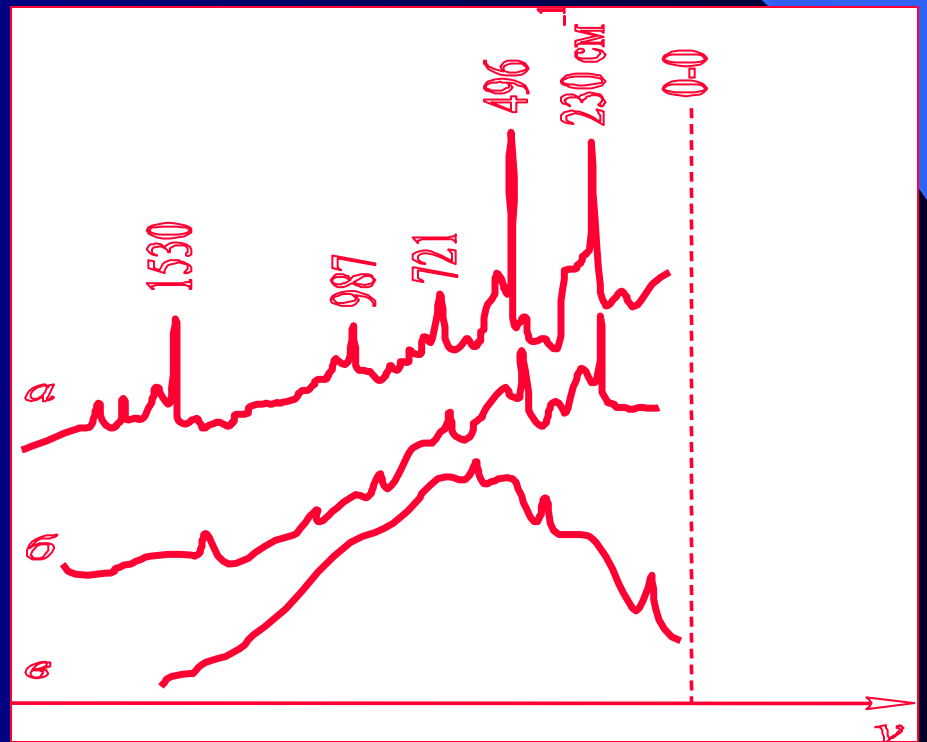




Квазилинейчатые спектры поглощения и люминесценци

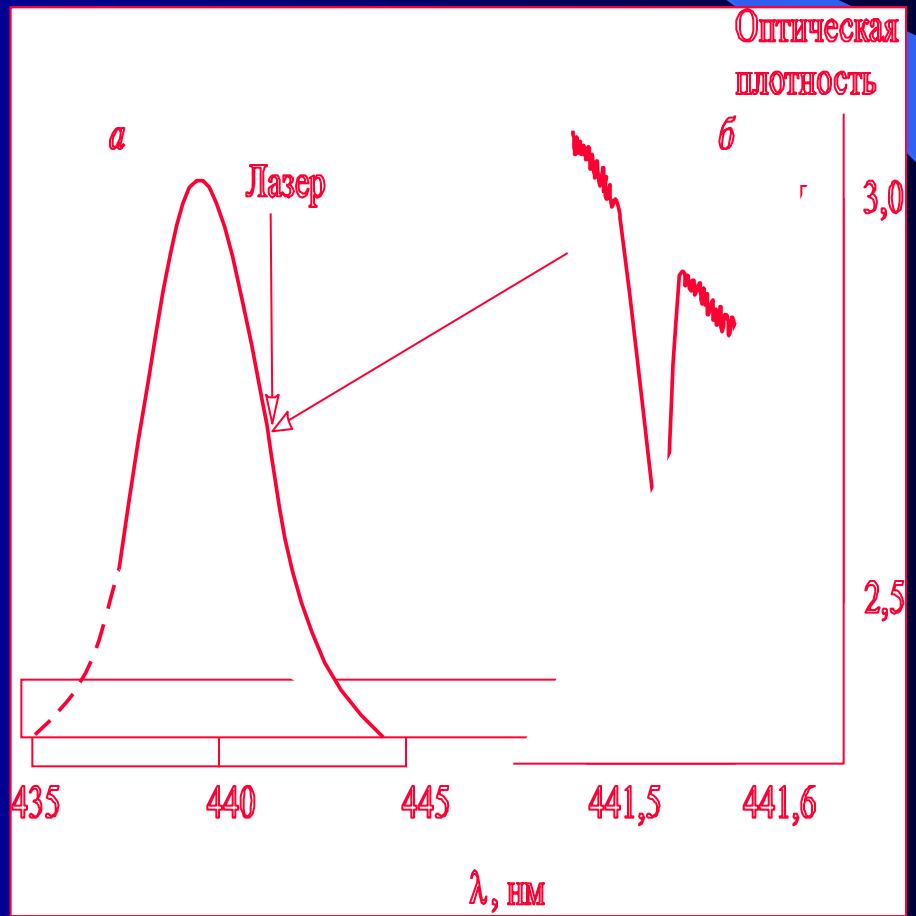
- Основные принципы селективной спектроскопии



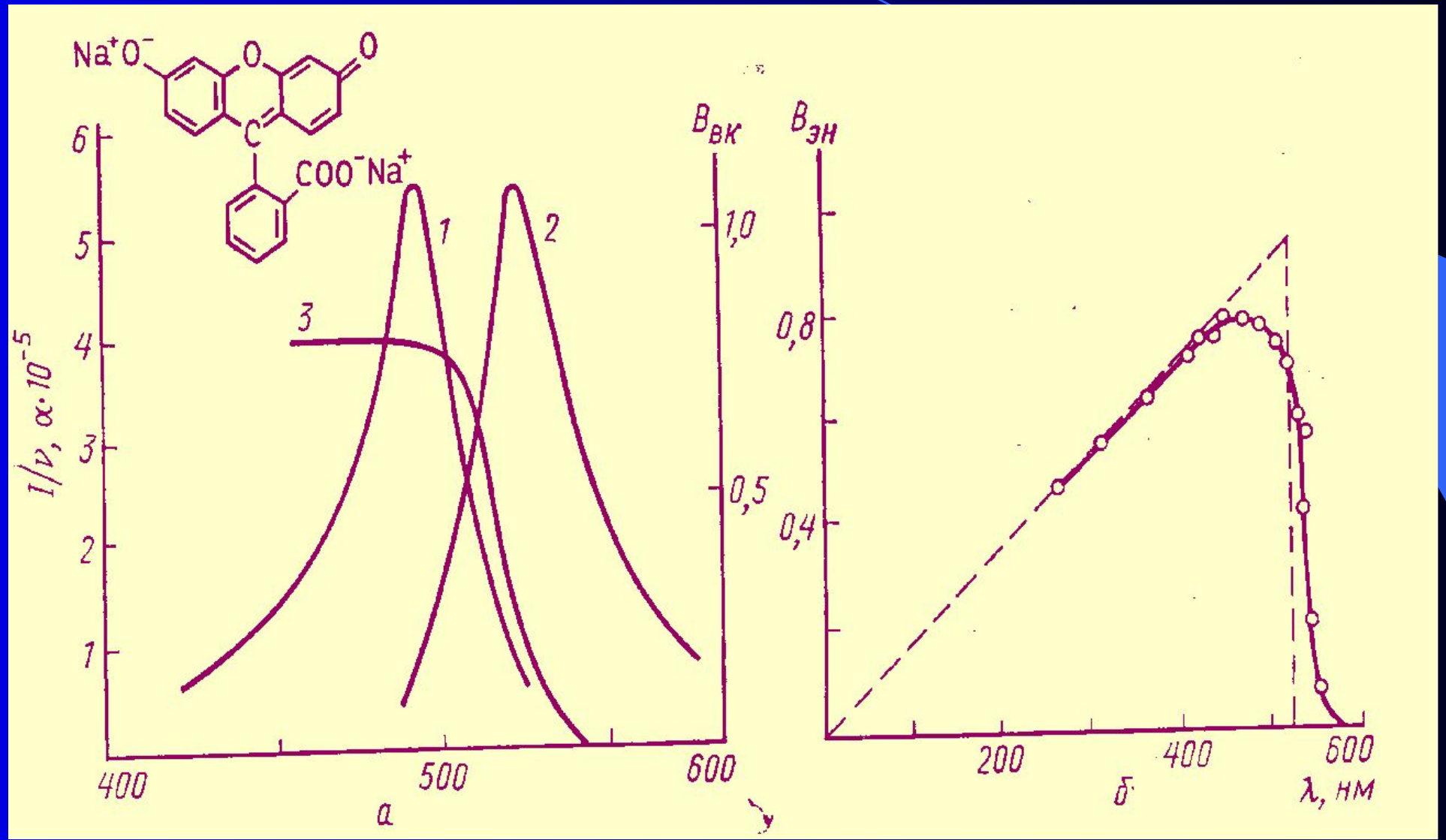


Квазилинейчатые спектры поглощения и люминесценци

- «Спектры выжигания»



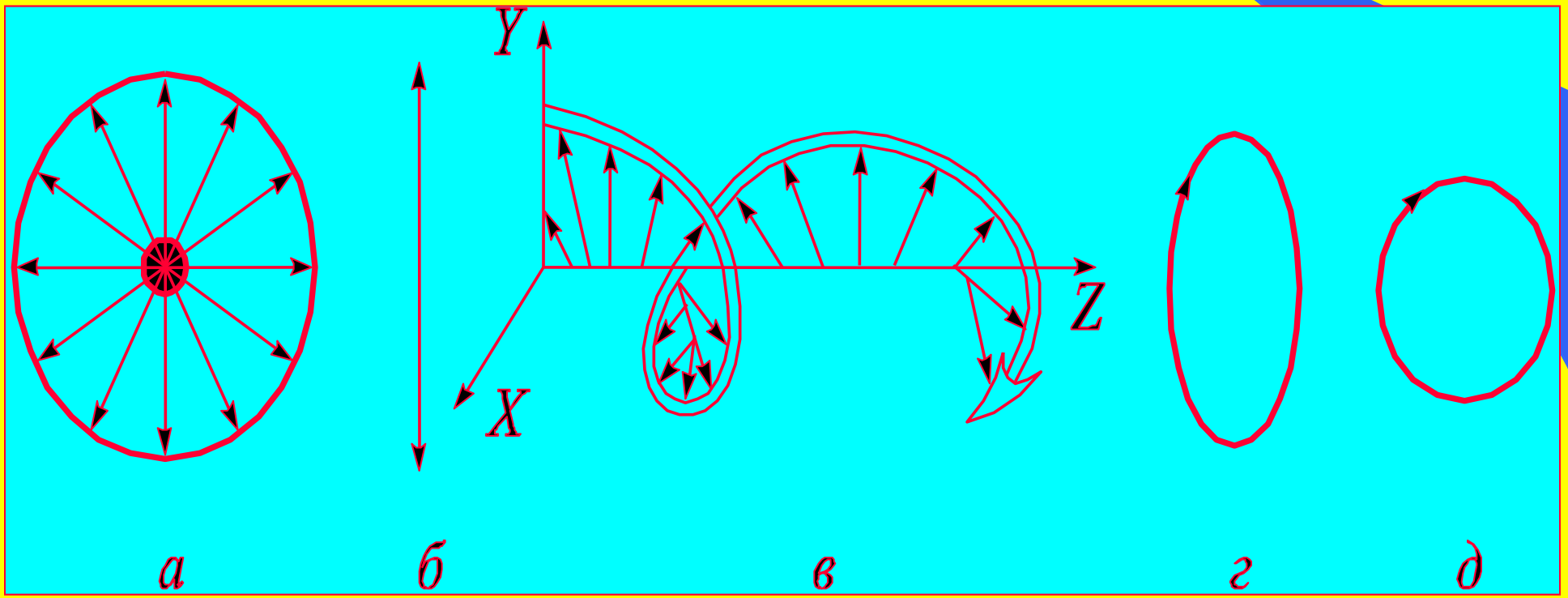
Закон Вавилова



Флуоресценция из высших возбужденных состояний

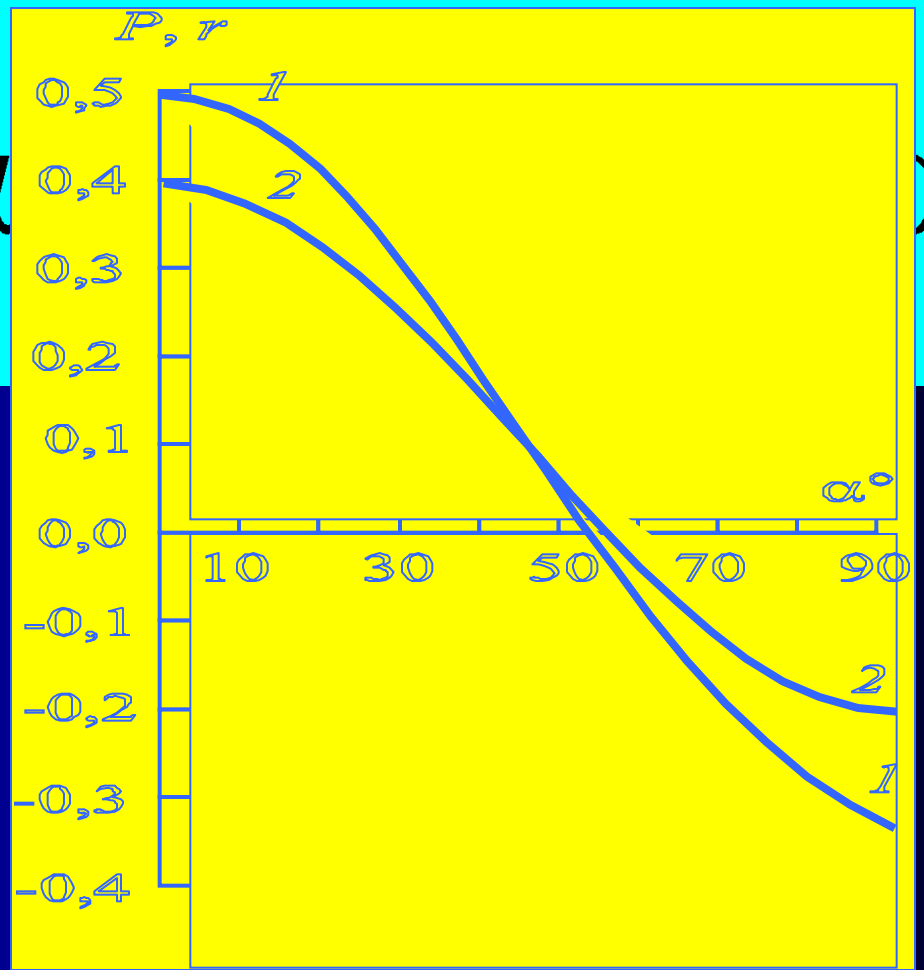
Вещество	Растворитель	$B_{кв}$
9-Фенилакридин	этанол	$1 \cdot 10^{-5}$
9,10-Ди-н-пропилантрацена	гептан	$3 \cdot 10^{-5}$
Акридин	этанол	$4 \cdot 10^{-5}$
N-Метилакридон	этанол	$5 \cdot 10^{-5}$
1,2-Бензантрацен	гексан	$1 \cdot 10^{-4}$

Поляризованная люминесценция

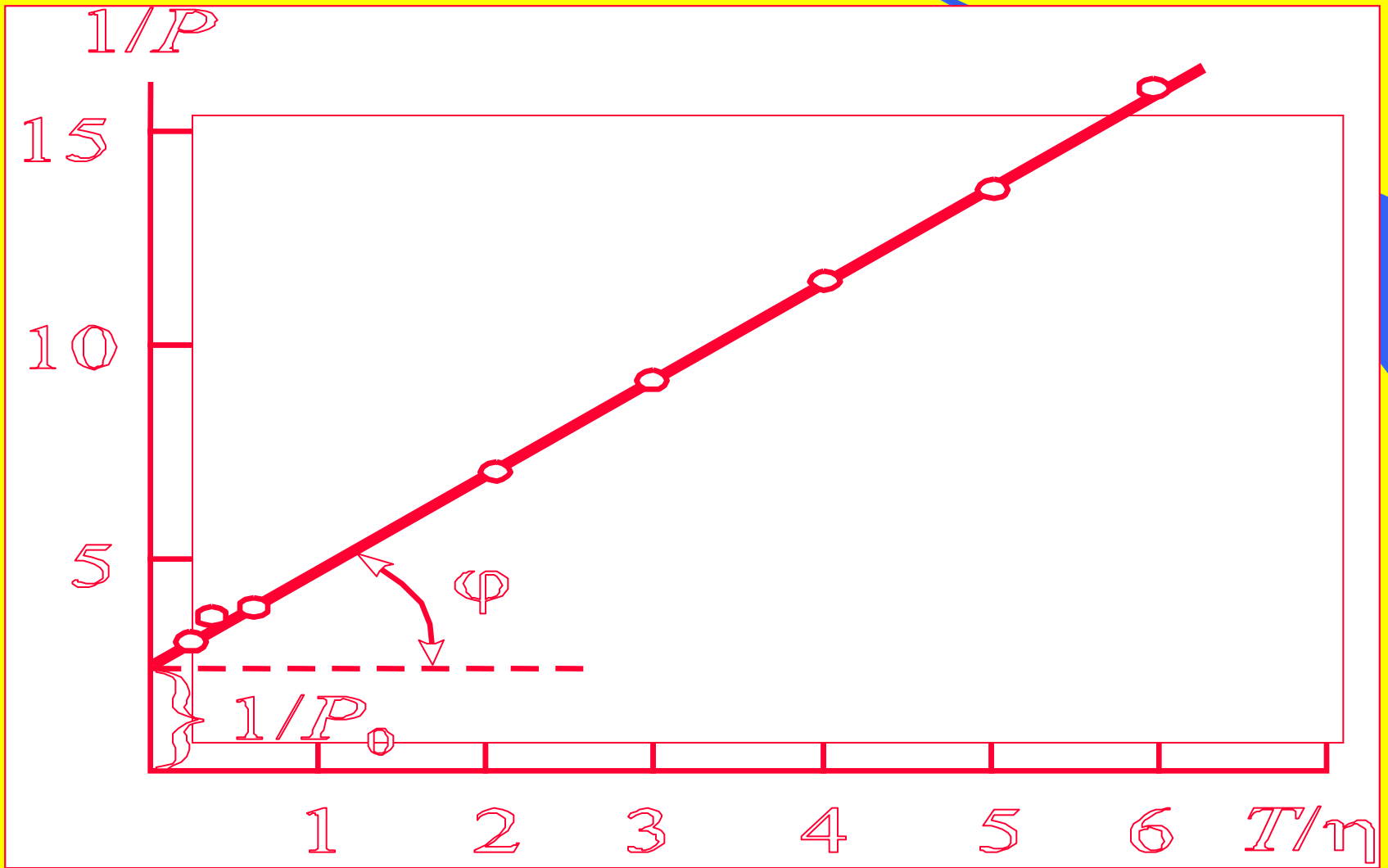


Формула Левшина-Перрена

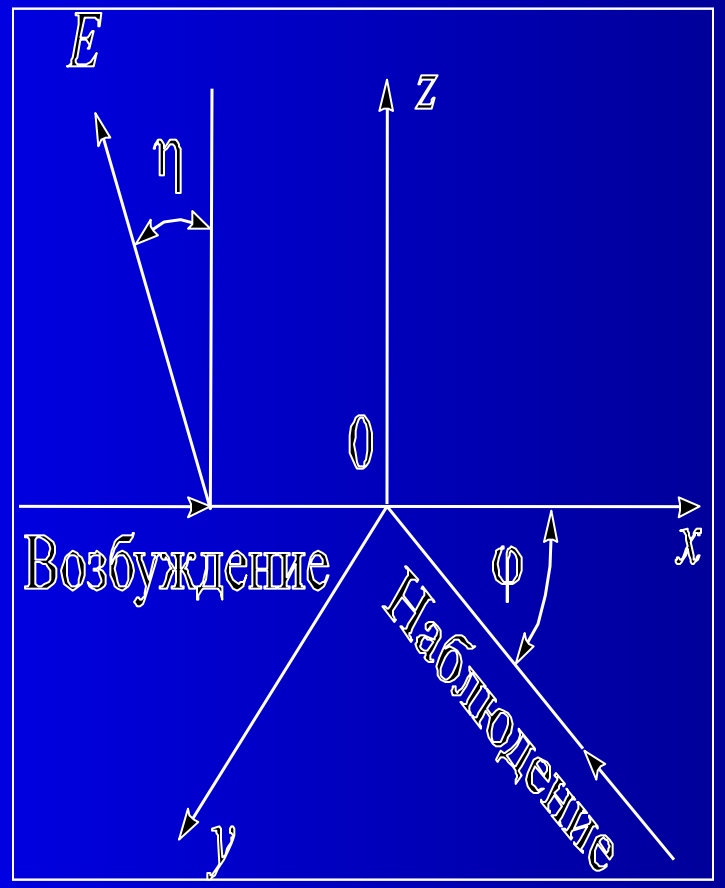
$$P = \left(3\cos^2\alpha \qquad \alpha\right)$$

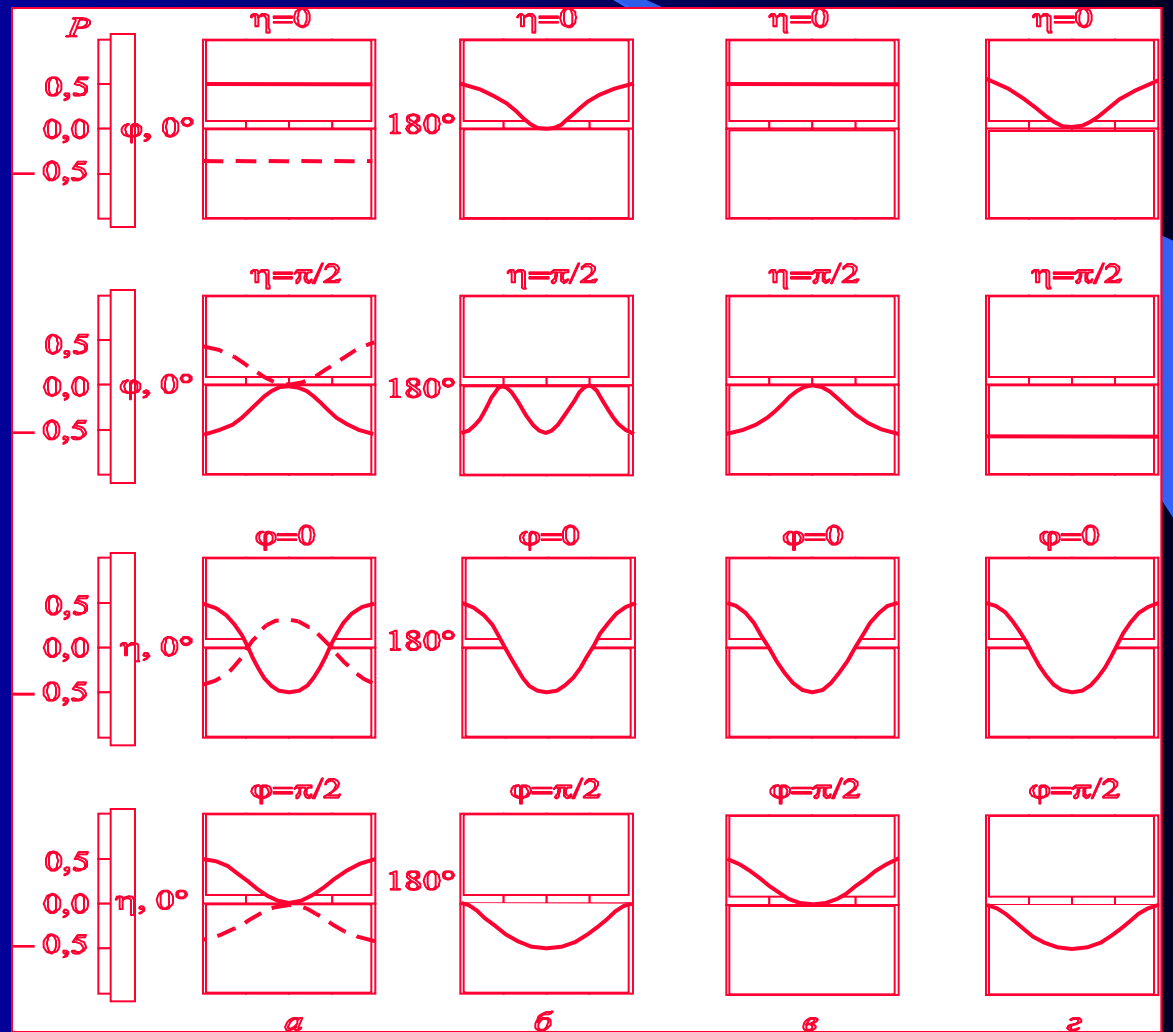


Вращательная деполяризация

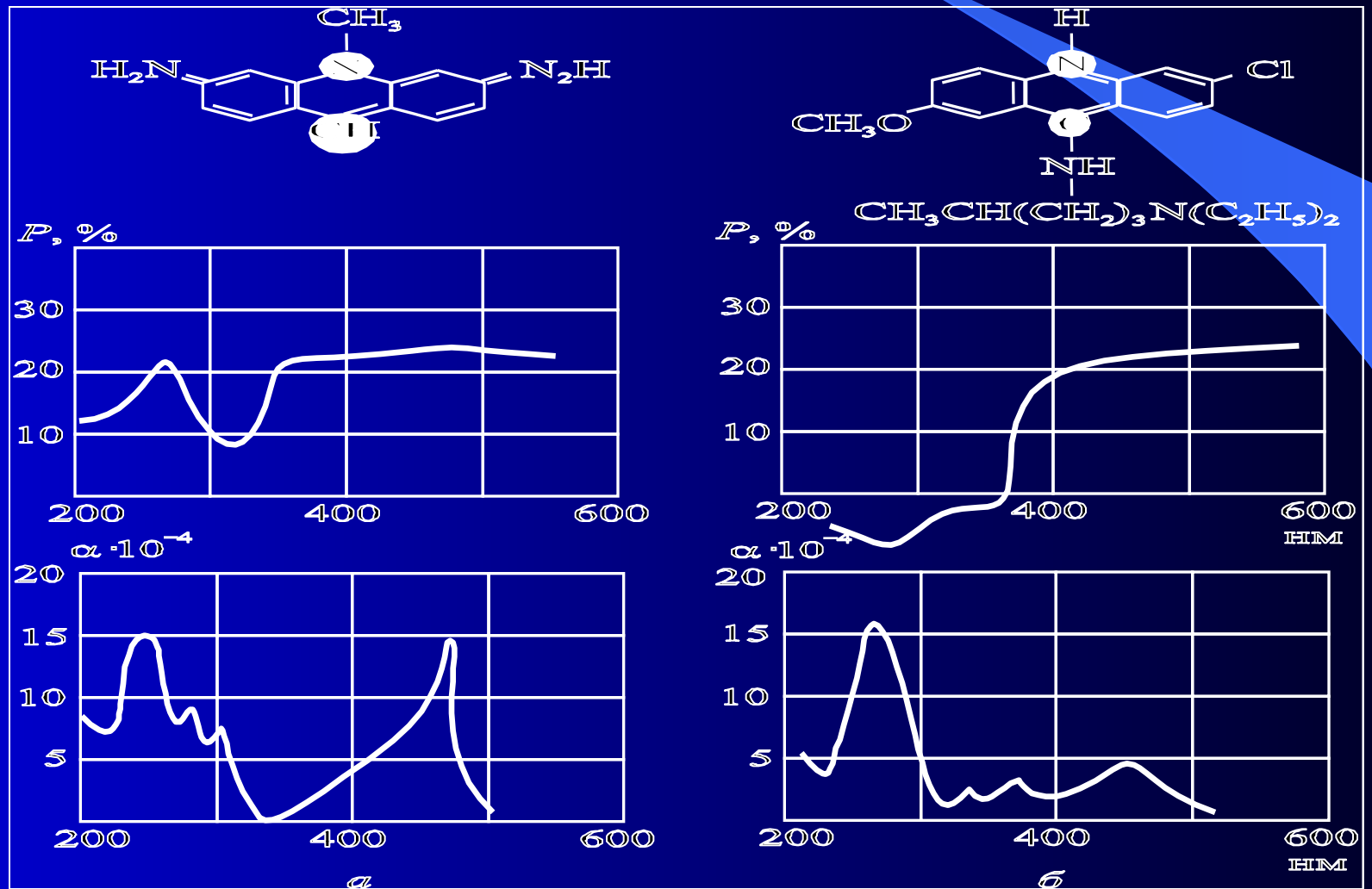


Поляризационные диаграммы





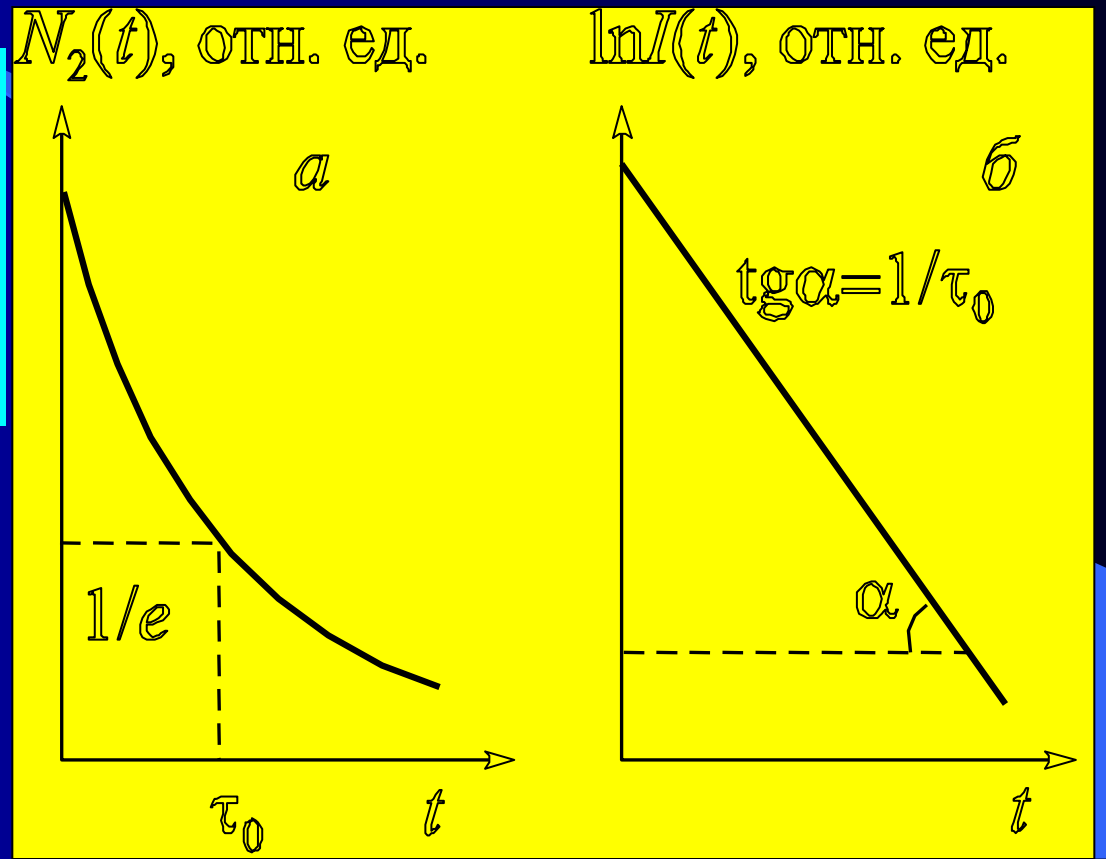
Поляризационные спектры



$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$

Законы затухания люминесценции

$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$



$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$

Законы затухания люминесценции

$$\tau = \frac{1}{A}$$

$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$

Соединение	*Растворитель*	$\tau_{фл}$, *нс*
9-Аминоакридин	этанол	15,2
Антрацен	гексан	5,75
Альбумин сыворотки	вода	4,5
Флуоресцеин	0,1 н. NaOH	4,5
Профлавин	вода	4,5
Антрацен	бензол	4,26
Рибофлавин	вода	4,2
Родамин 6Ж	этанол	4,2
	вода	3,9
Индол	вода	2,7
Триптофан	вода	2,6

$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$

Значения квантового выхода $B_{кв}$ и среднего времени возбужденного состояния эритрозина в различных растворителях

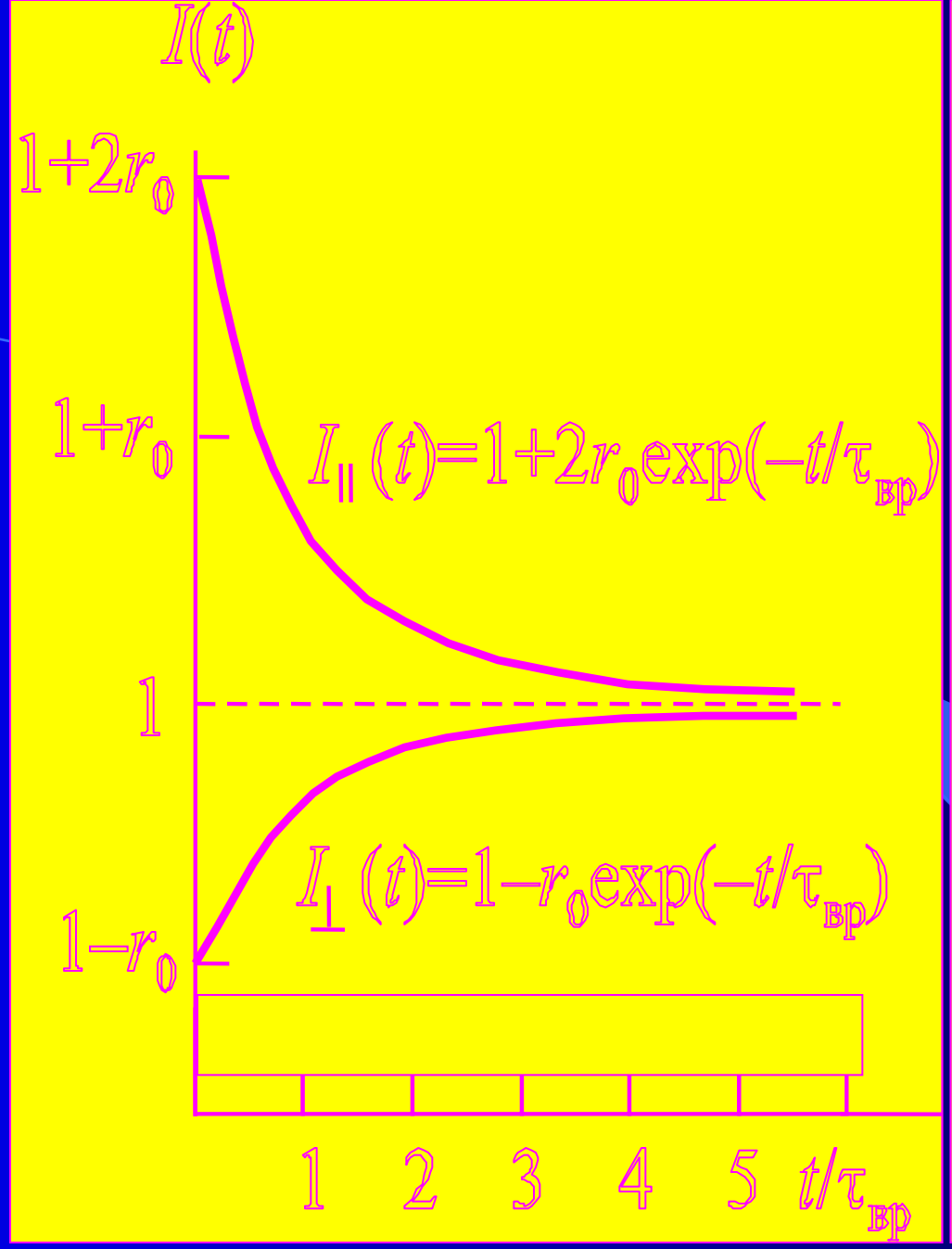
Растворитель	$B_{кв}$	$\tau_{фл}$ (нс)
Ацетонитрил	0,33	1,68
Изопропанол	0,13	0,82
Пропанол	0,09	0,47
Бутанол	0,06	0,34
Глицерин	0,05	0,211

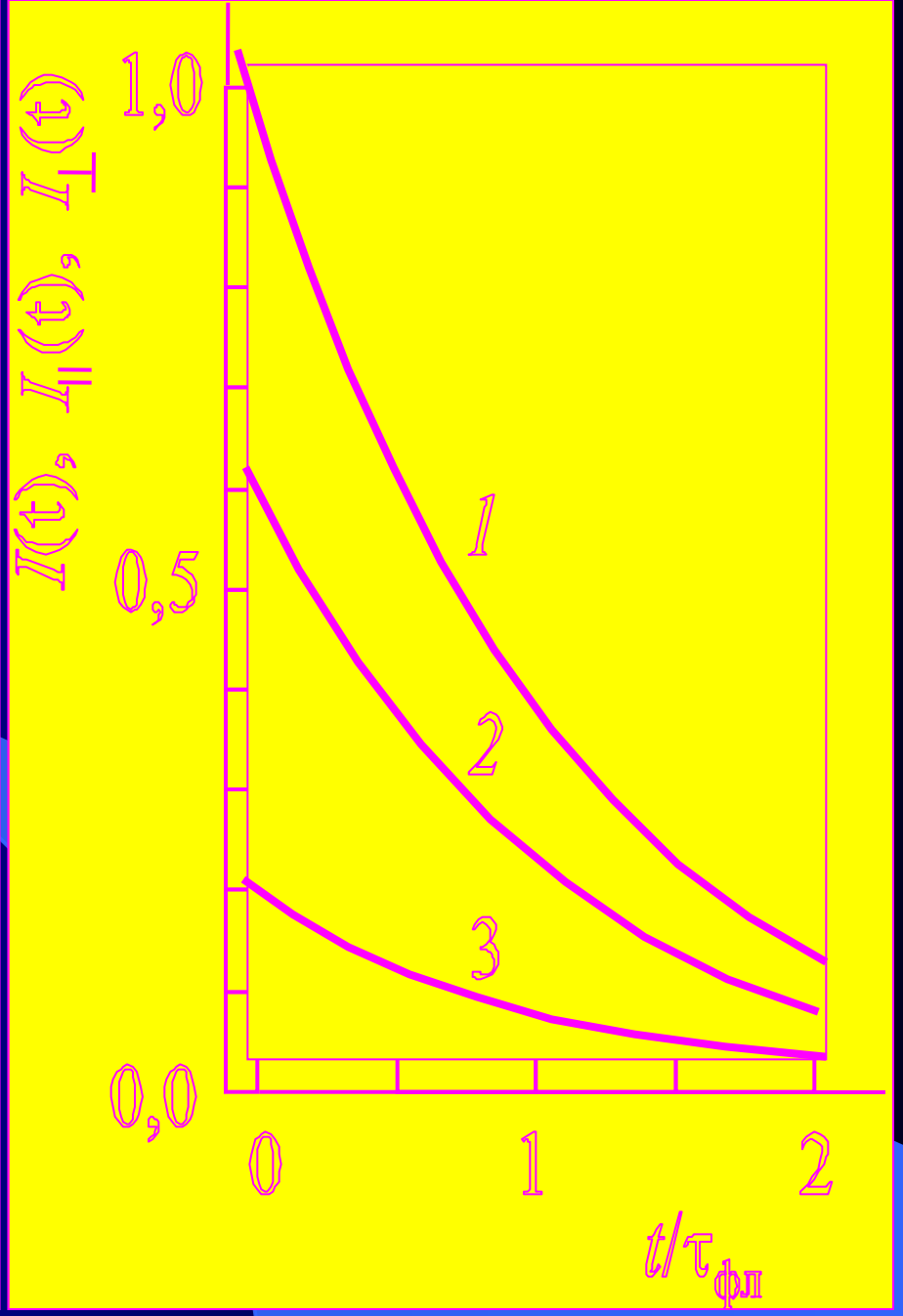
$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$

Кинетика затухания анизотропии излучения

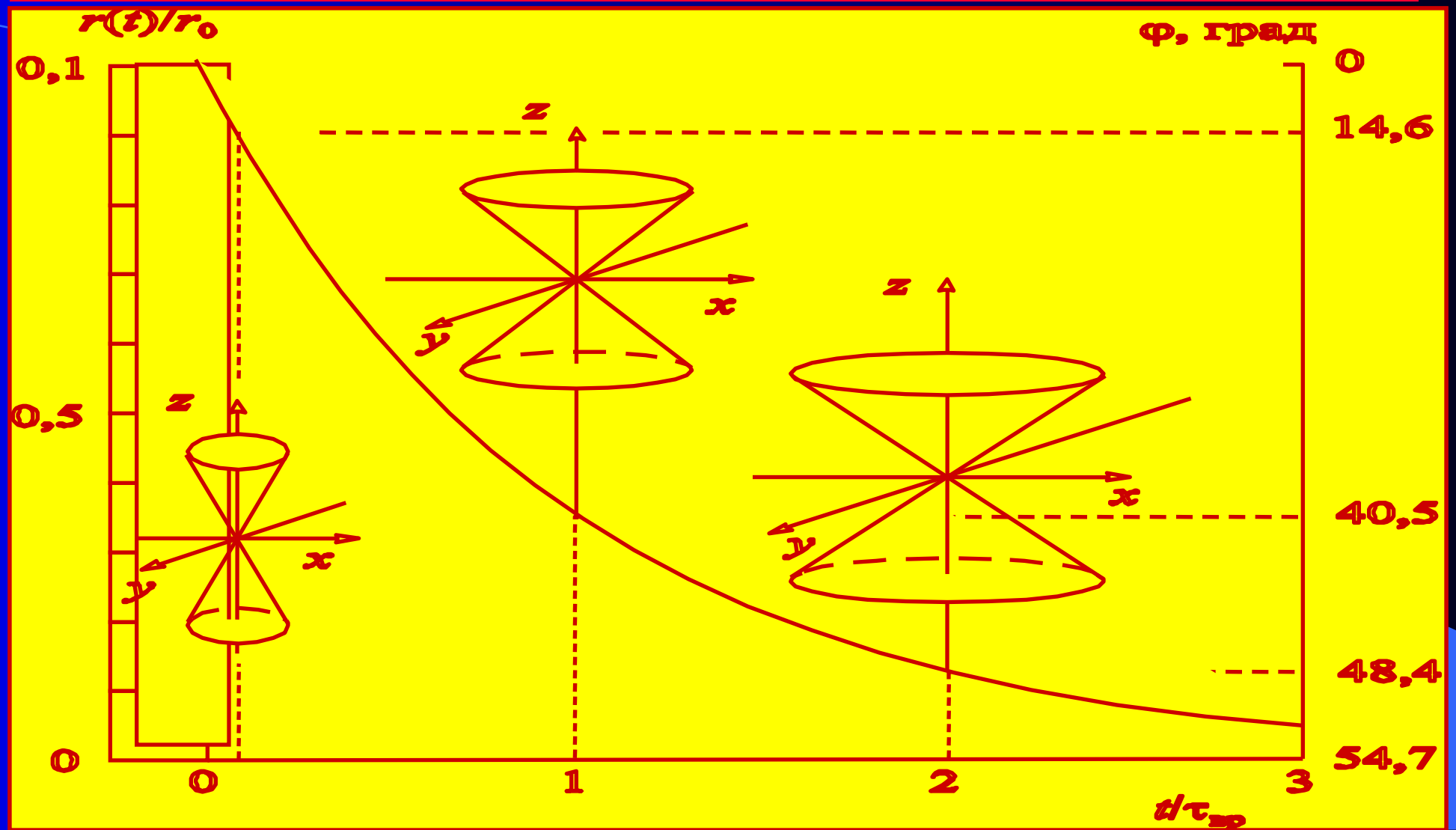
$$I_{\perp}(t) = \exp\left(-t/\tau_{\text{фл}}\right)\left[1 - r_0 \exp\left(-t/\tau_{\text{вр}}\right)\right]$$

$$I_{\text{P}}(t) = \exp\left(-t/\tau_{\text{фл}}\right)\left[1 + 2r_0 \exp\left(-t/\tau_{\text{вр}}\right)\right]$$


I(t)
1+2r0
1+r0
1
1−r0
I∥(t)=1+2r0exp(−t/τвр)
I⊥(t)=1−r0exp(−t/τвр)
1
2
3
4
5
t/τвр

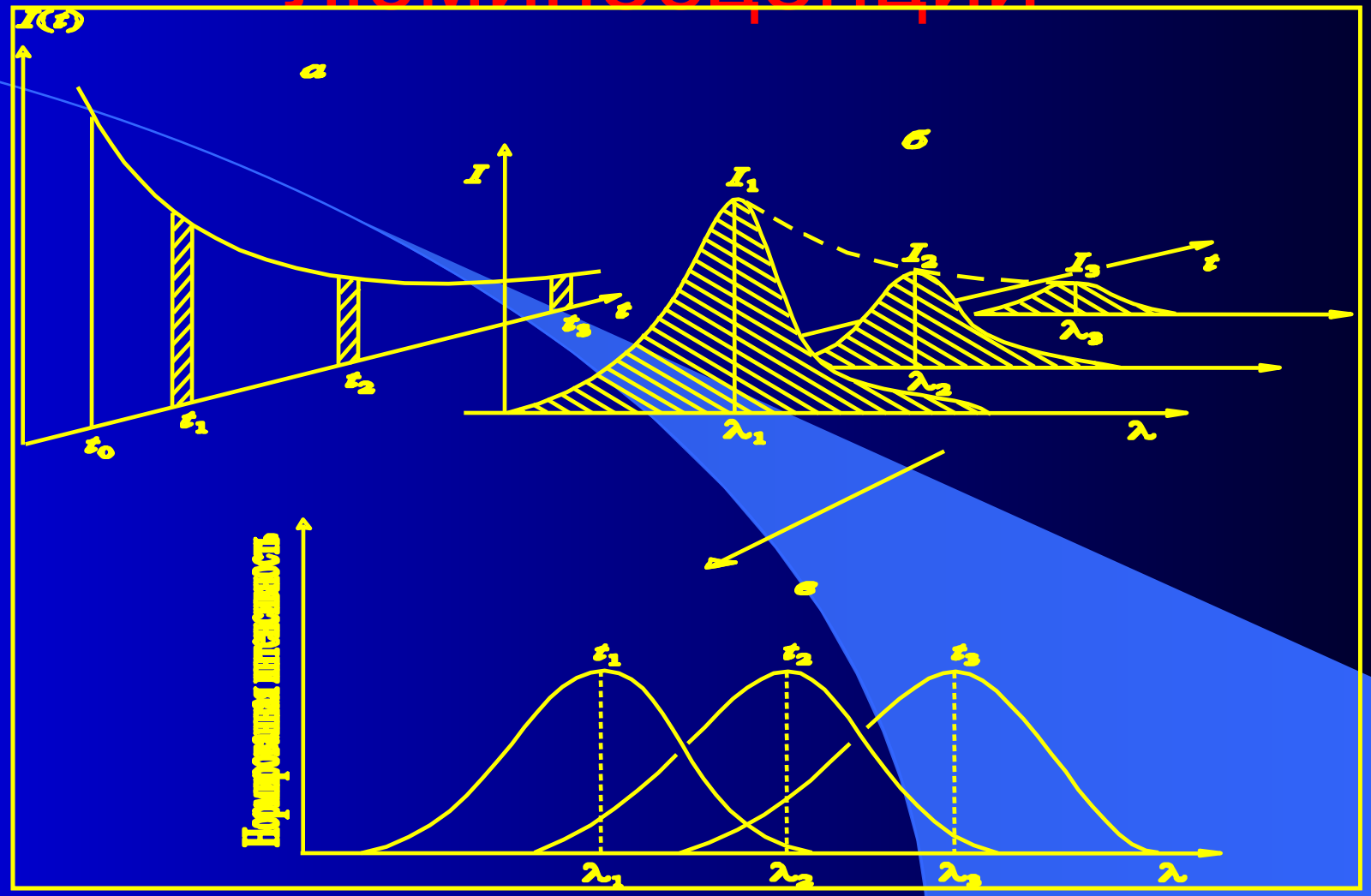

I∥(t), I⊥(t)
1,0
0,5
0,0
1
2
3
0
1
2
t/τфл

$$r(t) = r_0\left(\left(3\cos^2\varphi - 1\right)/2\right)$$



$$\frac{dN_2(t)}{N_2(0)} = Ae^{-At}dt$$

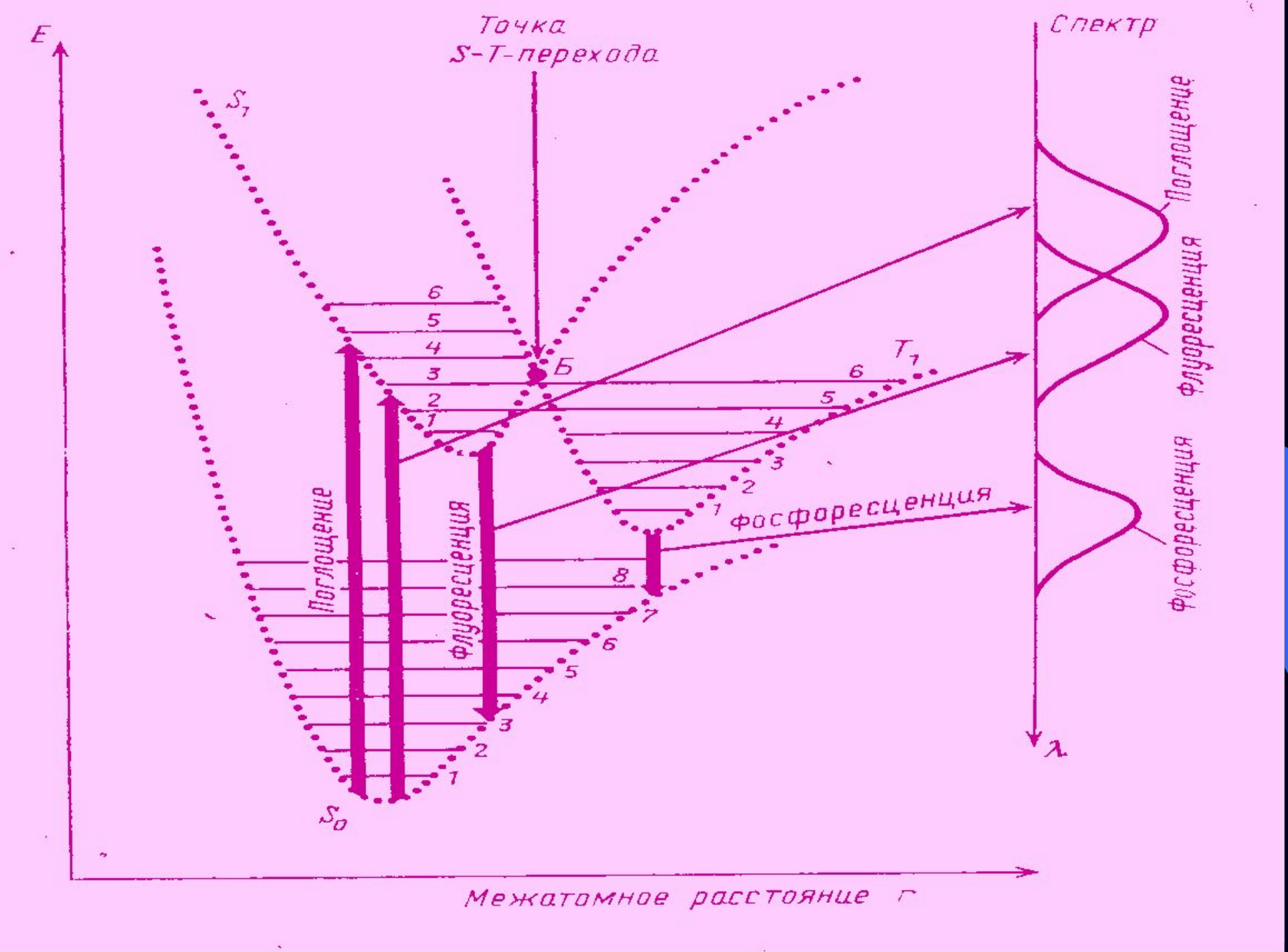
Мгновенные спектры люминесценции



Длительные процессы свечения

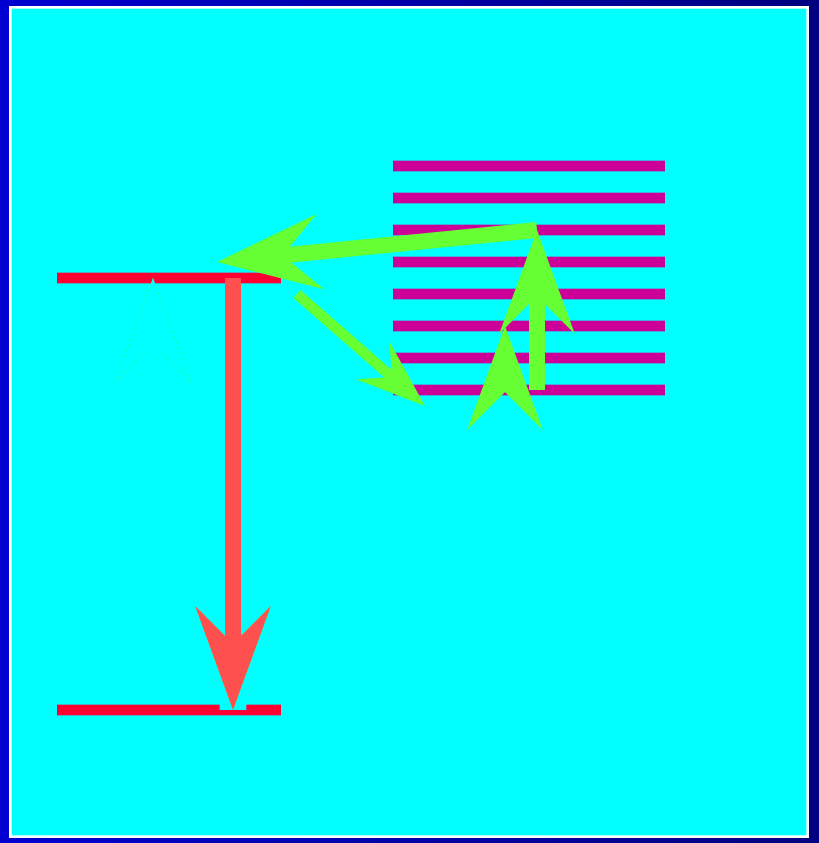
Фосфоресценция .Внутренняя и интекомбинационная конверсия

$$S_{0\,\text{фос}}\left[\uparrow\downarrow\right]+h\nu \rightarrow S_1\left[\uparrow\right]\left[\downarrow\right] \rightarrow T_1\left[\uparrow\right]\left[\uparrow\right] \rightarrow S_0\left[\uparrow\downarrow\right]+h\nu$$


E
Точка
S-T-перехода
Спектр
S_1
T_1
S_0
Б
Поглощение
Флуоресценция
фосфоресценция
Поглощение
Флуоресценция
Фосфоресценция
λ
Межатомное расстояние r

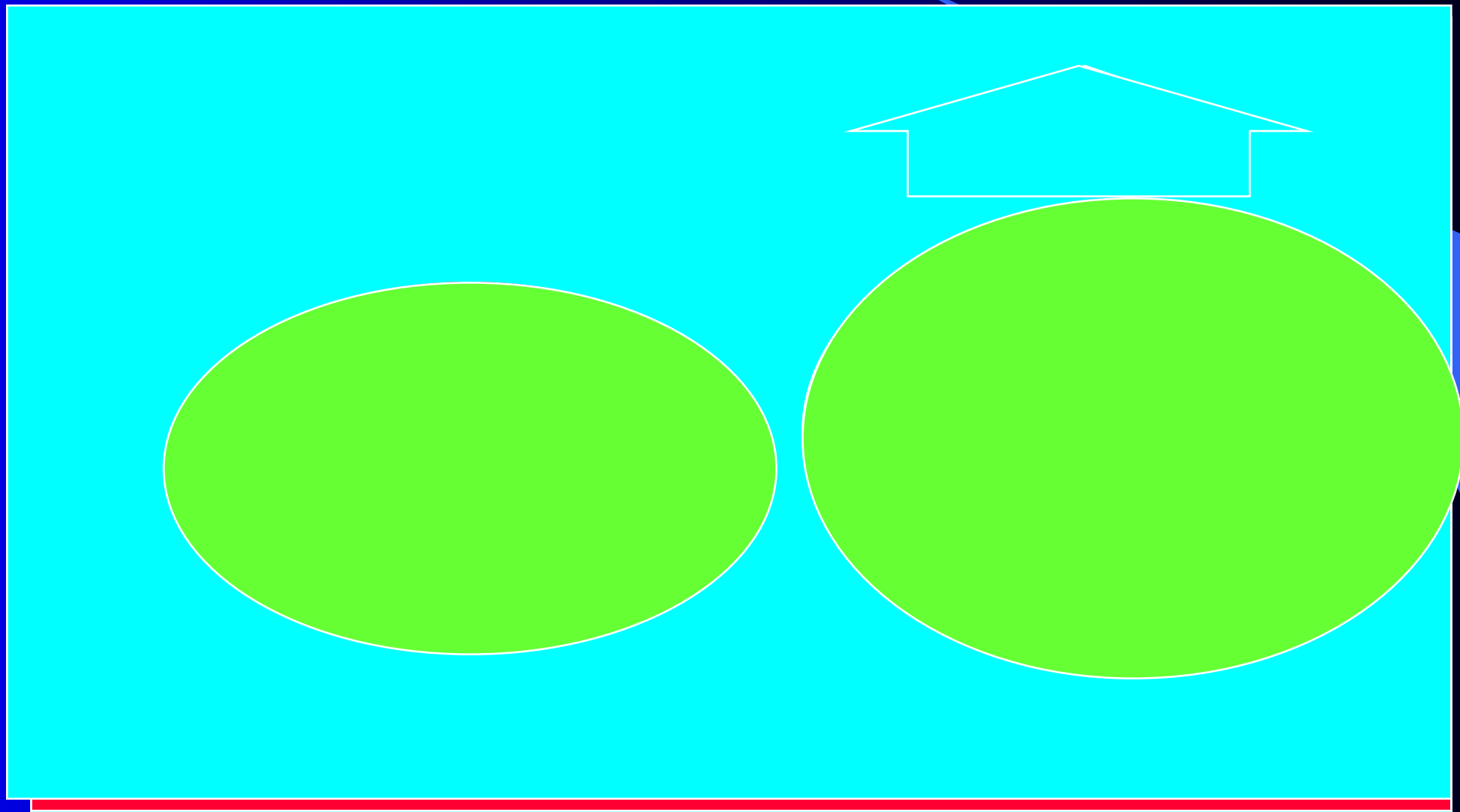
Процесс	
$h\nu_0 + S_0 \rightarrow S_1$ (возбуждение),	$I_{возб}$
$S_1 \rightsquigarrow S_0$ + тепло (внутренняя конверсия)	$k_{вк}[S_1]$
$S_1 \rightsquigarrow T_1$ + тепло (интеркомбинационная конверсия)	$K_{ST}[S_1]$
$T_1 \rightsquigarrow S_0$ + тепло (интеркомбинационная конверсия)	$K_T[T_1]$
$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{фос}$ (фосфоресценция),	$K_{фос}[T_1]$
$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{фл}$ (флуоресценция),	$K_{фл}[S_1]$
(замедленная флуоресценция)	$K_e[T_1]$

Замедленная люминесценция

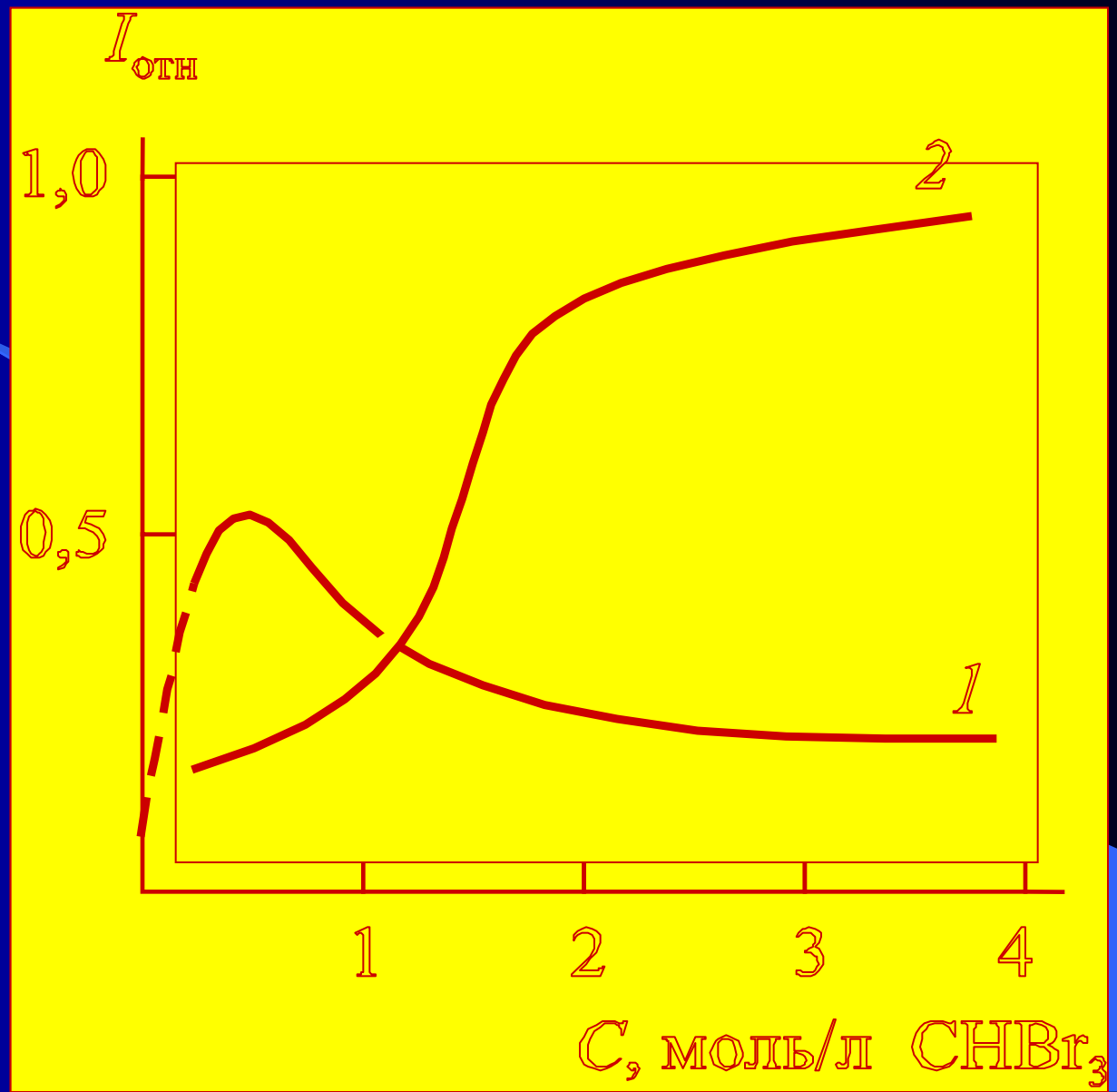


- Типа Е

Замедленная люминесценция



ЗФ-1, ФОС-2



Применение люминесценции

- Светотехническое применение
  - Люминесцентные лампы
  - электролюминесцентные сигнальные устройства
  - Дневные люминесцентные краски
  - “Светотехническое применение в живой природе”
- Детекторы невидимых излучений
  - Экраны для наблюдения ультрафиолетовых лучей
  - ИК излучение с помощью кристаллофосфоров
  - Рентгеноскопии (сцинтилляторы)

Применение люминесценции

- Кристаллофосфоры в электроннолучевых трубках
- Люминесцентный анализ
  - Обнаружения
  - Качественный
  - Количественный (структурный)
- Биологии
- Судебной экспертизе
- Метод люминесцентного зонда