

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Метод УФ-спектроскопии

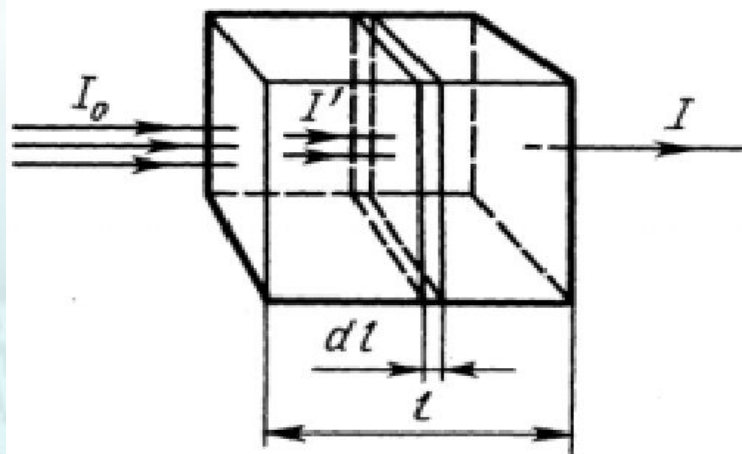
*Лабораторная работа №8
по «Генетике микроорганизмов»*

Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент

План:

- Теоретические основы метода УФ-спектроскопии
 - Понятия поглощения (оптической плотности), пропускания, молярной экстинкции
 - Обобщенный закон Бугера-Ламберта-Бера
 - Параметры спектров поглощения веществ
 - Закон аддитивности
 - Определение чистоты препарата и концентрации ДНК спектрофотометрическим методом

Теоретические основы



- Рассмотрим кювету с раствором какого-либо окрашенного вещества известной концентрации C
 - Толщина кюветы l
 - Пусть на кювету падает монохроматический световой луч интенсивности I_0 , а интенсивность луча, прошедшего через кювету и измеренного с помощью фотоприёмника, равна I

Пропускание

- Отношение интенсивностей прошедшего и падающего излучений называется **пропусканием** и обозначается T
 - $T = I/I_0$
- Величина T измеряется в долях единицы или в процентах.

Поглощение

- Отношение интенсивности света, поглощённого образцом ($I_0 - I$), к интенсивности падающего на кювету I_0 называется **поглощением**:

$$\text{▪ } (I_0 - I) / I_0 = 1 - I / I_0 = 1 - T$$

- Как видно из определения, величины пропускания T и поглощения ($1 - T$) изменяются в пределах от 0 до 1 (от 0 до 100 %)

Закон Бугера-Ламберта-Бера

- В общем случае поглощение $(1-T)$ не пропорционально концентрации вещества, поэтому для определения концентрации используют другой показатель – **оптическую плотность**

- $D = \lg(I/I_0)$

- Связь между оптической плотностью и концентрацией вещества описывается **законом Бугера-Ламберта-Бера**:

- $D = \epsilon C l,$

- где C – концентрация вещества, моль/л,

- l – толщина кюветы, см,

- ϵ – молярный коэффициент погашения (коэффициент экстинкции)

- Из определения оптической плотности очевидно, что

- $D = \lg(1/T)$

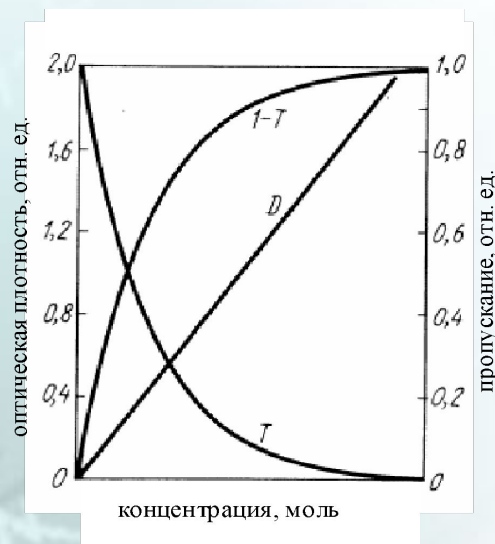
- Так как значения T заключены в пределах от 1 до 0, то величина D может изменяться от 0 до 2

Коэффициент молярной ЭКСТИНЦИИ

- Так как оптическая плотность – величина безразмерная, то **коэффициент молярной экстинции** будет иметь размерность $л/(моль \cdot см)$.
- Этот коэффициент и определяет поглощательную способность того или иного вида молекул и её зависимость от длины волны света, т.е. спектр поглощения $\epsilon=f(\lambda)$.

Параметры спектров поглощения

Спектр поглощения является «паспортом» вещества, благодаря которому возможна идентификация соединений



Зависимость пропускания (T), коэффициента поглощения (1-T) и оптической плотности (D) от концентрации хромофора в растворе

Параметры спектров поглощения

Наиболее важными параметрами спектров поглощения служат: положения максимумов спектра на шкале длин волн ($\lambda_{\text{макс}}$, нм), полуширины полос поглощения $\Delta\lambda_{1/2}$ (измеряются на половине высоты максимума), величины максимумов $D_{\text{макс}}$, а если их несколько, то и соотношение между ними.

Форма спектра поглощения зависит не только от типа вещества, но и от его состояния, характера молекулярного окружения (например, растворителя). Восстановление, окисление молекул, их агрегация, комплексообразование, водородные связи, изомеризация, изменение полярности (гидрофобности) окружения – все эти факторы существенно сказываются на спектрах поглощения, что позволяет исходя из измерения спектров, делать определённые выводы о характере состояния исследуемых веществ, конформации молекул и т.д.

Применение метода

- по измеренной на спектрофотометре оптической плотности $D = \lg(I/I_0)$ при известных ϵ и l можно определить концентрацию вещества

- $C = D / (\epsilon l)$

- Обычно оптическую плотность измеряют при длине волны, соответствующей максимуму поглощения. Наибольшая точность измерений достигается при оптической плотности 0,43. Точность измерения падает при слишком больших и при слишком маленьких поглощениях

D_{260}	Точность, %
~ 0,005	~ 18
~ 0,01	~ 9
0,3-0,7	~ 0,3
0,1-1,0	~ 1,0

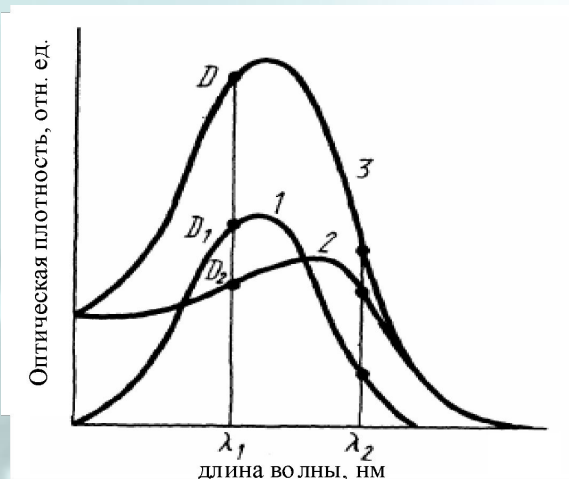
Закон аддитивности

Если в исследуемом объёме имеется несколько веществ, поглощающих в одной и той же спектральной области, то для оптической плотности выполняется **закон аддитивности** для каждой длины волны

$$D_{AB} = D_A + D_B,$$

для пропускания

$$T_{AB} = T_A T_B.$$

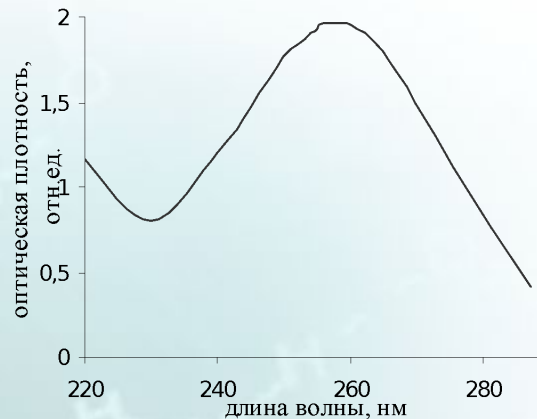


1,2 – спектры компонентов; 3 – спектр смеси

Количественный спектрофотометрический анализ смеси двух веществ

Измерение спектра поглощения ДНК

- Максимум поглощения ДНК $\lambda_{\text{макс}}$ приходится на длину волны около 260 нм



- а $\epsilon=6600$, однако, индивидуальные основания имеют $\lambda_{\text{макс}}$ (в нм):
 - 260,5 для аденина;
 - 264,5 для тимина;
 - 246 для гуанина и
 - 267,0 для цитозина
- Соответственно ϵ оснований при $\lambda_{\text{макс}}$ $13,4 \times 10^3$, $7,9 \times 10^3$, $10,7 \times 10^3$, $6,1 \times 10^3$

Измерение спектров биологических препаратов

- Неравномерное распределение вещества приводит к тому, что часть света проходит мимо частиц не поглощаясь - *эффект сита* увеличивает интенсивность прошедшего света I , а следовательно и светопропускание T (D падает)
 - Гетерогенность биологических образцов приводит к рассеянию на границах раздела фаз «среда–частица» свет не попадает на фотоприёмник вызывая кажущееся падение I (T падает, а D возрастает)
- В результате максимумы сглаживаются и уширяются полосы поглощения
 - Чтобы избежать этого, необходимо использование более тонких и гомогенных образцов, а также сред с более близкими к частицам коэффициентами преломления

Измерение спектров биологических препаратов

(a) Measurement of optical density

