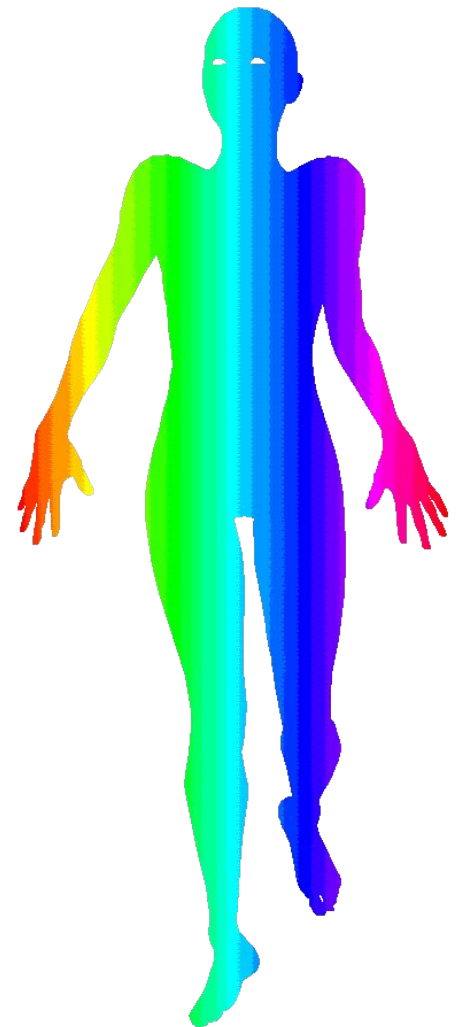


Спектрофотометрия и спектрофлуориметрия.

Выполнила: Егорова С. В.

Спектрофотометрия – это метод исследования и анализа веществ, основанный на измерении спектров поглощения в оптической области электромагнитного излучения.



Закон Бугера-Ламберта-Бера

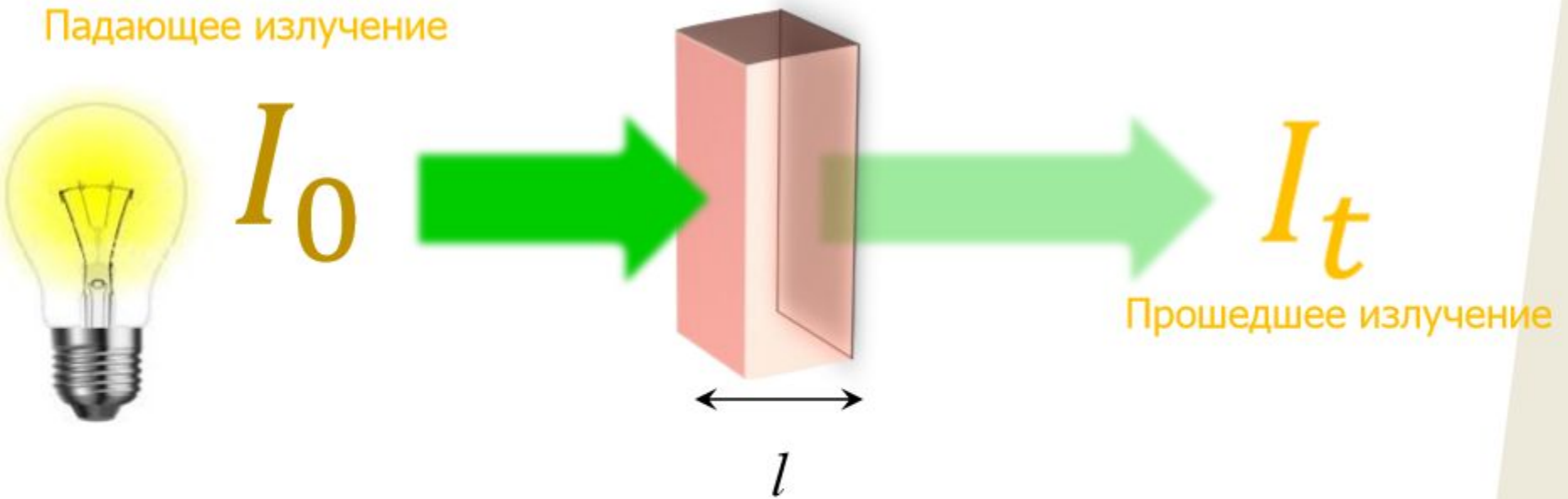
$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-kcl}$$

T — пропускание (transmittance)

$$-\lg T = A \equiv \lg(I_0 / I) = klc$$

A — оптическая плотность (absorbance)

Закон Бера в



$$A \equiv \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon l c$$

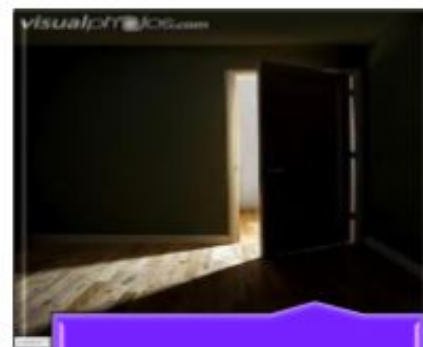
Отклонения от закона Бера могут быть вызваны следующими факторами:



Ограничения закона Бера
(нет в спектрофотометрии)



Немонохроматичность
излучения



Рассеянный свет в приборах



Изменение химического
состава с концентрацией



Светорассеивающие
образцы

Молярный коэффициент поглощения

ϵ л/(моль см)

оптическая плотность 1М раствора,
измеренная при $l = 1$ см

apparent molar absorptivity

Так как часто измерить поглощение растворов с концентрациями порядка 1 М затруднительно, то измеряют существенно более разбавленные растворы, а такой коэффициент поглощения называют «**кажущимся**»

Связь структуры молекул и оптических спектров поглощения

Способность поглощать излучение определенных длин волн зависит от электронного строения молекулы, в частности, от наличия атомов или структурных фрагментов с характерными полосами поглощения — хромофоров

Неорганические: Fe(II, III) V(IV, V)
Cr(III, VI) Mn(VI, VII)

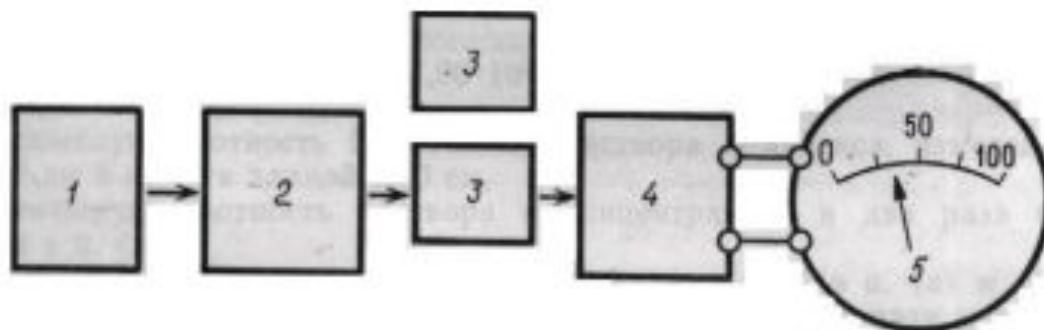
Органические: C=C C≡C C=O -NO₂ N=N C=S

Техника спектрофотометрии

Фактически, в спектрофотометрических измерениях пропускание T **раствора сравнения** приравняется единице, $\Rightarrow$ оптическая плотность приравняется нулю.

- Данный этап часто носит название «**установка нуля оптической плотности**» и является важным этапом **калибровки** фотометрического прибора

Устройство спектрофотометра



1 – источник излучения энергии; 2 – диспергирующее устройство, позволяющее выделить ограниченную область длин волн; 3 – кюветы для пробы и растворителя; 4 – детектор, превращающий энергию излучения в измеряемый сигнал; 5 – индикатор сигнала со шкалой

Спектрофлуориметрия

Согласно представлениям квантовой химии, **электроны** в атомах расположены **на энергетических уровнях**. Расстояние между энергетическими уровнями в молекуле зависит от её строения. При облучении вещества светом возможен **переход электронов** между различными энергетическими уровнями. Разница энергии между энергетическими уровнями и частота колебаний поглощенного света соотносятся между собой уравнением (II постулат Бора):

$$E_2 - E_1 = h\nu$$

После поглощения света часть полученной системой энергии расходуется в результате релаксации. Часть же может быть испущена в виде фотона определённой энергии.

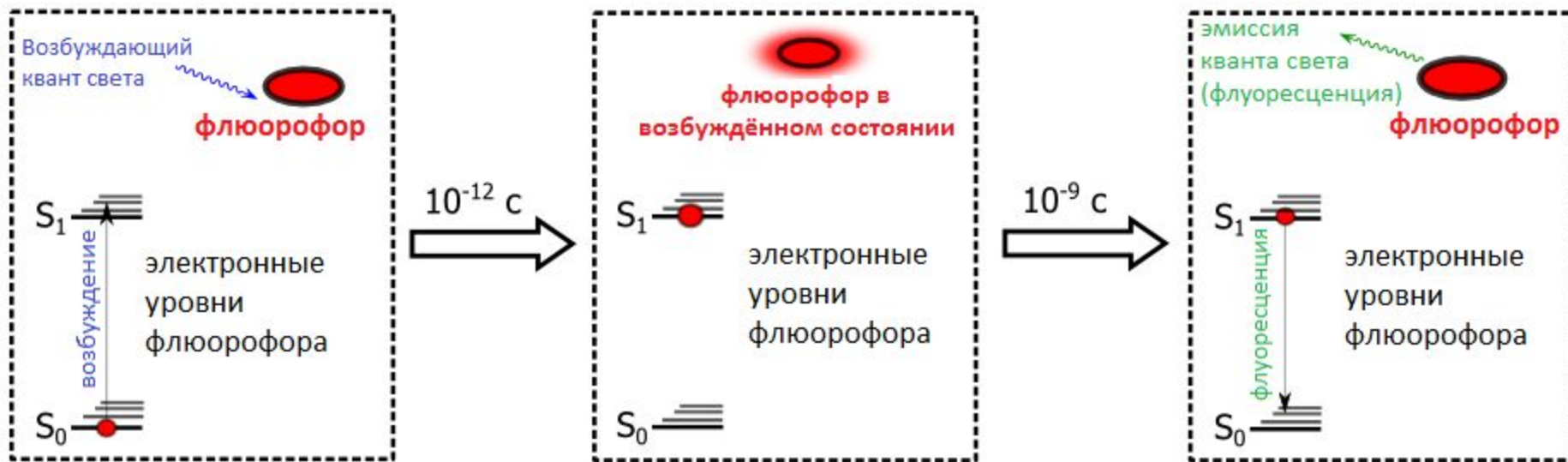
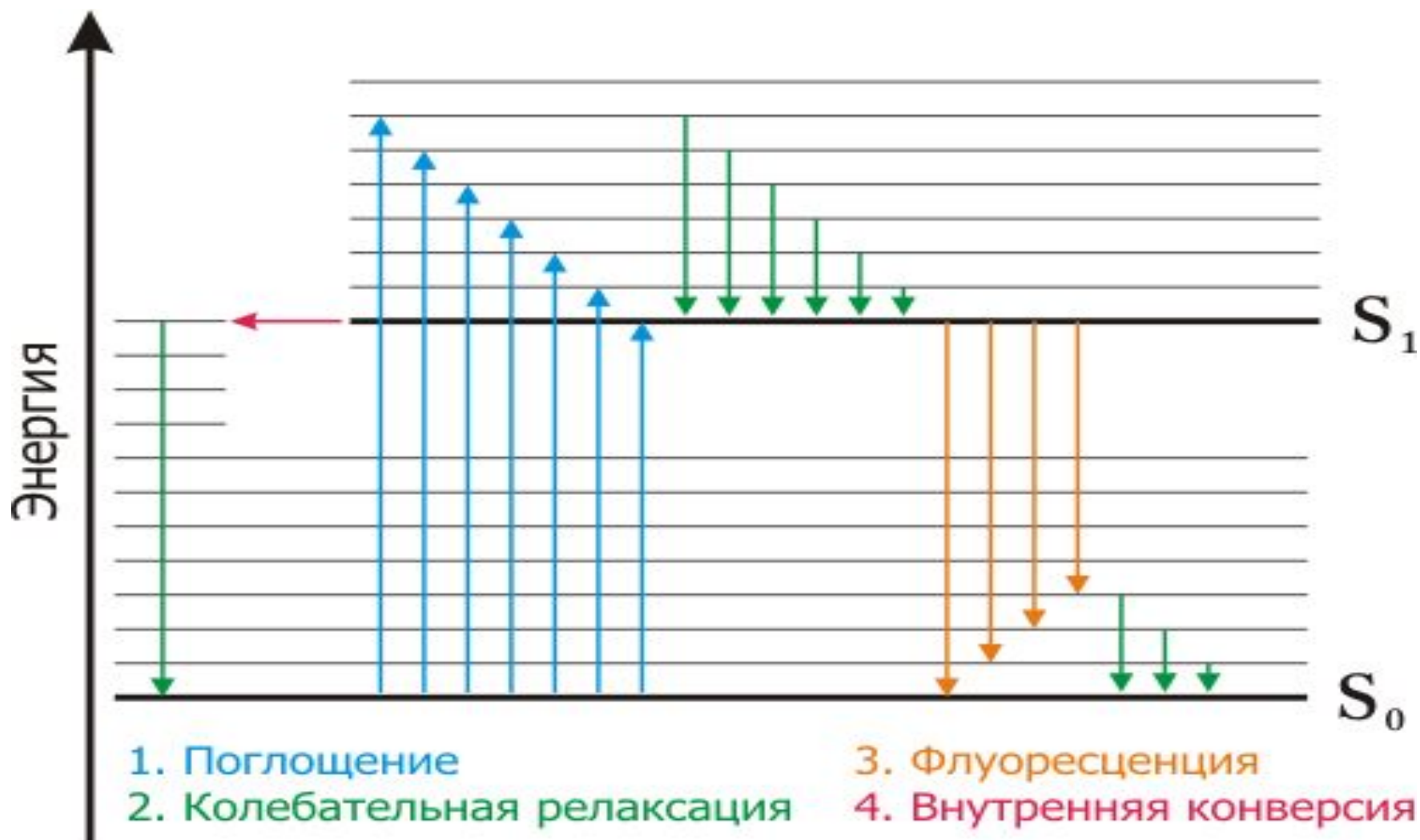


Диаграмма Яблонского



Законы флуоресценции.

Зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны (частоты) называется спектром флуоресценции.

$I_f = f(\lambda)$, $I_f = f(\nu)$, где I_f - интенсивность света в отн. ед.

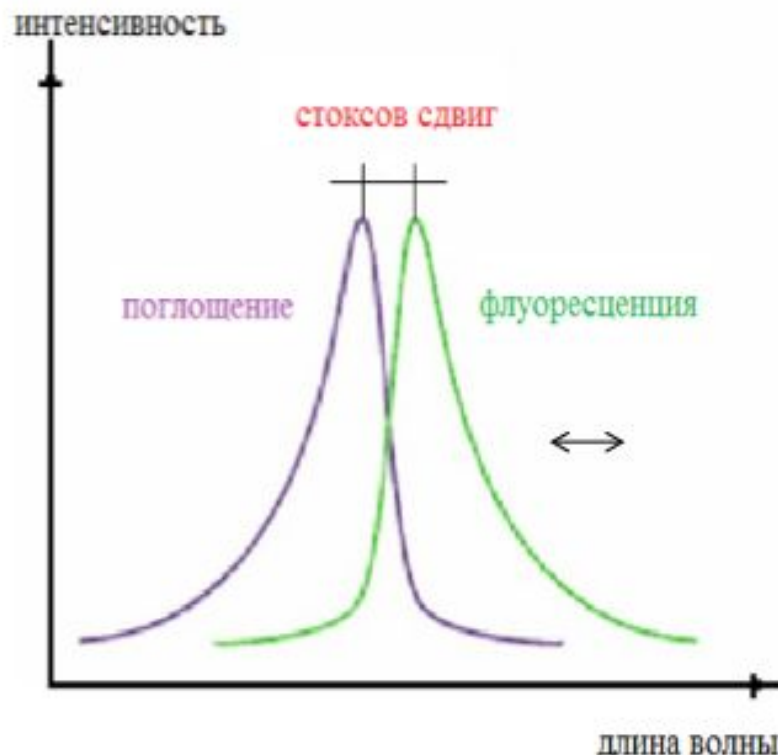
1. **Правило Стокса.** Спектр флуоресценции сдвинут в сторону больших длин волн по сравнению со спектром поглощения того же вещества.
2. **Правило Каша.** Спектр флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света, т.к. излучение всегда происходит с нижнего колебательного уровня первого возбужденного состояния.
3. **Правило Левшина.** Спектр ФЛ по форме зеркально симметричен длинноволновой полосе спектра поглощения.
4. **Закон Вавилова.** Квантовый выход ФЛ не зависит от длины возбуждающего света.

Правило Стокса

Спектр флуоресценции, как правило, сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн.

Существует, однако, **антистоксовый люминофор**, излучающий более коротковолновое излучение, чем падающее.

Как правило, одно и то же вещество способно испускать излучение как в стоксовой, так и в антистоксовой областях спектра относительно частоты возбуждающего люминесценцию излучения.



Данное правило принято объяснять потерей некоторой части поглощённой энергии на тепловое движение молекул.

Правило Каши

Спектр флуоресценции не зависит от длины волны возбуждающего света.

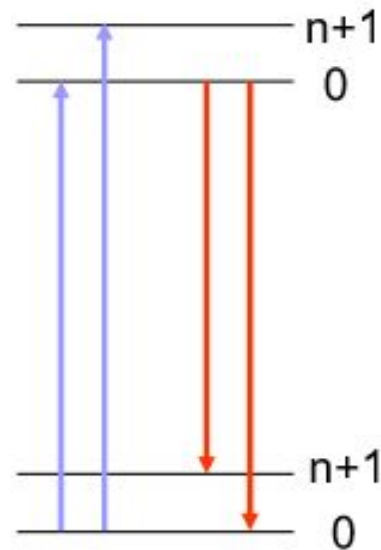
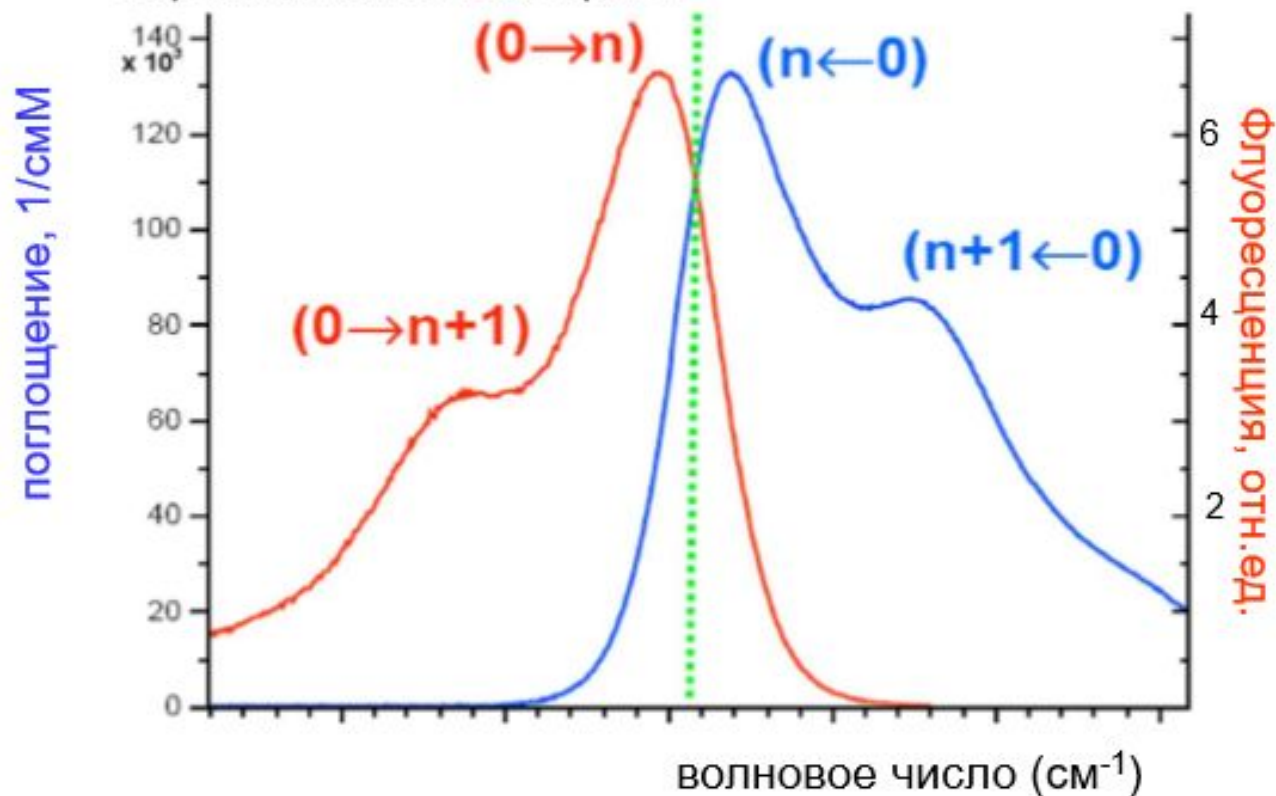
Данное правило применимо к спектрам излучения молекул, находящихся в возбуждённом состоянии.

Поглощая фотон, электрон, находящийся на основном энергетическом уровне (обозначается как S_0 в случае синглетного состояния) может, в зависимости от длины волны поглощённого кванта света, возбудиться и перейти на один из более высоких энергетических уровней (обозначаются как S_n , где $n > 0$). Однако, согласно правилу Каши, испускание фотона (в случае S уровня обозначаемое как флуоресценция) может происходить только с самого низкого возбуждённого энергетического уровня S_1 .

Правило Левшина

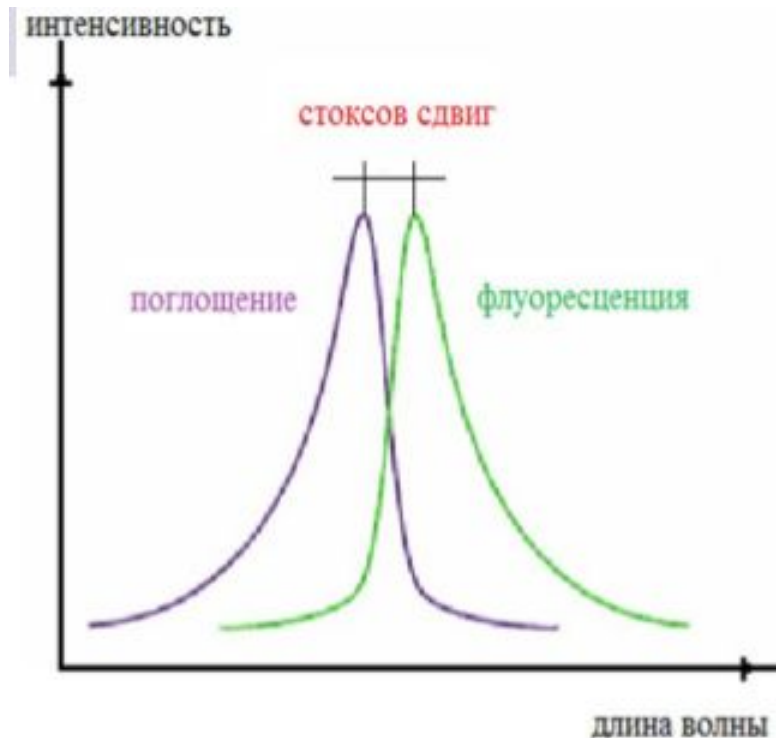
Спектр ФЛ по форме зеркально симметричен длинноволновой полосе спектра поглощения.

В действительности колебательная структура возбужденных молекул несколько иная, что проявляется в нарушении закона зеркальной симметрии.



Закон Вавилова

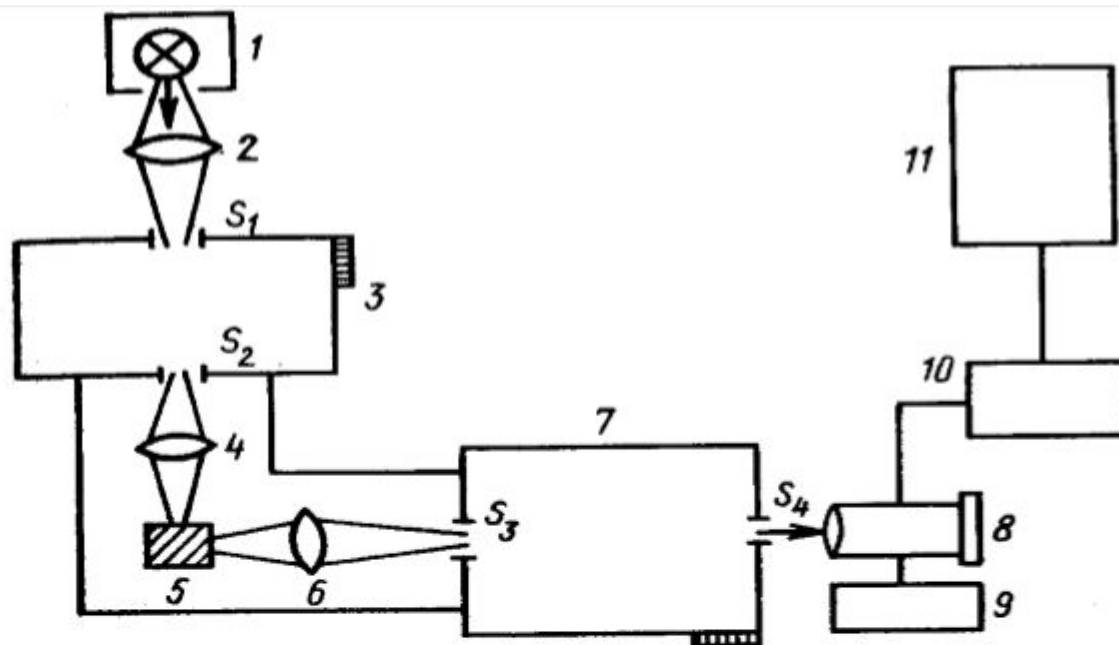
Квантовый выход не зависит
от длины волны
возбуждающего света.



Согласно закону Вавилова:

- квантовый выход постоянен при изменении в широких пределах длины волны возбуждающего света в стоксовской области
- квантовый выход падает если длина волны возбуждающего света лежит в антистоксовой области

Устройство флуориметра



Спектрофлуориметры предназначены для регистрации **спектров ФЛ** и **спектров возбуждения ФЛ**. Схема установки для измерения спектров флуоресценции и возбуждения флуоресценции на рис.

1 - источник возбуждающего света, 2, 4, 6 - фокусирующие линзы, 3 - первый (возбуждающий) монохроматор, 5 - кювета с образцом, 7 - второй (регистрирующий) монохроматор, 8 – фотоумножитель, 9 - источник питания фотоумножителя, 10 – усилитель, 11 - потенциометр; S₁ - S₄, - щели монохроматоров.

При флуоресцентном анализе макромолекул используются два типа молекул флуоресцирующих хромофоров: **собственные хромофоры и внесенные хромофоры**. Рассмотрим собственную флуоресценцию.

Белки содержат только три собственных флуорофора - остатка **триптофана, тирозина и фенилаланина**.

Основная цель изучения собственной флуоресценции белков - **получение информации об их конформации**. Возможность этого обусловлена тем, что флуоресценция триптофана, как и флуоресценция тирозина существенно зависит от окружения (т.е. растворителя, pH, присутствие тушителя, малой молекулы или соседних групп в белке).

Эмпирические правила для интерпретации спектров флуоресценции белков

1. Вся флуоресценция белка обусловлена наличием остатков триптофана, тирозина и фенилаланина.
2. При уменьшении полярности растворителя λ_{max} в спектре флуоресценции триптофана смещается в область более коротких волн, а интенсивность при λ_{max} возрастает.
3. Если вещество, известное как тушитель, например, иодид, нитрат, или ионы цезия, тушат флуоресценцию триптофана или тирозина, то эти аминокислоты должны быть на поверхности белка. Если тушения не происходит, то это возможно по нескольким причинам:
 - а) Аминокислота находится внутри молекулы.
 - б) Аминокислота находится в полости, размеры которой слишком малы, чтобы туда вошел тушитель.
 - в) Аминокислота в сильно заряженном участке, и заряд может отталкивать тушитель (если тушитель заряжен противоположно).
4. Если вещество, которое не влияет на квантовый выход свободной аминокислоты, действует на флуоресценцию белка, то это происходит за счет конформационных перестроек белка.
5. Если триптофан или тирозин находится в попеременном окружении, характерные для них величины Q понижаются при возрастании температуры, тогда как в неполярном окружении изменения величин Q незначительны.
6. Q триптофана и тирозина понижается, если α -карбоксильная группа этих аминокислот протонирована.
7. Флуоресценция триптофана тушится соседними протонодонорными группами. Следовательно, если pK , измеренная путем контроля флуоресценции триптофана, такой же, как pK известной, способной к ионизации группы (например, имидазола гистидина), то эта группа должна находиться очень близко от триптофана.
8. Если при связывании какой-либо молекулы с белком тушится флуоресценция триптофана, то это происходит либо в результате конформационной перестройки белка, либо часть триптофановых участков находится в месте связывания или близко от него.

Конечно все эти правила не дают абсолютной уверенности в правильности интерпретации, поскольку флуоресценция очень чувствительна к факторам окружения, тем

Внесенная флуоресценция

Вносят путем образования химических связей с флуоресцирующей меткой.

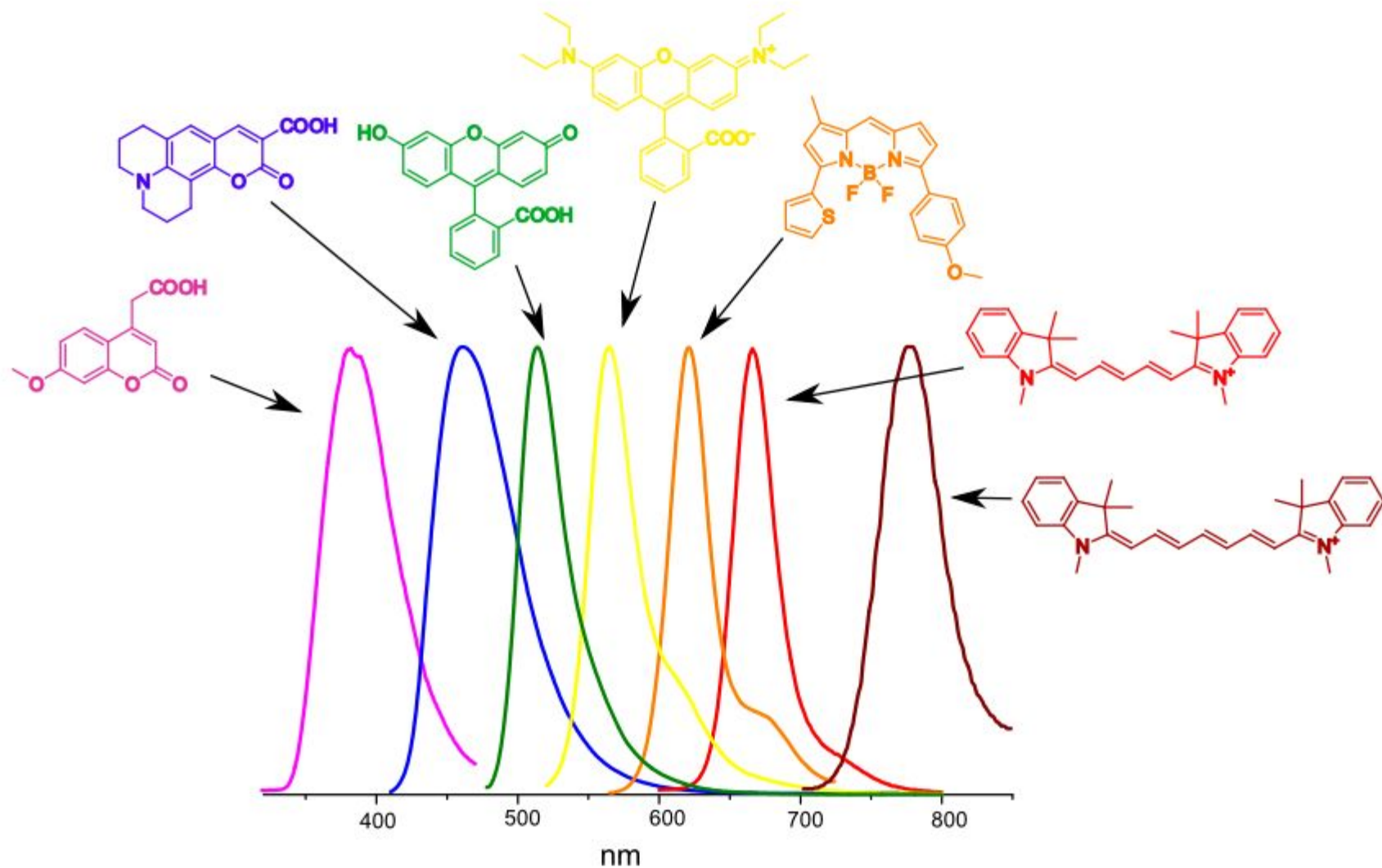
Требования к внесенному хромофору:

1. Должен прочно связываться с определенным участком молекулы
2. Его флуоресценция должна быть чувствительна к условиям окружения(рН, полярность растворителя, вязкость)
3. Внесенные хромотофору не должны влиять на свойства исследуемой молекулы

Флуоресцентные вещества, применяемые в биологии, можно условно разделить на две большие группы: **флуоресцентные зонды** и **флуоресцентные метки**.

1. **Флуоресцентные метки** служат для того, чтобы идентифицировать наличие или пространственное положение исследуемой молекулы. Флуоресцентная метка должна быть химически стабильной и демонстрировать стабильную флуоресценцию, которая не зависит от внешних факторов и минимально меняется во времени. Таким образом, она действует как пассивный «маяк», который сигнализирует о месте нахождения молекулы, к которой привязана.
2. **Флуоресцентный зонд** является более сложным по своим функциям. Это молекулярная конструкция, которая может существовать в двух состояниях: «выключенном» и «включённом». Эти состояния различаются между собой определёнными параметрами флуоресцентной эмиссии (чаще всего квантовым выходом флуоресценции, позицией максимума в спектре эмиссии или временем жизни возбуждённого состояния). Переход между «включён» и «выключен» состояниями зависит от наличия в среде зонда тех молекул, которые он должен распознавать.

Флуоресцентные спектры красителей различного химического строения



Достоинства флуоресценции по сравнению со спектрофотометрией:

- 1) Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации вещества
- 2) Флуоресцентные методы обладают высокой чувствительностью
- 3) Обладает спектральной избирательностью, т.к. благодаря стоковскому сдвигу используются 2 монохроматора.
- 4) Не нужна кювета сравнения.

Недостатки:

- 1) Наличие тушителей.
- 2) Когда флюоресценция переходит не в световую, а в тепловую энергию