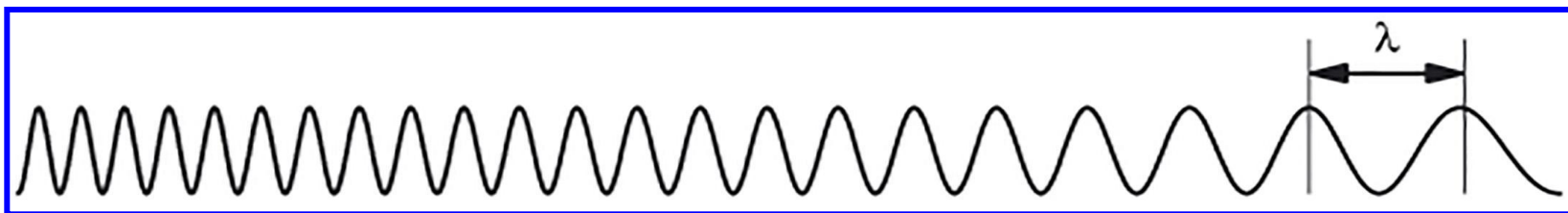


АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ В УФ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ

УФ и видимый диапазоны спектра



- C** – поддиапазон: полностью задерживается озоновым слоем в стратосфере на высоте около 50 км (**особо цитотоксичен**).
- B** – поддиапазон: поверхности земли достигает около 10% исходного (**цитотоксичен**).
- A** – поддиапазон: достигает поверхности земли. **Только этот поддиапазон УФ вызывает фотоэффекты у живых объектов, необходимые для процессов их жизнедеятельности.**

Энергия любого вида электромагнитного излучения (в том числе и светового) поглощается и излучается отдельными порциями. Эти порции энергии обладают свойствами материальной частицы и называются *квантами излучения или фотонами*.

Энергия кванта (фотона):

$$E = h \times \nu; \quad \nu = \frac{h}{\lambda}$$

h – постоянная Планка

ν - частота, Гц

Энергия кванта прямо пропорциональна частоте (ν) и обратно пропорциональна длине волны (λ).

Абсорбционная спектроскопия в УФ и видимой областях спектра служит для:

- **Высокочувствительного качественного анализа сложных смесей веществ.**
- **Высокочувствительного количественного анализа.**
- **Изучения структуры веществ, а также для оценки её изменений в различных условиях.**

Достоинства:

- **Изучаемые вещества не разрушаются.**
- **Высокая чувствительность методов.**
- **Высокая специфичность методов.**
- **Возможность обнаружения низких концентраций веществ в составе сложных смесей без их предварительного разделения.**

Взаимодействие кванта (фотона) с веществом

1. Квант светового излучения не взаимодействует с веществом. При этом энергия кванта не поглощается веществом, квант изменяет свое направление – происходит рассеивание светового излучения.
2. Квант светового излучения поглощается веществом. Это обусловлено тем, что сама молекула (функциональная группа в составе молекулы) является **хромофором**. Именно хромофор поглощает энергию кванта.

Хромофор поглощает только те кванты, энергия которых равна **разнице энергий** электронов хромофора в его основном и возбужденном состояниях:

$$h\nu = E_{e^- \text{ возб. сост.}} - E_{e^- \text{ осн. сост.}}$$

Этим объясняется феномен: разные вещества (хромофоры) поглощают световые излучения с разной длиной волны (λ).

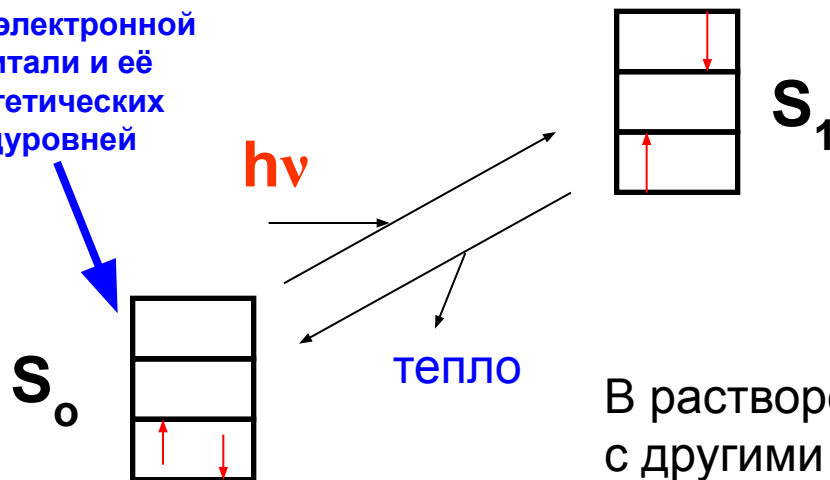
Основное и возбужденное состояние вещества

Основное (невозбужденное) состояние вещества (S_0) – вещество не поглощает и не излучает энергию.

Когда вещество поглощает квант энергии – происходит его переход в **возбужденное (S_1) состояние**.

S – синглетное состояние (спин e^- не меняется)

Схема электронной орбитали и её энергетических подуровней

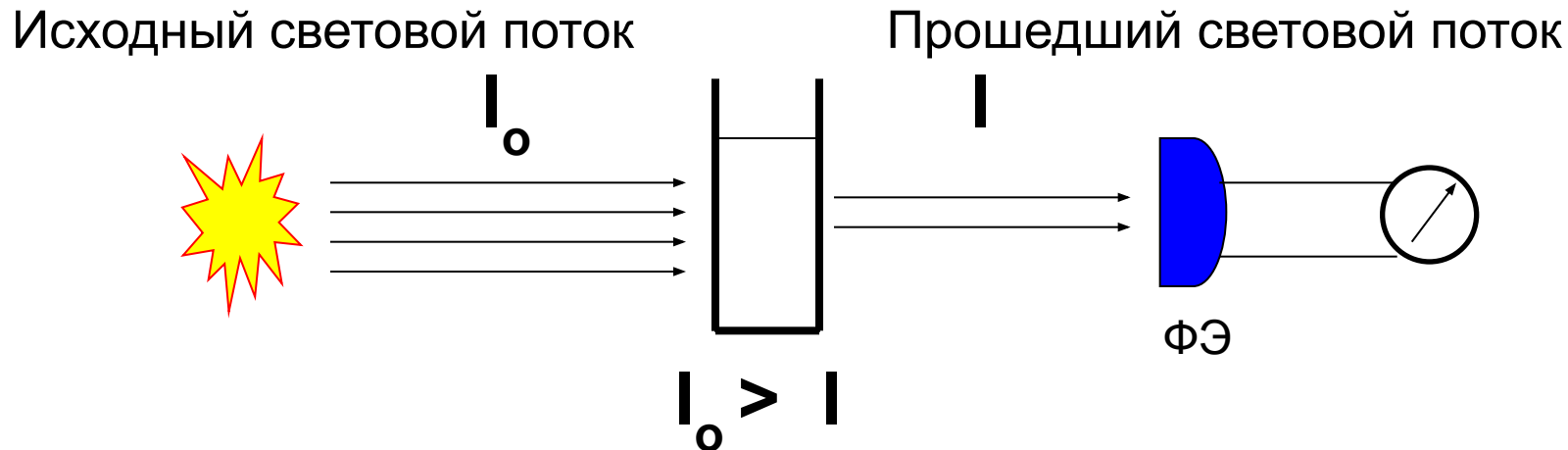


Электроны переходят с орбиталей нижних энергетических уровней на орбитали с высоким энергетическим уровнем (спин e^- сохраняется).

S_1 – состояние длится 10^{-8} - 10^{-9} с

В растворе возбужденная молекула соударяется с другими молекулами с частотой 10^{12} с, теряет энергию и возвращается в состояние S_0 .

Поглощение светового излучения средой описывает закон Ламберта-Бугера-Бэра



Как измерить интенсивность прошедшего светового потока?

$$\%T \text{ (светопропускание)} = I \times 100\% / I_0$$

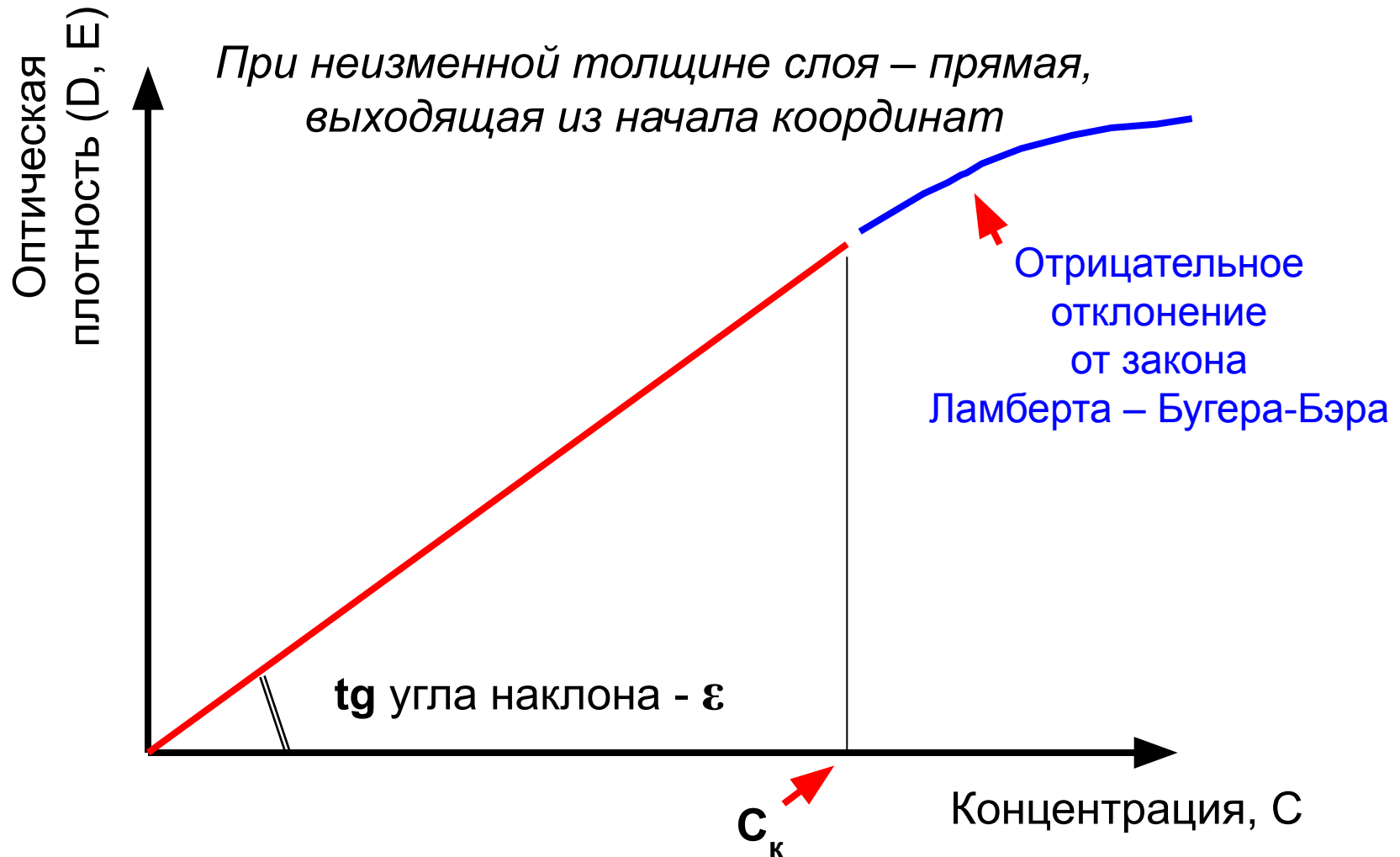
$$E, A \text{ (ABS)}, D \text{ (экстинкция, оптическая плотность)} = \lg I_0 / I$$

Закон выражает связь между E и C :

$$E = \varepsilon \times C \times l$$

C – mol/l ; l – толщина слоя, cm ; ε – молярный коэффициент экстинкции, $l / (mol \times cm)$

Зависимость оптической плотности (экстинкции) от концентрации поглощающего вещества в растворе

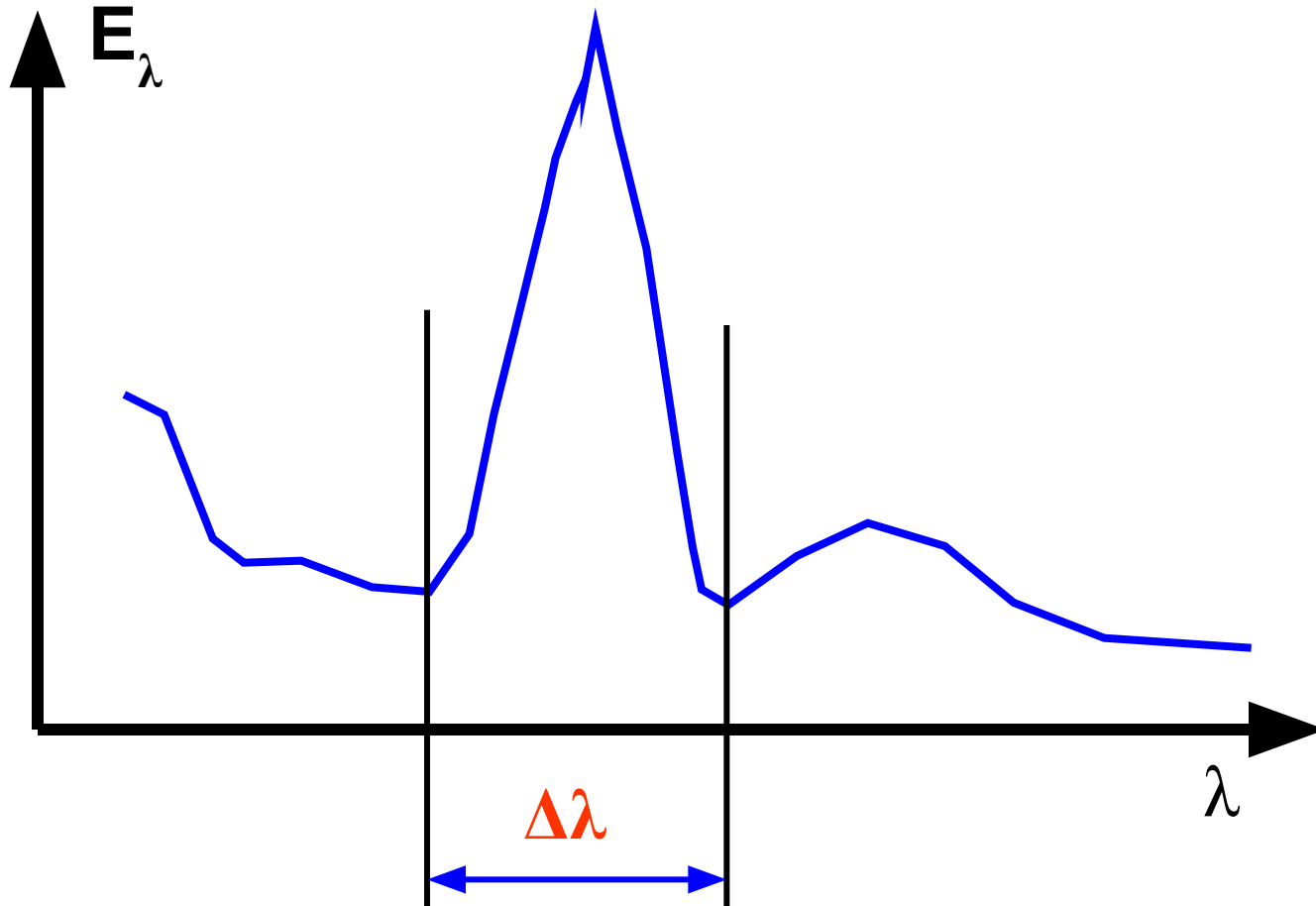


Основные причины отклонений от закона Ламберта – Бугера - Бэра

- реакции ассоциации, диссоциации или химические взаимодействия соединения с растворителем (хим. реакции продолжают происходить в кювете спектрофотометра);
- флуоресценция анализируемого вещества в растворе. Весь вторичный световой поток попадает на фотоэлемент. При большой толщине слоя – происходит тушение флуоресценции;

- немонохроматичность падающего на образец света (I_0) при большой ширине спектральной щели. При этом могут быть существенные отличия в распределении интенсивности световых пучков с разной λ . Это особенно сильно проявляется у веществ с очень узким диапазоном поглощения. Для устранения возможной ошибки выбирают ширину спектральной щели \leq полуширины исследуемой полосы ($1/2 \Delta\lambda$);
- присутствие рассеянного и/или отраженного света (дефекты призм, зеркал, пыль и тд.);
- неисправность фотоэлемента, усилителя прибора.

$\Delta\lambda$ – ширина полосы поглощения



Ширина спектральной щели $< \frac{1}{2} \Delta\lambda$

Спектр поглощения

Спектр поглощения (абсолютный спектр поглощения) – зависимость количества поглощенного света от длины волны.

У каждого вещества спектр поглощения уникален – это его «молекулярный паспорт».

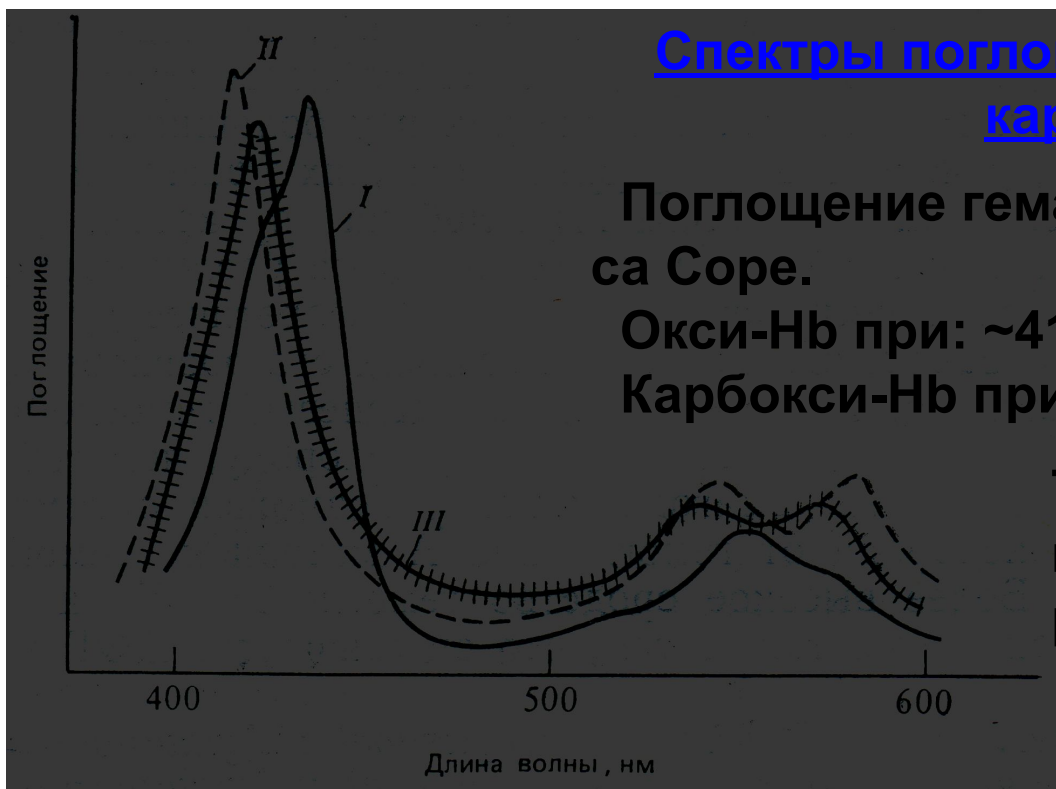
Спектры поглощения Hb (I), окси-Hb (II) и карбокси-Hb (III)

Поглощение гема идет в обл. 400 нм – полоса Soret.

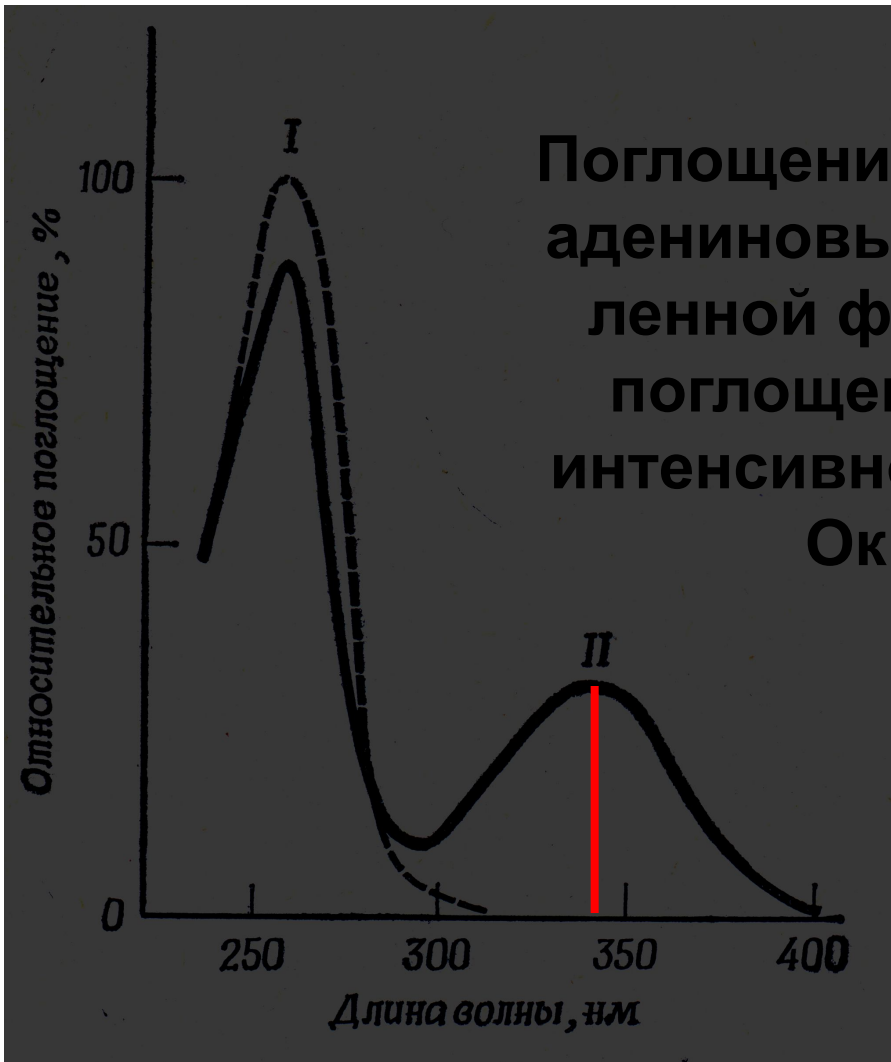
Окси-Hb при: ~414 и 543 нм;

Карбокси-Hb при: 420 и 560 нм.

Точные положения пиков поглощения уникальны для различных видов животных.



Спектр поглощения окисленной (I) и восстановленной (II) форм пиридиновых нуклеотидов (НАД и НАДФ).



Поглощение при λ 260 нм обусловлено адениновым кольцом. Для восстановленной формы характерно снижение поглощения при 260 нм и появление интенсивного поглощения при 340 нм. Окисленная форма поглощает только при 260 нм.

Аппаратура для абсорбционной спектроскопии

1. Фотоколориметр (фотометр, колориметр):

Единственный источник света

Спектральный диапазон: λ 315 – 700 нм

λ задается светофильтрами (иногда дифракционной
решеткой)

Светофильтр выделяет **полихромный** световой поток

Для измерений используют кюветы из оптического
стекла

2. Спектрофотометр:

Для УФ и видимой областей – отдельные источники света

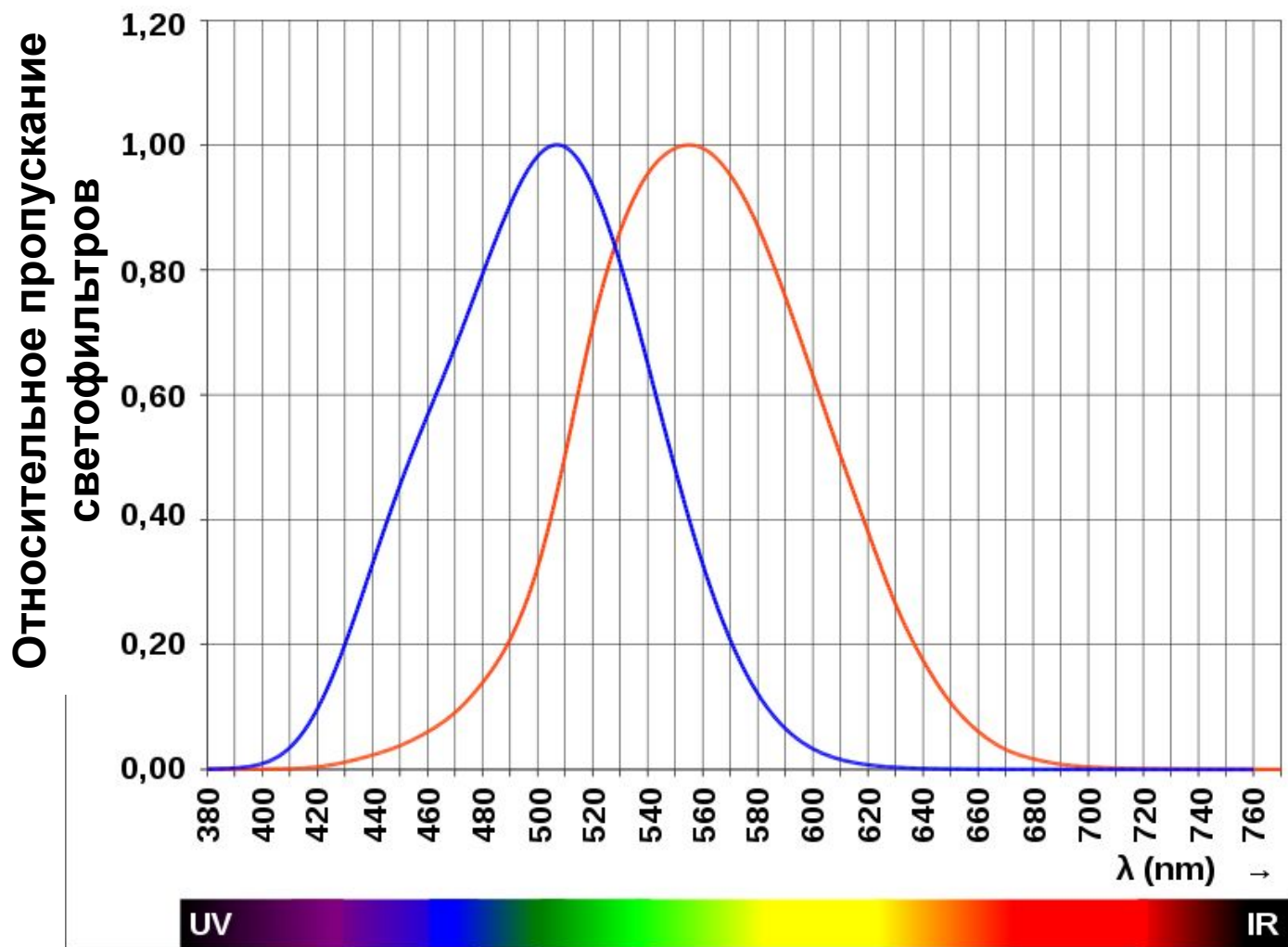
Спектральный диапазон: λ 200 – 1000 нм

λ задается монохроматором

Монохроматор выделяет **монохромный** световой поток

Для измерений в УФ-диапазоне используются **кюветы из кварцевого стекла.**

Полихромные световые потоки, получаемые с помощью светофильтров



Синим – светофильтр на 507 нм, **красным** – фильтр на 555 нм

Область применения абсорбционной спектроскопии:

- 1. Измерение C вещества в растворе (количественный анализ);**
- 2. Регистрация течения химических превращений;**
- 3. Идентификация веществ в растворе (спектр поглощения – «молекулярный паспорт» вещества – качественный анализ);**
- 4. Регистрация изменений физико-химических свойств молекул (денатурация-ренатурация ДНК) и т.д.**

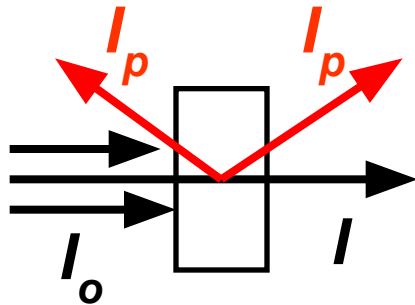
СВЕТОРАССЕИВАНИЕ

Методы, основанные на измерении светорассеивания

Светорассеивание, обусловленное частицами, взвешенными в растворе (преципитат в результате взаимодействия антигена и антитела).

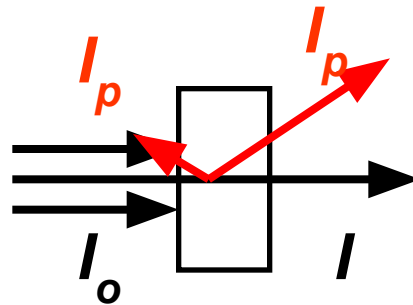
Теория светорассеивания разработана Рэлеем: $I_p = \frac{1}{\lambda^4}$

А. $D_{\text{частицы}} < 1/10 \lambda$



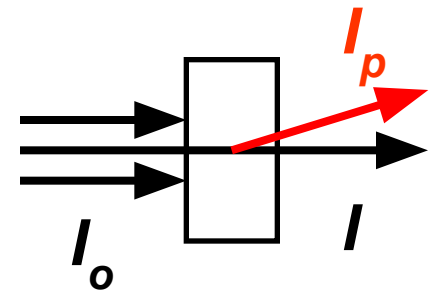
Рассеивание идет симметрично

Б. $D_{\text{частицы}} > 1/10 \lambda$



Рассеивание идет не симметрично

В. $D_{\text{частицы}} > \lambda$



Рассеянный свет почти совпадает с прошедшим

1. Турбидиметрия (англ. «turbidity» – мутность).

Метод основан на измерении интенсивности прошедшего через образец (не рассеянного) света.

Реализуется с помощью обычного фотометра. Выбирают светофильтр, обеспечивающий световой поток с минимальной λ . Метод эффективен, если образец рассеивает не менее 10% от величины I_0 .

2. Нефелометрия.

Метод основан на измерении интенсивности рассеянного образцом света. Метод более чувствителен, чем турбидиметрия, реализуется с помощью специального прибора – **нефелометра**. Через образец пропускают свет с $\lambda = 600-700$ нм (при большой λ шире диапазон D частиц, рассеивающих свет).