

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»*

---

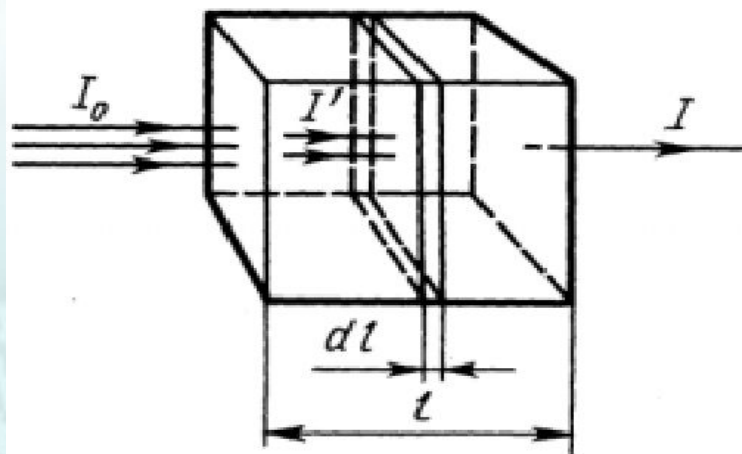
Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент

# 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**:

$$\blacksquare \frac{(I_0 - I)}{I_0} = 1 - I/I_0 = 1 - T$$

- 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,

- $\epsilon$  – 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



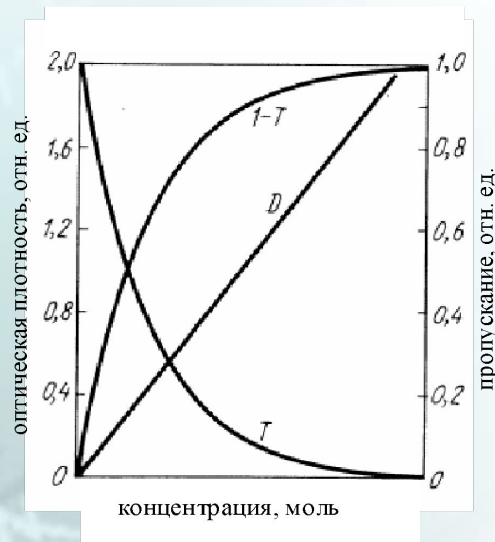
# Коэффициент молярной ЭКСТИНЦИИ

---

- 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  $\epsilon$  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

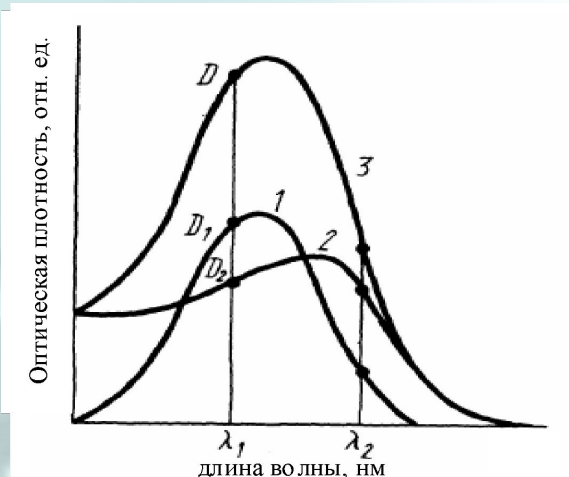
# Закон аддитивности

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

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

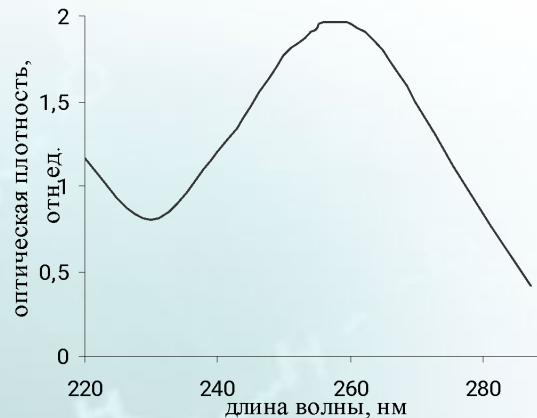


1,2 – спектры компонентов; 3 – спектр смеси

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  $\epsilon$  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 однородных образцов, а также сред с более близкими к частицам коэффициентами преломления

# Измерение спектров биологических препаратов

(a) Measurement of optical density

