EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN

КАФЕДРА
БІОХІМІЇ ТА
БІОТЕХНОЛОГІЇ

Supported by:

DAAD
Deutscher Akademischer Austauschdienst
German Academic Exchange Service

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

СВІТЛО

Володимир ШВАДЧАК

ПНУ

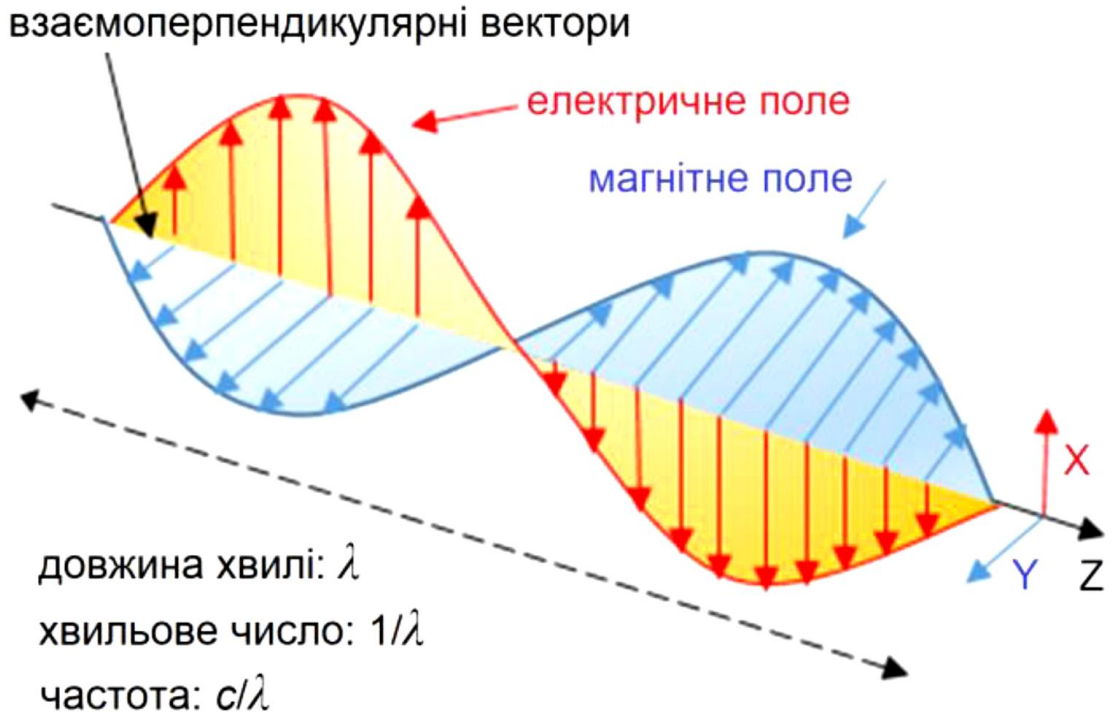
01-05-2023

Зміст лекції

1. *Світло й колір.*
2. *Поглинання світла.*
3. *Структура молекул і довжина хвилі поглинання.*
4. *Спектрофотометри.*
5. *Абсорбційні методи.*

Світло й колір

Світло



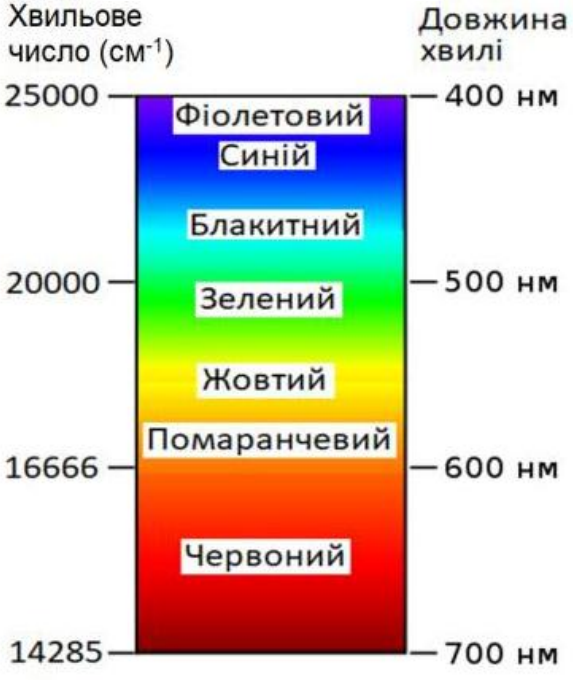
Енергія фотону пропорційна частоті хвилі

*Чим **більша** довжина хвилі тим **менша** енергія*

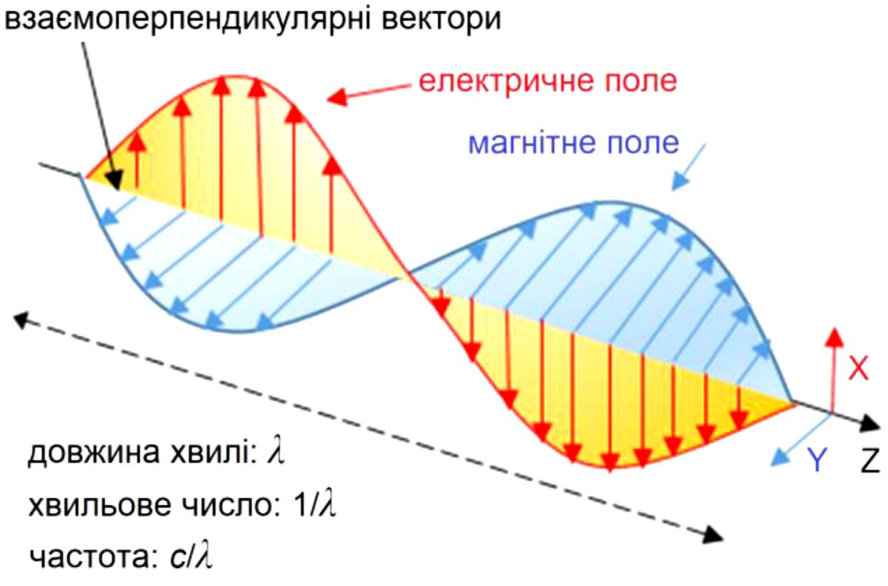
Світло

УФ

Видиме всітло

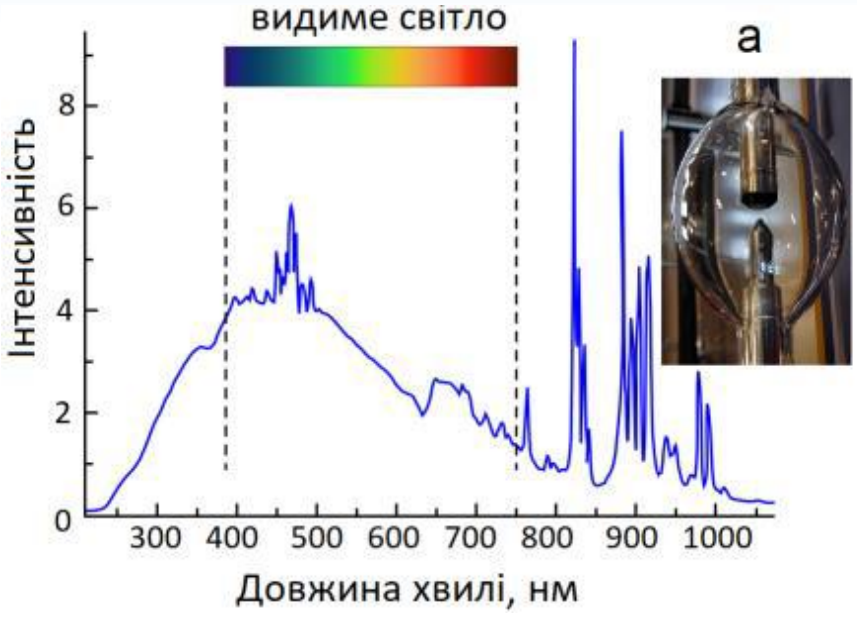


ІЧ

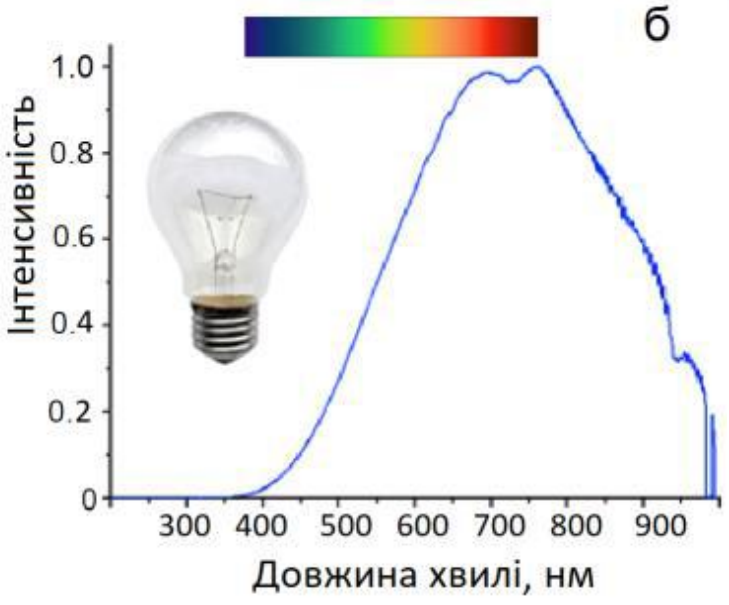


Видиме світло 400-700нм

Джерела світла



Дугова Хе лампа

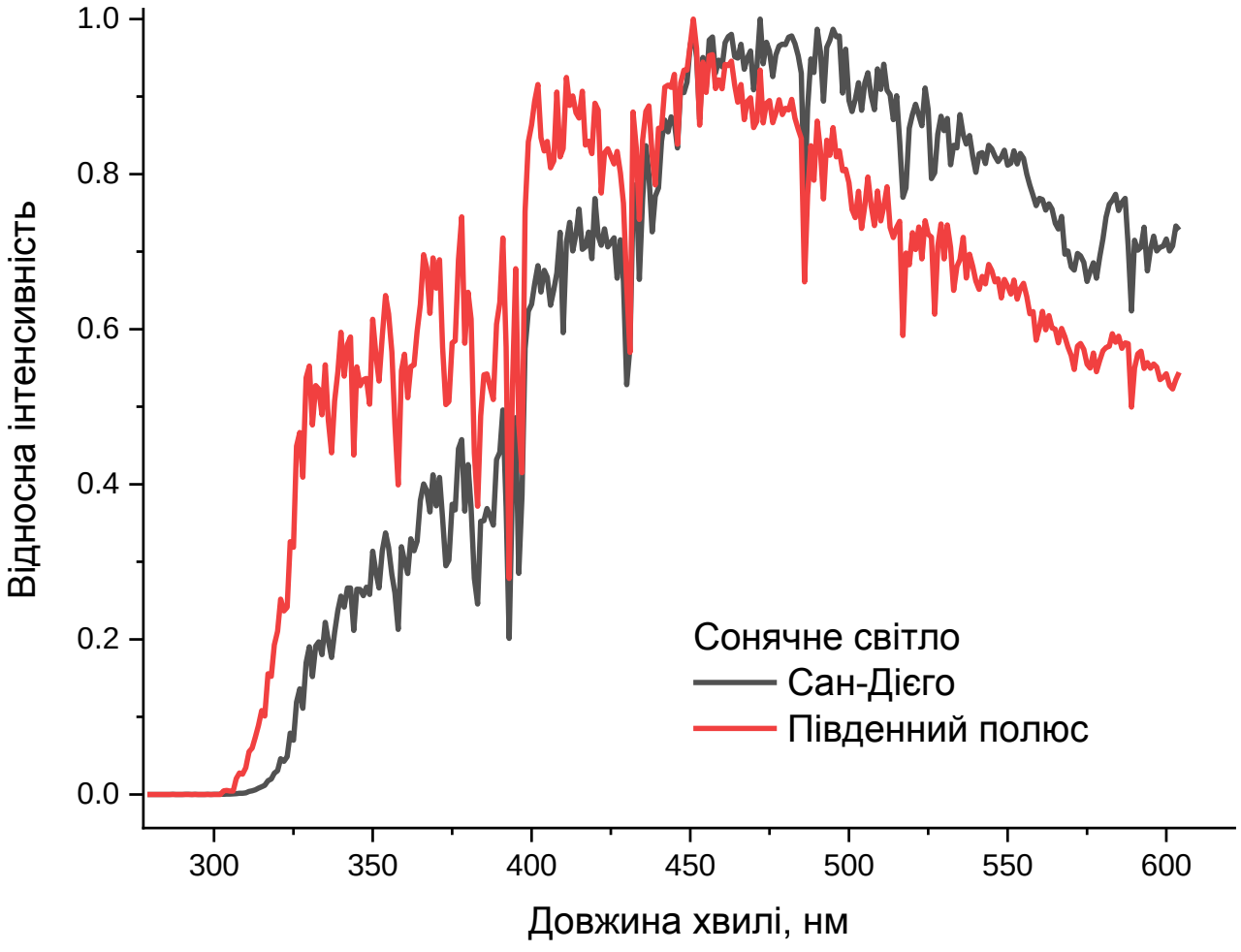


Лампа розжарювання

Дейтерієва лампа для <350nm

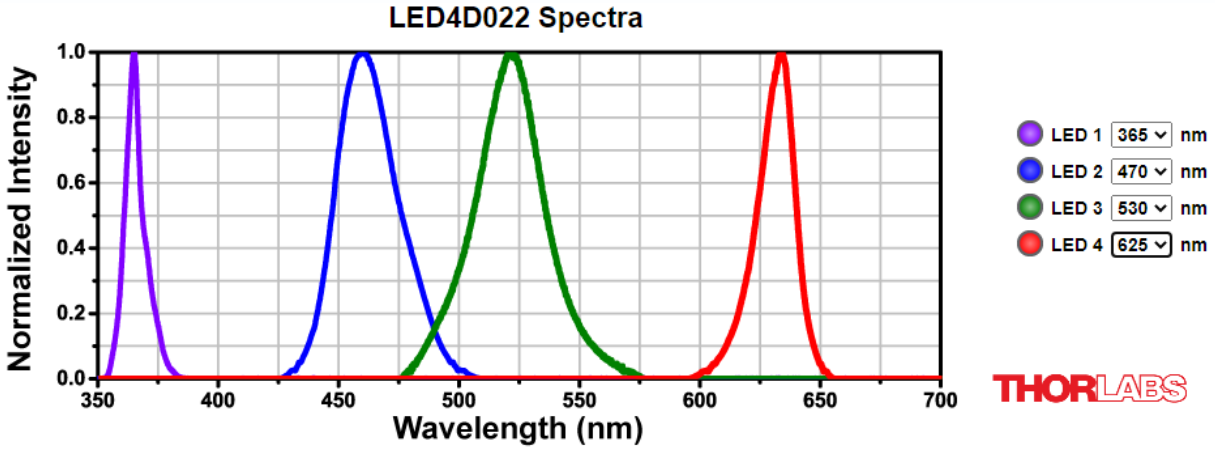
Пивоваренко В.Г. Абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія органічних сполук;
К.: ВПЦ «Київський університет», 2023

Джерела світла

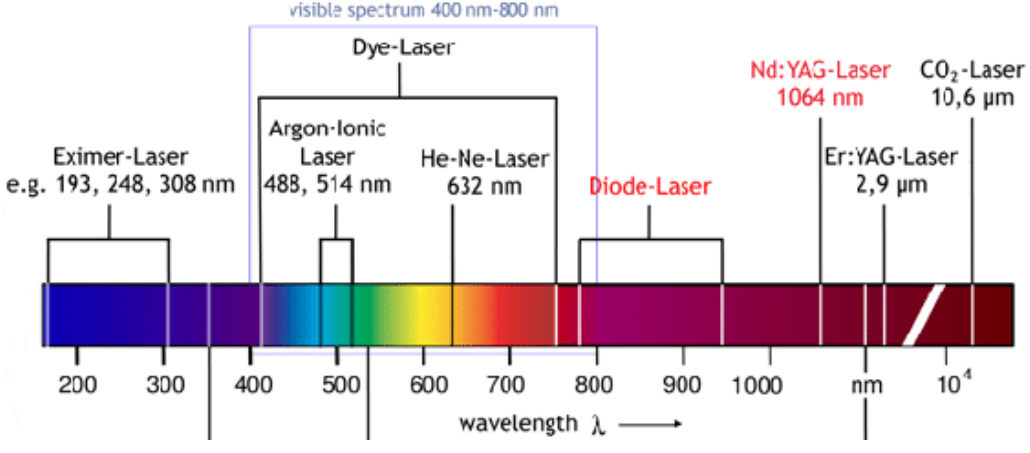


Джерела світла

Світлодіоди



Лазери



Джерела світла

Лазер: монохромне (одна довжина хвилі), одна фаза, одна поляризація

Лампа+монохроматор: монохромне (наприклад 320±2нм)

Лампа+світлофільтр: немонохромне (наприклад 320±100нм)

Лампа + поляризатор – плоскополяризоване.

Лампа + поляризатор + пластинка для зсування фази – поляризоване по колу

Окремо взятий фотон не буває плоскополяризованим

Більше про поляризацію світла

https://en.wikipedia.org/wiki/Polarizing_filter_(photography)

Від води відбивається поляризвоане світло
Можна використовувати поляризатори щоб його відфільтрувати й краще фотографувати рибок
*реально працює навіть при фото з телефону крізь деякі темні окуляри.

Поляризатори на автомобільних фарах і склі що не сліпило зустрічне

Запитання

Поглинання світла

Взаємодія світла з речовиною

Заломлення

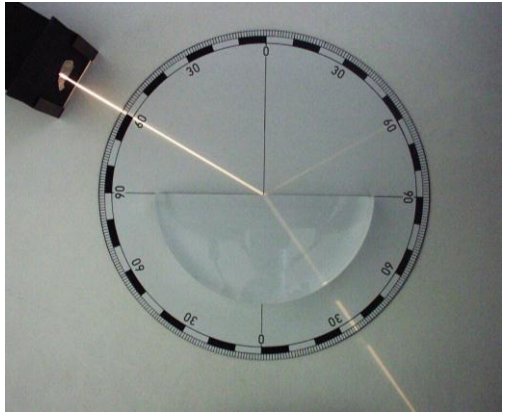
Розсіювання

Поглинання

Заломлення

Світло завжди рухається найшвидшим шляхом (не найкоротшим)

$$\frac{n1}{n2} = \frac{sin\alpha 1}{sin\alpha 2}$$



Показник заломлення – обернено пропорційний швидкості світла в середовищі

*повне внутрішнє заломлення

Розсіювання

Релеївське

$$\sigma_s = \frac{2\pi^5}{3}\frac{d^6}{\lambda^4}\left(\frac{n^2-1}{n^2+2}\right)^2$$

Раманівське

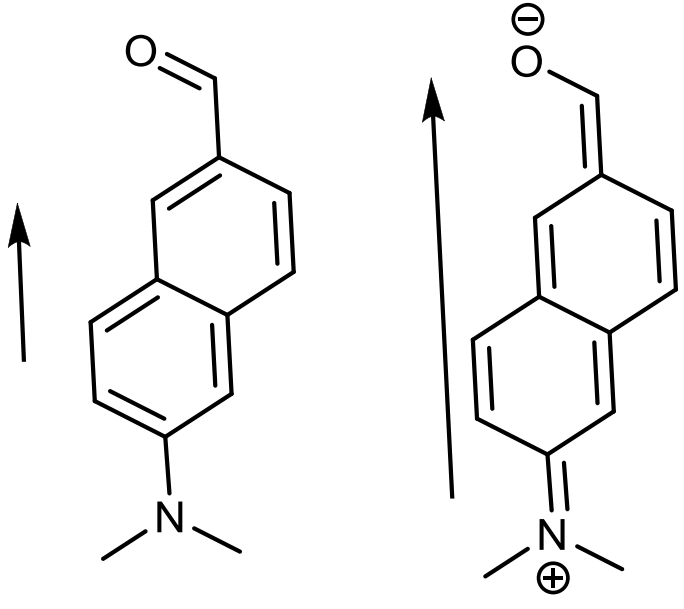
З втратою енергії на коливальні рівні

Інші (акустичне ...)

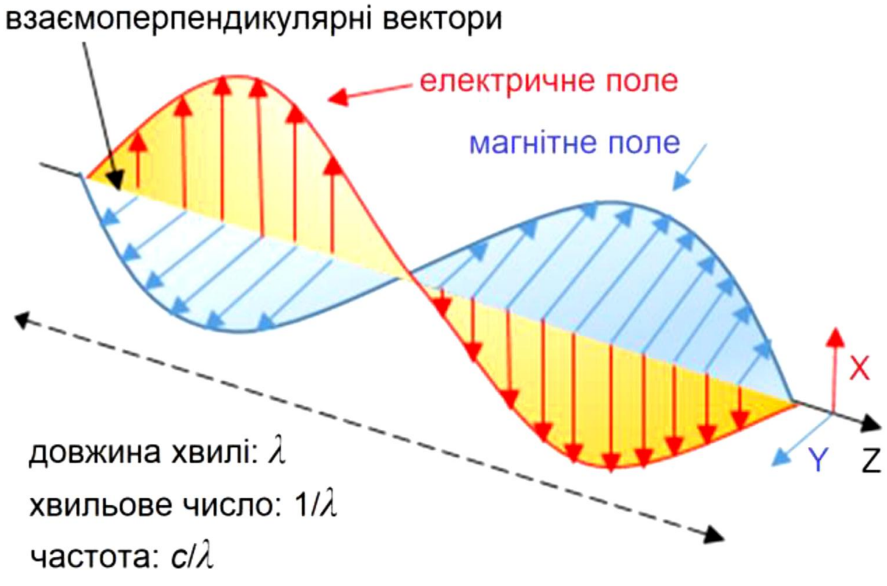
Вода прозора. Молоко біле.
→ в молоці є часточки що розсіюють світло

Небо голубе бо короткохвильове світло розсіюється сильніше

Поглинання світла



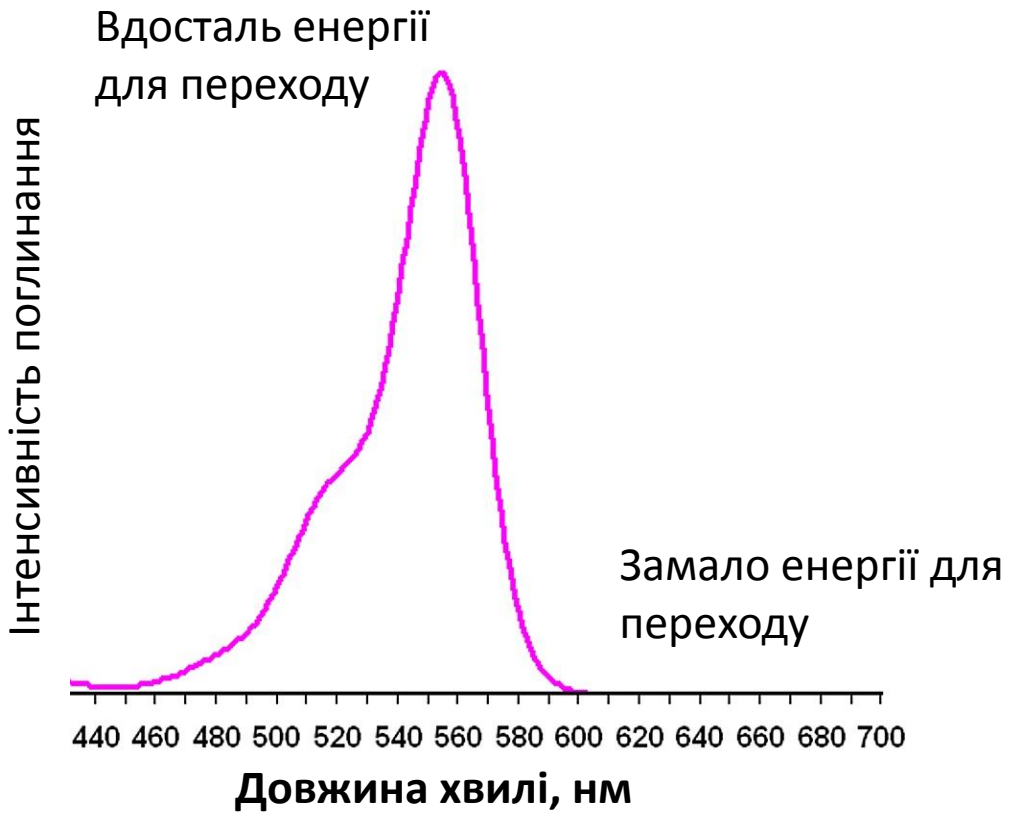
Основний стан ***Збуджений стан***



Для поглинання світла вектор E має співпадати з векторм зміни дипольного моменту молекули

Насправді на квантовомеханічному рівні все дещо складніеш, фотони поляризовані по колу

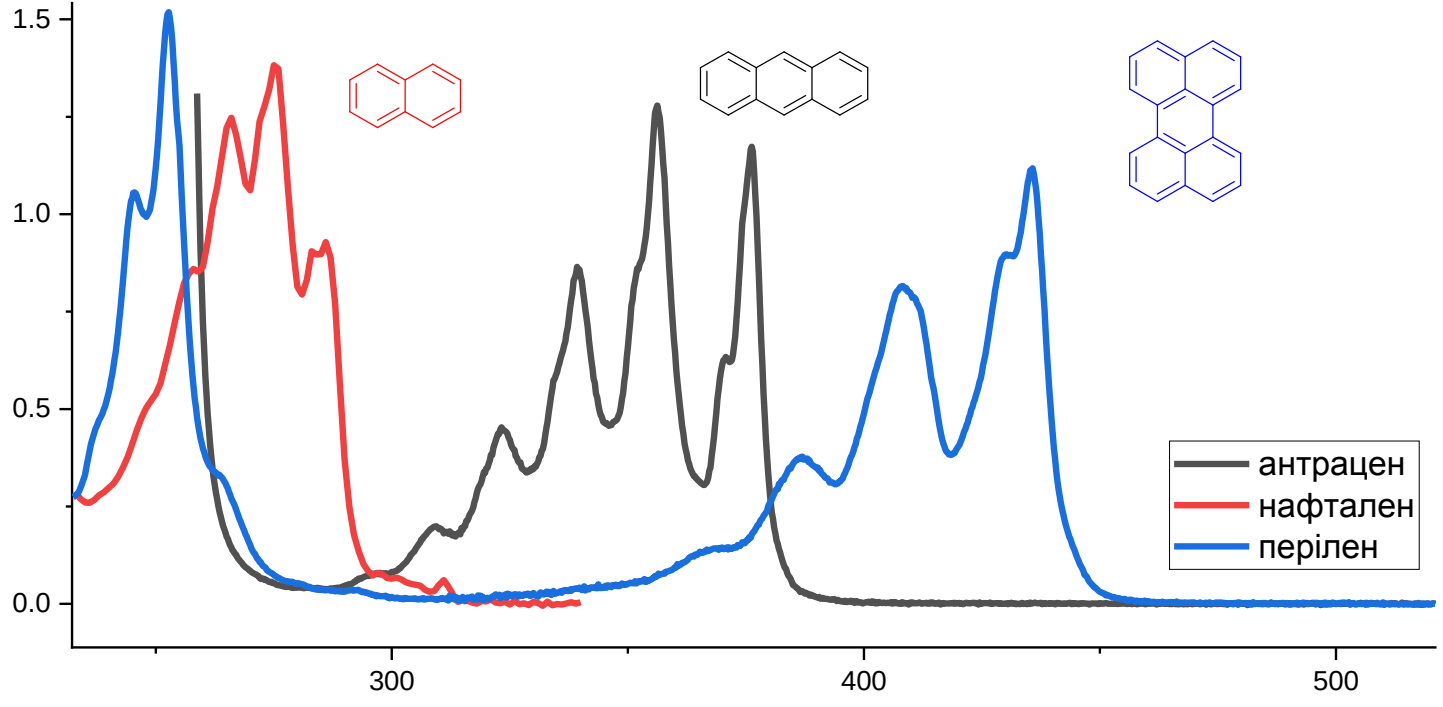
Поглинання світла: спектри



Спектр поглинання Родаміну Б у воді

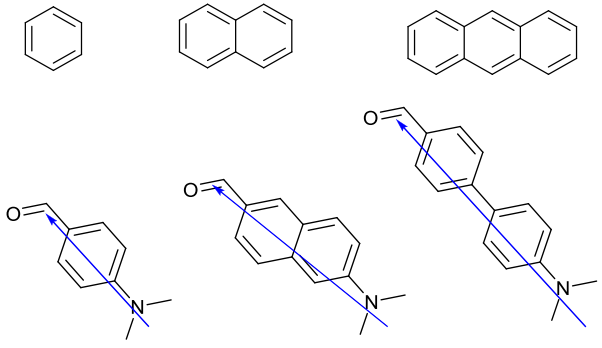
Поглинання світла: спектри

Довжина пі-системи

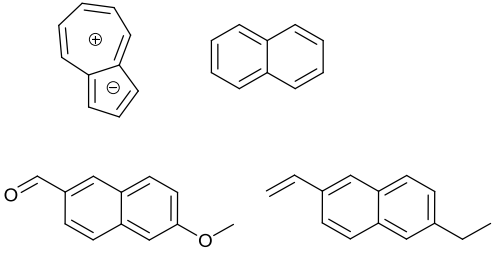


Поглинання світла: спектри

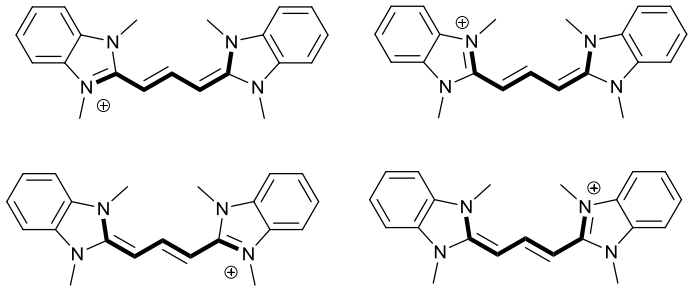
Довжина пі-системи

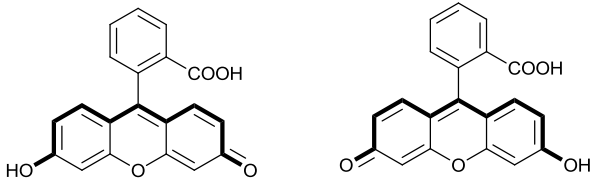


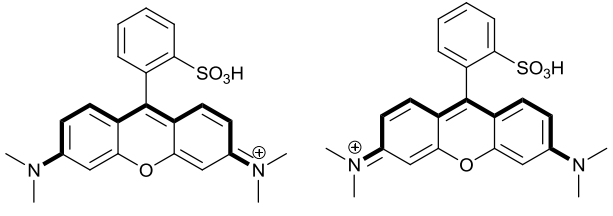
Розподіл зарядів



Заряд розмитий між однаковими атомами



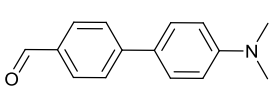


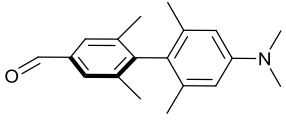


Поглинання світла: спектри

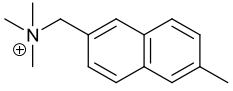
Інші фактори

Стерика: Виведення з площини зменшує спряження

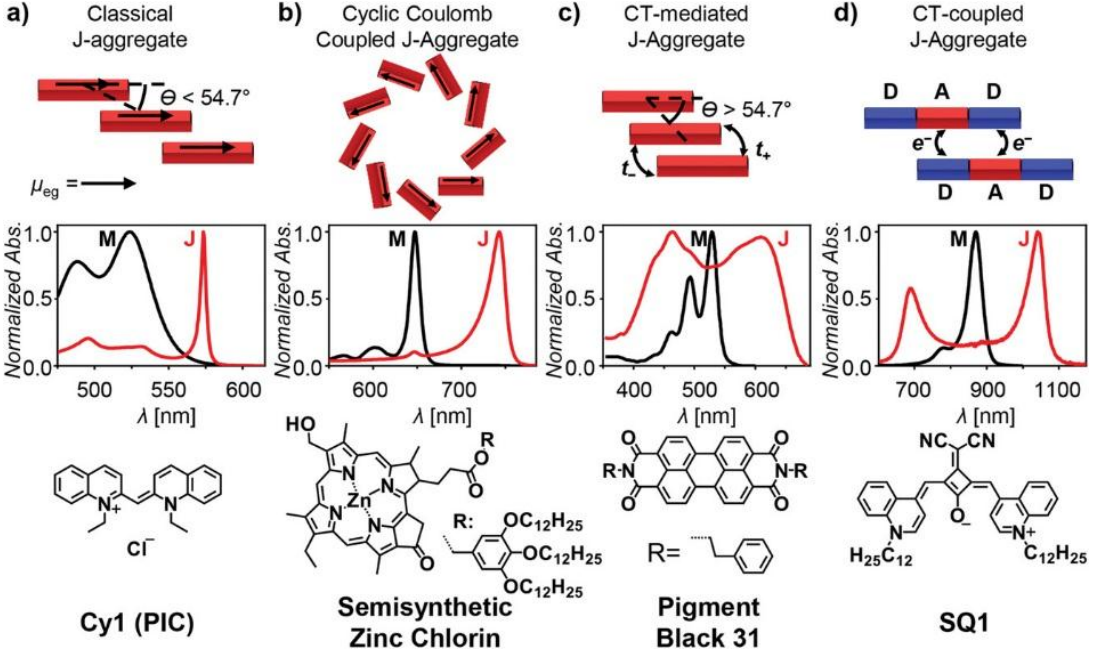




Заряд: наявність неспряженого заряду призводить до червоного зсуву

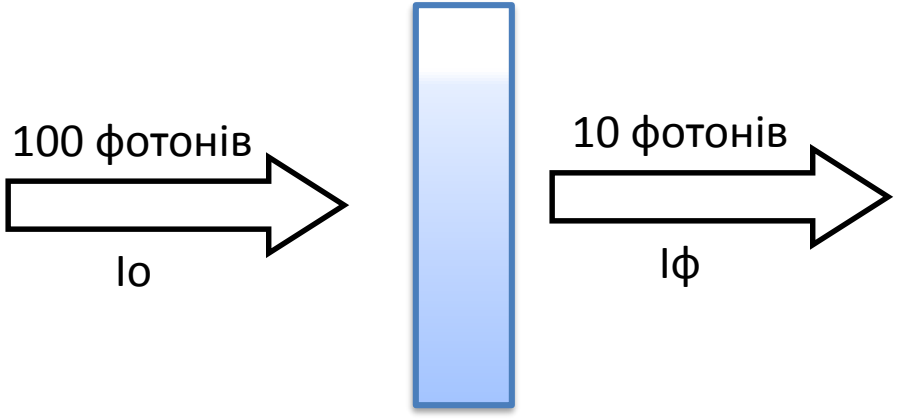


Міжмолекулярні взаємодії
Через утвоерня агрегатів можливе як падіння так і зростання поглинання



https://doi.org/10.1002/adma.202104678

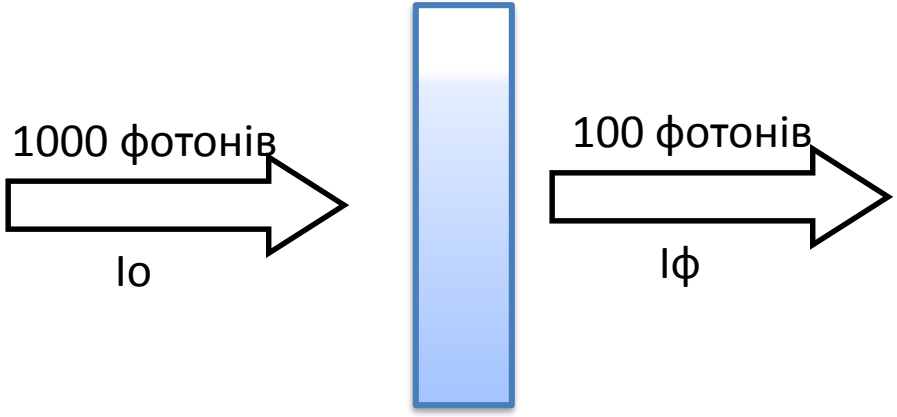
Поглинання світла: кількісни й вимір



Io/Iф = 10

Кювета з розчином речовини, довжина 1см

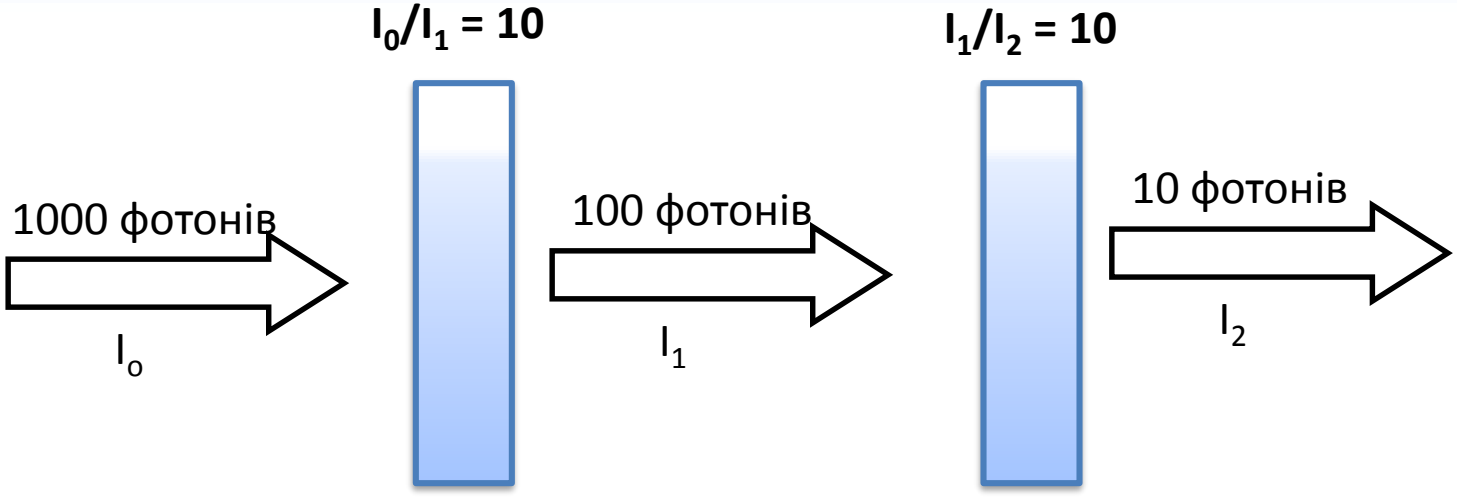
Поглинання світла



Io/Iф = 10

Кювета з розчином речовини, довжина 1см

Поглинання світла



Кювета з розчином речовини, довжина 1см

Така сама кювета

$I_0/I_1 = 10$ $A=Log(I_0/I_1) = 1$

A (абсорбція) при послідовном проходжені крізь розчин сумуються

*заради цього їх і доводиться виражати через логарифм відношення інтенсивностей

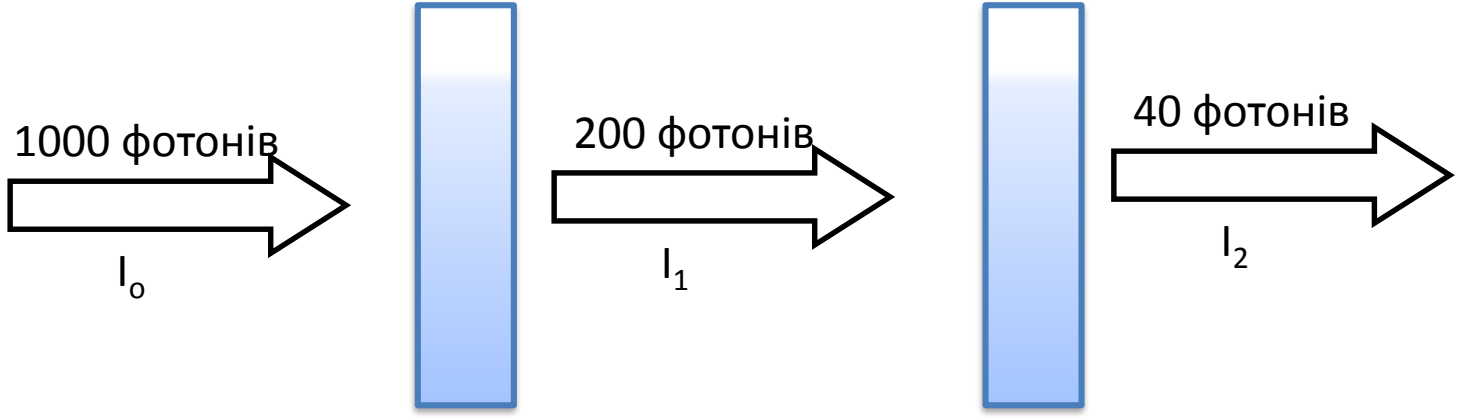
Приклад

Кювета з розчином речовини, пропускає 20% світла довжиною хвилі 500нм. Скільки світла пройде крізь дві такі кювети поставлені послідовно?

Швидка відповідь: 0,2*0,2=0,04 (4%)

$\mathbf{A_2=A_1}$ (кювети однакові)

$\mathbf{A_{(1+2)}=2*A_1 = 2*0,699 = 1,398}$
(кювети однакові)



Поглинання світла

A (абсорбція) пропорційна
- Довжині яке проходить світло крізь розчин (**L**)
- Концентрації розчину (**C**)

$$A = \varepsilon \; L \; C$$

Коефіцієнт пропорційності (коефіцієт поглинання, коефіцієнт екстинкції) -
ε – абсорбція розчину довжиною 1 см і концентрацією 1 моль/л

Приклад

Абсорбція 1см розчину родаміну (*ε=80 000 $см^{-1}$ $М^{-1}$) з концентрацією 1мкМ становить*

L = 1 см

C =1 мкМ = 10^{-6} М

ε=80 000 $см^{-1}$ $М^{-1}$

$$A = \varepsilon \; L \; C = \mathbf{1}\ см * 10^{-6}\ М * 80\,000\ см^{-1}\ М^{-1} = 0{,}08$$

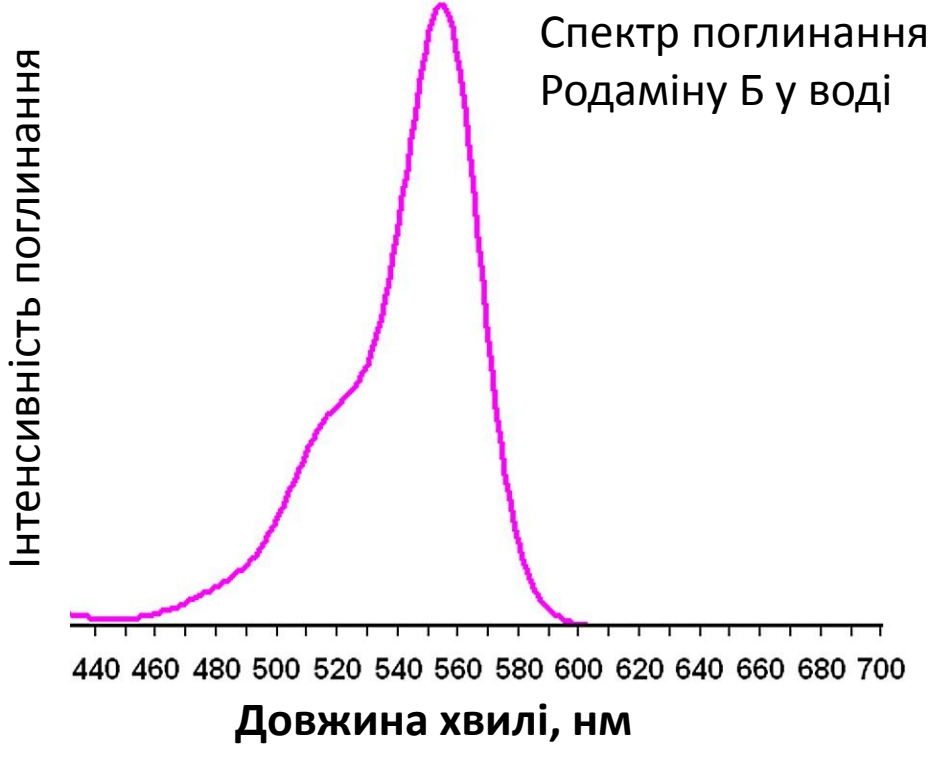
**такий розчин пропускає приблизно 83% фотонів, а поглинає 17%*

*** хороші барвники мають ε=50 000 ... 150 000$см^{-1}$ $М^{-1}$*

Триптофан має ε=5700$см^{-1}$ $М^{-1}$

Поглинання світла: спектри

Коефіцієт поглинання залежить від довжини хвилі світла.



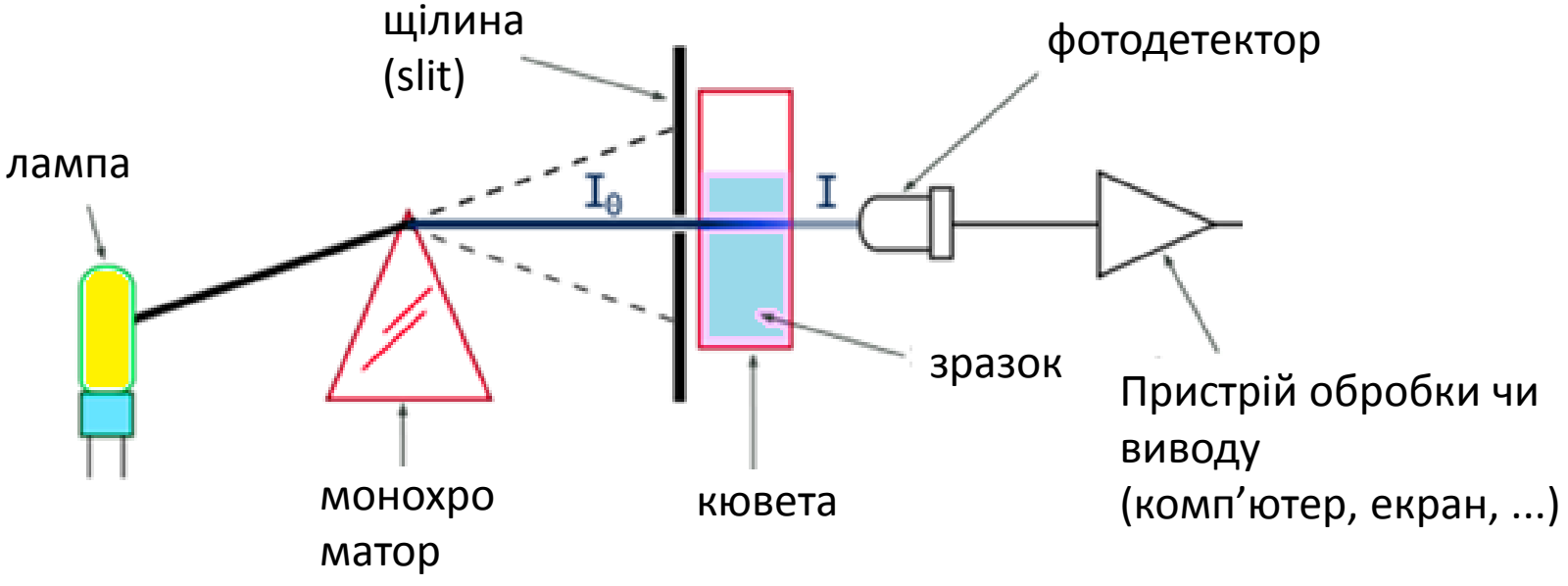
Спектр поглинання Родаміну Б у воді

Інтенсивність поглинання пропорційна концентрації, але форма спектру зберігається

Коефіцієнти поглинання більшості барвників можна знайти в онлайн-довідниках
Так само як і положення максимумів абсорбції

Спектрофотометри

Як міряється поглинання світла



Як міряється поглинання світла

ФЕК

Cary 4000

Cary 400

NanoDrop2000

NanoDropOne

Як міряється поглинання світла

ФЕК

Cary 4000

Cary 400

NanoDrop2000

NanoDropOne

Як міряється поглинання світла

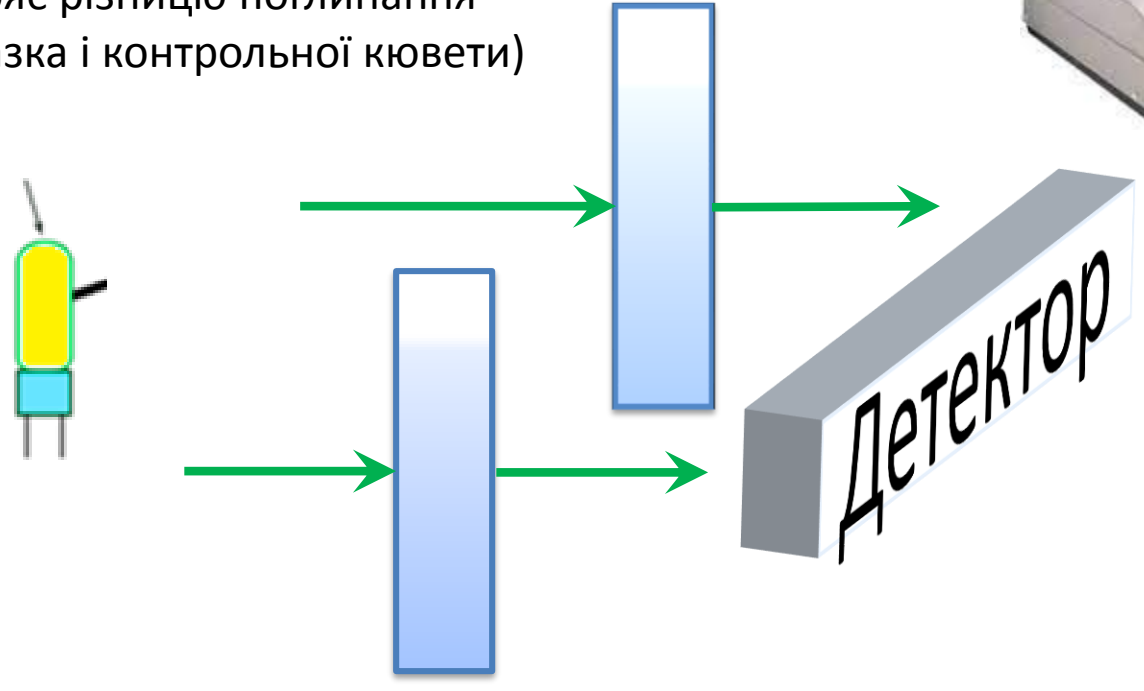
ФЕК

Дуже не точна довжина хвилі (свілофільтр), “радянські” методи аналізу продуктів харчування і т п

Як міряється поглинання світла

Хороший пристрій періоду 1990х. Висока точність за рахунок двох кювет (реально міряє різницю поглинання зразка і контрольної кювети)

Cary 400



Як міряється поглинання світла

Cary 4000

Один з найточніших пристроїв наявних зараз. Гарно міряє в діапазоні A = 0,005..2
Так само два промені, дуже якісні монохроматори, різна оптична система для до/після 350нм

Період 2005

Як міряється поглинання світла

Період 2010рр – Дешевий (до 10к$),
настільний пристрій,
міряє з 2мкл розчину
Гарно міряє в діапазоні A = 0,03..2
зручний для вимірювання
концентрації

NanoDrop2000

Як міряється поглинання світла

Період 2015рр – Дешевий (~10к$),
настільний пристрій,
міряє з 2мкл розчину
Гарно міряє в діапазоні A = 0,03..2
зручний для вимірювання концентрації, замість комп’ютера-вбудований андроїд-планшет

NanoDropOne

Що вимірюють

Що можна міряти по поглинанню світла

Концентрації протеїнів і пептидів (переважно по поглинанню трипофану на 280/295 нм)

Концентрації ДНК і олігонуклеотидів (погдинання на 260нм)

Концентрації барвників і протеїнів мічених барвниками.

Експерименти по визначенню активності ферментів де є вихід на забарвлені продукти (наприклад розкладання пероксиду водню вимірюють по тому скільки згенерується йоду)

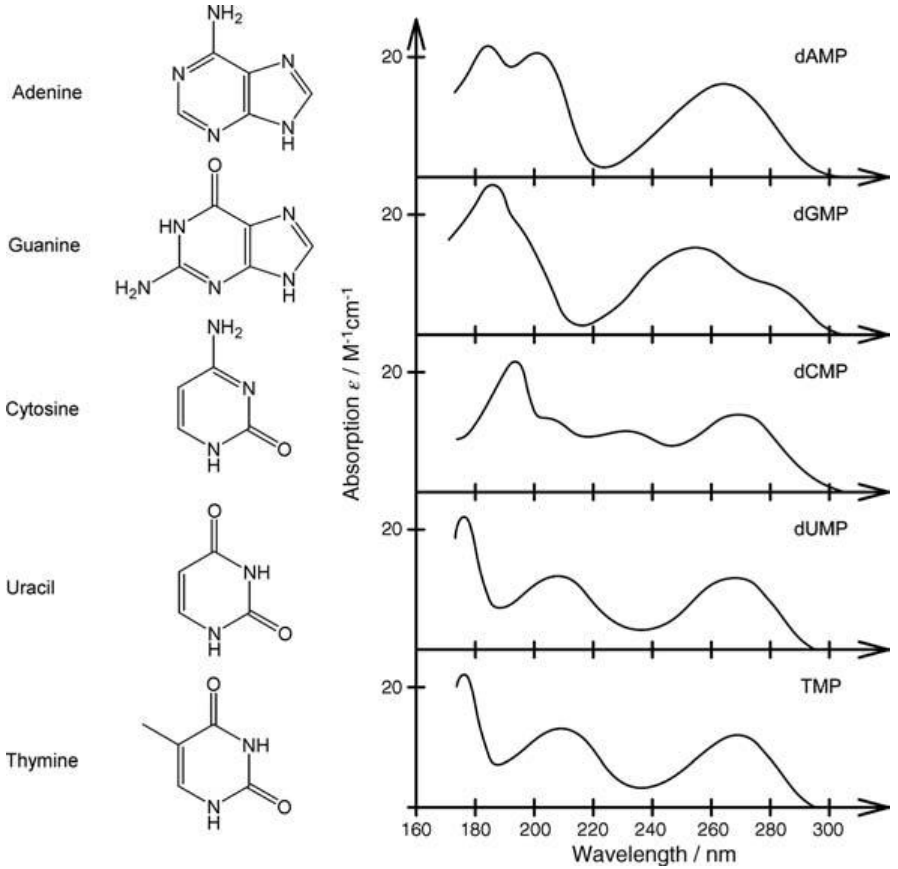
https://biochemden.com/spectrophotometer-instrumentation-principle/

Що можна міряти по поглинанню світла

Концентрацію ДНК

Домішки протеїнів у ДНК

	ε, $M^{-1}см^{-1}$	максимум, нм
Аденнін (AMP)	15400	259
Гуанін (GMP)	13700	253
Цитозин (CMP)	9000	271
Уридин (UMP)	10000	262

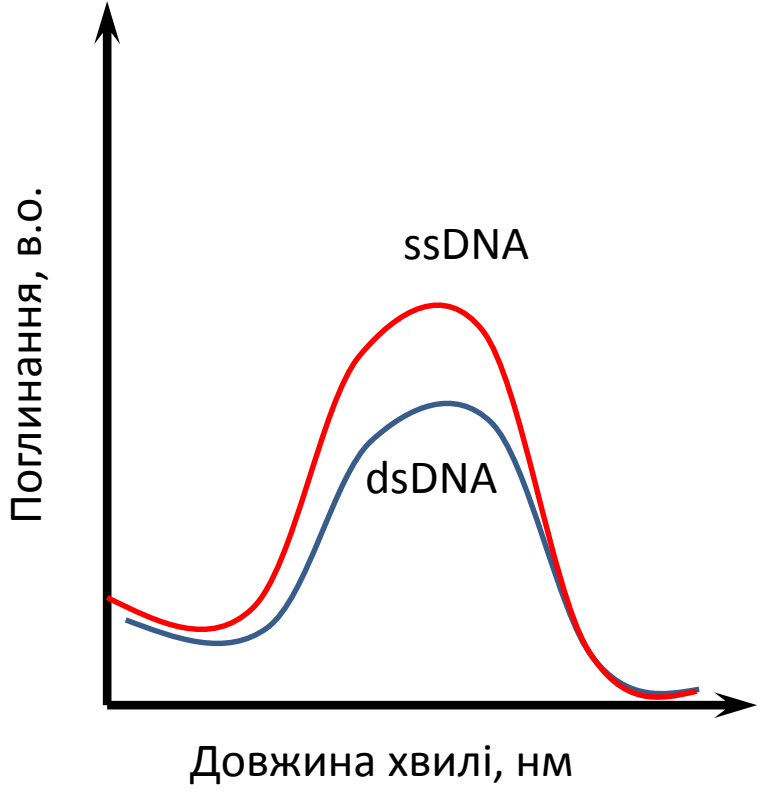


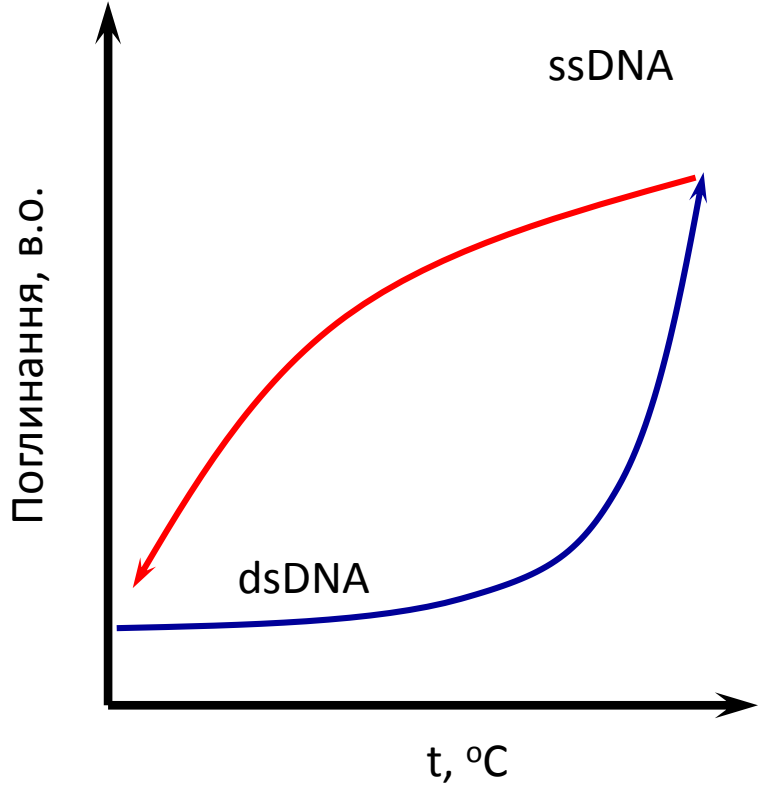
Калькулятор поглинання ДНК/РНК

http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html

Перехід між дво- і однонитковою ДНК

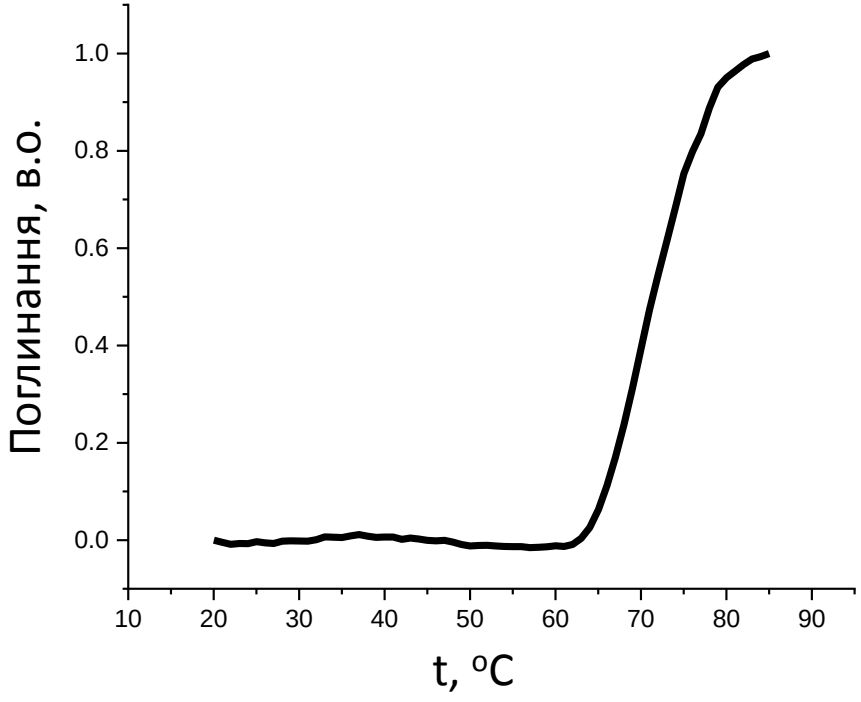
В двонитковій ДНК дипольні моменти основ частково компенсуються тому поглинання стає нижчим. За рахунок цього можна визначати температру розгортання ДНК





Перехід між дво- і однонитковою ДНК

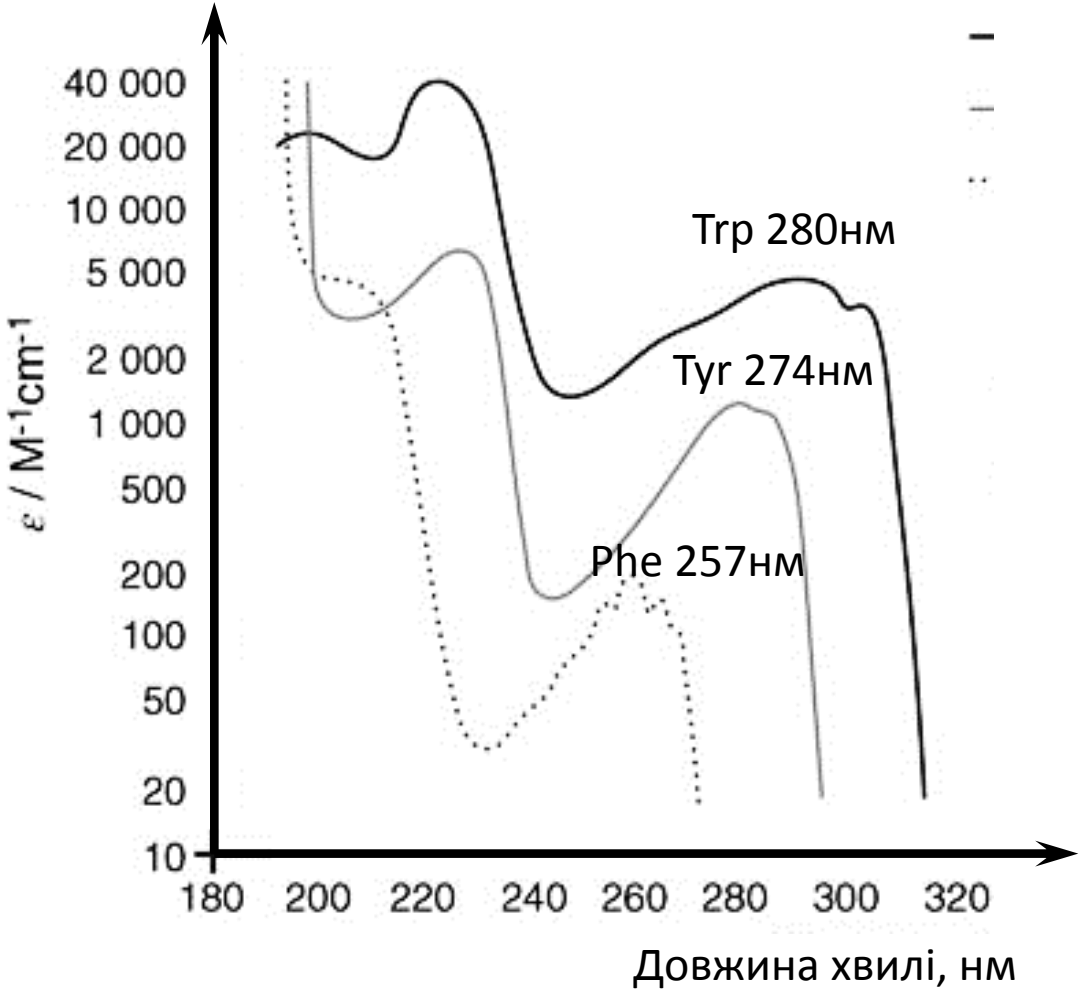
Приклад вимірювання температри розгортання CT-DNA



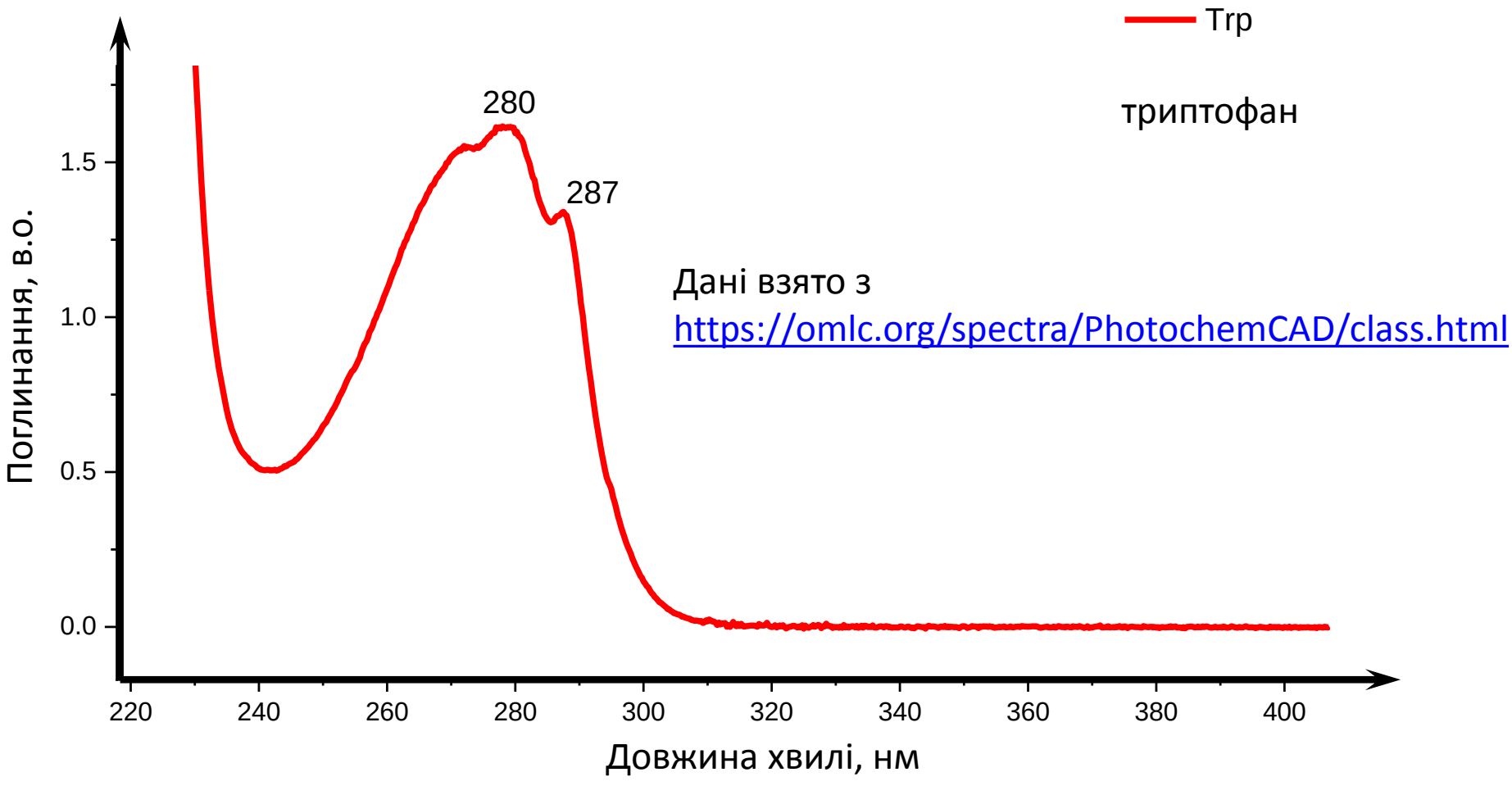
Протеїни

Всі протеїни сильно поглинають на 190-200 нм І поглинають до 225нм

Крім того є сильне специфічне поглинання ароматичних амінокислот



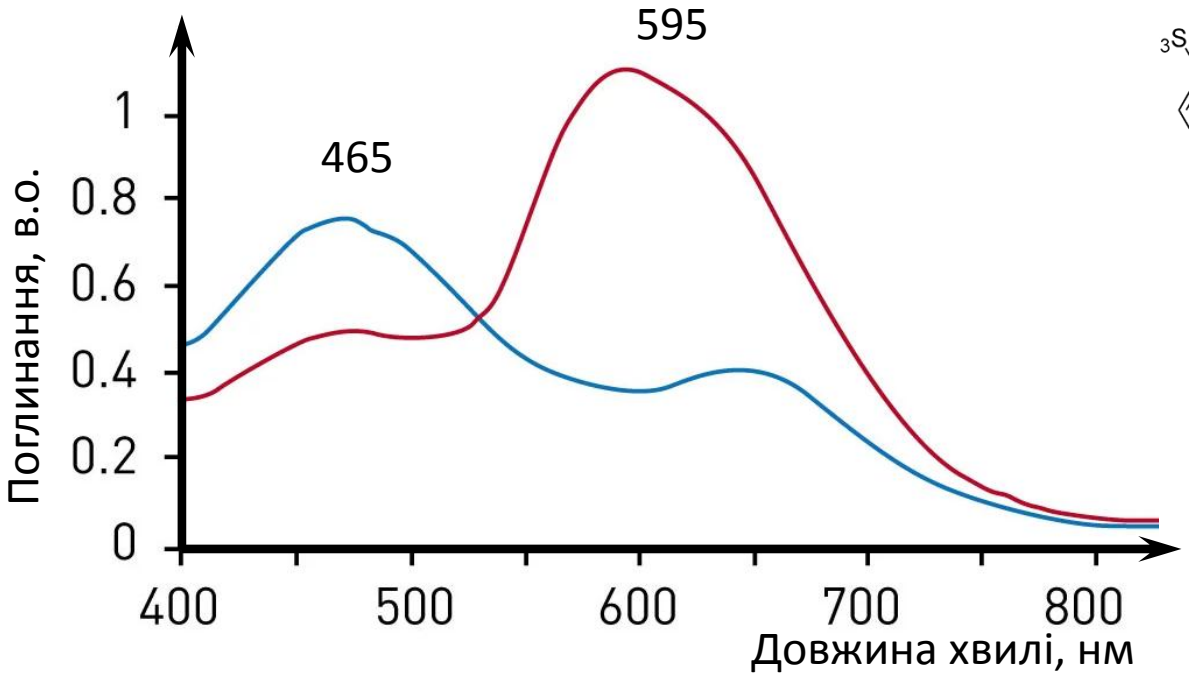
Протеїни

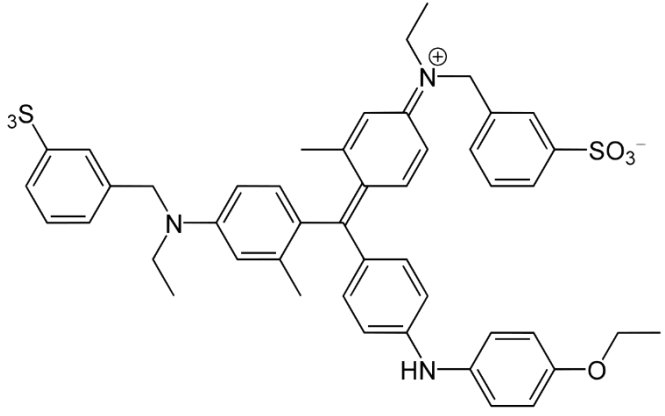


Дані взято з
https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/class.html

Протеїни: визначення по Бредфорду

В сильно кислому середовищі барвник зв’язується з карбокси групою протеїну й міняє колір





Coomassie brilliant blue G-250.

https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford_protein_assay

* Є фальшивий сигнал в присутності детергентів

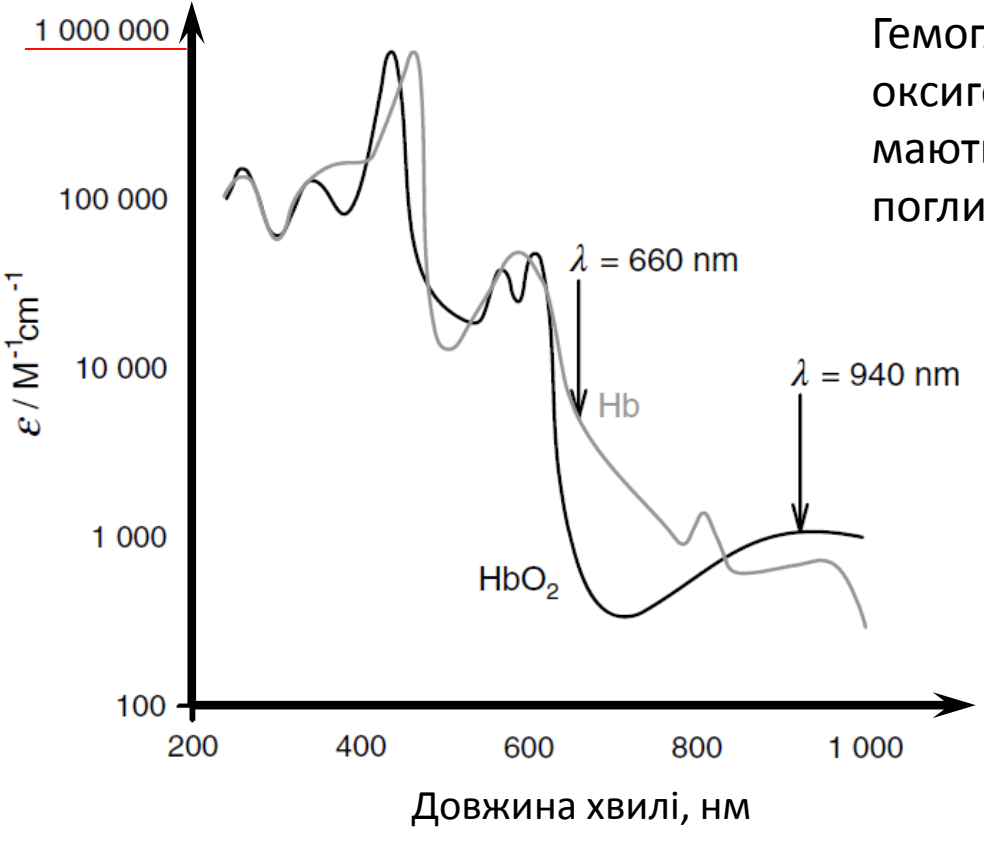
https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Додатково: Визначення протеїну

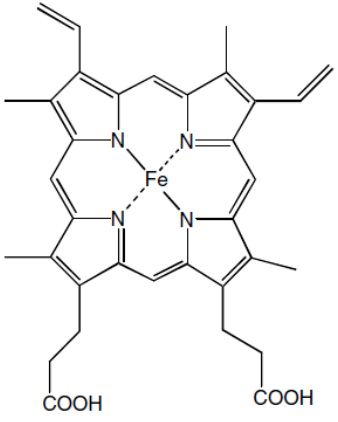
https://en.wikipedia.org/wiki/Lowry_protein_assay

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. J. *Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).

Вміст кисню в крові. Пульсоксиметри

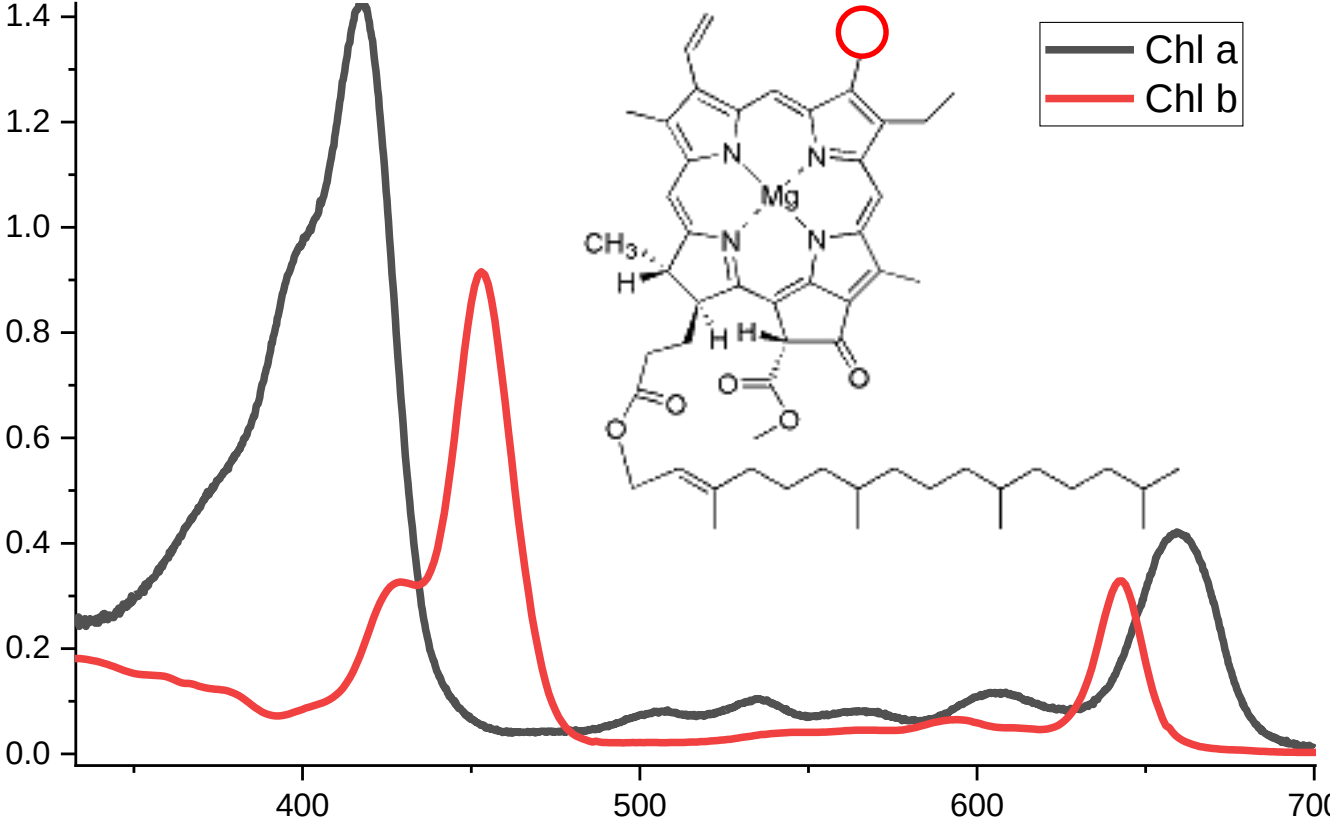


Гемоглобін (Hb) та оксигемоглобін (HbO2) мають сильно різне поглинання



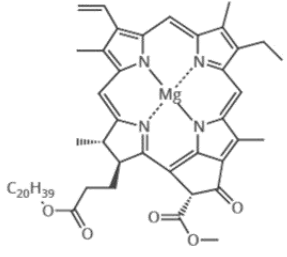
Оксиметри міряють насичення крові киснем по відношенню поглинання при 660 і 940 нм

Хлорофіл


Chl a
Chl b
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
400
500
600
700
Mg
N
N
N
N
CH3
H
H
H
O
O
O
O
O

Колір листя

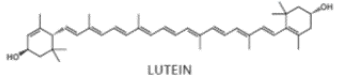
CHLOROPHYLL



CHLOROPHYLL A
A type of chlorin

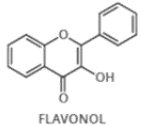
Chlorophyll gives plant leaves their green colour. Plants require warm temperatures and sunlight to produce chlorophyll. In autumn, the amount produced begins to decrease, and existing chlorophyll is slowly broken down, diminishing the green colour of the leaves.

CAROTENOIDS & FLAVONOIDS

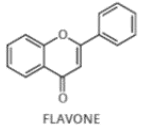


LUTEIN
A type of carotenoid

Carotenoids and flavonoid pigments are always present in leaves, but as chlorophyll is broken down in the autumn their colours come to the fore. Xanthophylls, a subclass of carotenoids, are responsible for the yellows of autumn leaves. One of the major xanthophylls, lutein, is also the compound that contributes towards the yellow colour of egg yolks.

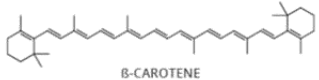


FLAVONOL
(general structure)



FLAVONE
(general structure)

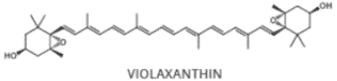
CAROTENOIDS



ß-CAROTENE
A type of carotenoid

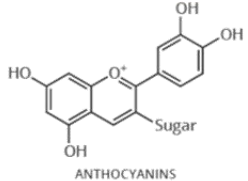
Carotenoids also contribute orange colours. Beta-carotene is one of the most common carotenoids in plants, and absorbs green and blue light strongly, reflecting red and yellow light and causing its orange appearance. It is also responsible for the orange colouration of carrots.

Carotenoids in leaves start degrading at the same time as chlorophyll, but they do so at a much slower rate; some fallen leaves can still contain measurable amounts.



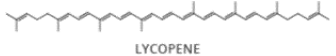
VIOLAXANTHIN
A type of carotenoid

ANTHOCYANINS & CAROTENOIDS



ANTHOCYANINS
(general structure)

Anthocyanin synthesis is kick-started by the onset of autumn. As sugar concentration in the leaves increases, sunlight initiates anthocyanin production. The purpose they serve isn't clear; it is suggested that they may play a light-protective role. It was previously thought they might delay leaf fall, but this has been discounted.



LYCOPENE
A type of carotenoid

© Andy Brunning/Compound Interest 2018 - www.compoundchem.com | Twitter: @compoundchem | FB: www.facebook.com/compoundchem
This graphic is shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.

Рекомендована література:

Пивоваренко В.Г. Абсорбційна та флуоресцентна спектроскопія органічних сполук; К.: ВПЦ «Київський університет», 2023
**тільки частина розділів*

Peter Jomo Walla Modern Biophysical Chemistry Detection and Analysis of Biomolecules, Wiley-VCH *2014*
**тільки частина розділів*

Додаткова:

Lakowicz Principles of fluorescence spectroscopy

Demchenko Introduction to Fluorescence Sensing https://doi.org/10.1007/978-3-030-60155-3