

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**РУКОВОДСТВО
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО КВАНТОВОЙ БИОФИЗИКЕ**

Учебно-методическое пособие

Томск
Сибирский государственный медицинский университет
2016

УДК 577.3(075.8)
ББК 28.071я73
Р 851

Авторы

С.В. Гусакова, И.В. Петрова, А.В. Носарев,
И.В. Ковалев, Л.В. Смаглий, Ю.Г. Бирулина

Р851 Руководство к практическим занятиям по квантовой биофизике: учебно-методическое пособие / С.В. Гусакова, И.В. Петрова, А.В. Носарев и др. – Томск : Изд-во СибГМУ, 2016. – 67 с.

Данное пособие включает описание практических работ по 9 темам курса «Квантовая биофизика». В описание практических занятий вошли теоретические основы используемых методов, практические подходы для выполнения работы, методы расчета исследуемых параметров, образцы таблиц, графиков, гистограмм, которые обучающиеся должны построить по полученным результатам, а также вопросы для самоподготовки к занятию, контрольные вопросы, тестовые задания и ситуационные задачи.

Учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом высшего профессионального образования для студентов, обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальности: Медицинская биофизика.

УДК 577.3(075.8)
ББК 28.071я73

Рецензент – д-р мед. наук, профессор Л.В. Капилевич

Утверждено и рекомендовано к печати Центральным методическим советом ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 03.02.2016 г.)

© С.В. Гусакова, И.В. Петрова, А.В. Носарев,
И.В. Ковалев, Л.В. Смаглий, Ю.Г. Бирулина, 2016
© ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, 2016

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие по квантовой биофизике разработано специально для проведения практических занятий в рамках соответствующего курса. В описание практических работ включена теоретическая часть, в которой дается теоретическая основа используемых в работах методов исследования, описание устройства и принципов работы оборудования. Каждая работа снабжена вопросами для самоподготовки, контрольными вопросами и заданиями, которые позволяют студенту самостоятельно подготовиться к занятию по изучаемой теме и провести самоконтроль полученных знаний. Практическая часть каждой работы, включенной в пособие, содержит пошаговые инструкции к выполняемому заданию для корректного выполнения работы студентами.

Учебно-методическое пособие по квантовой биофизике предназначено в качестве вспомогательного материала для студентов, обучающихся по основным профессиональным образовательным программам высшего образования – программам специалитета по специальности Медицинская биофизика.

ЗАНЯТИЕ 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРМАНГАНАТ-ИОНОВ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

Цель занятия: провести количественное определение содержания перманганат-ионов в растворе с помощью фотоэлектроколориметра.

Материалы и оборудование: фотоэлектроколориметр (КФК-3КМ), кюветы, колбы мерные, штатив с пробирками, мерный цилиндр, мерные пипетки, эталонный раствор калия перманганата (0,5 мМ).

Вопросы для самоподготовки:

1. Поглощение света растворами. Закон Бугера-Ламберта-Бера.
2. Понятие оптической плотности раствора.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Теоретической основой метода фотоэлектроколориметрии является закон Бугера-Ламберта-Бера, устанавливающий зависимость между интенсивностью света, проходящего через раствор вещества, поглощающего свет, и концентрацией этого раствора:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l},$$

где I – интенсивность света, вышедшего из раствора;

I_0 – интенсивность падающего света;

ε – молярный коэффициент поглощения, который характеризует поглощательную способность данного вещества;

c – концентрация раствора;

l – длина оптического пути.

Таким образом, закон Бугера-Ламберта-Бера устанавливает, что интенсивность падающего света экспоненциально уменьшается в зависимости от концентрации раствора и длины оптического пути.

На практике часто используют закон Бугера-Ламберта-Бера в логарифмической форме. Для этого вводится понятие оптической плотности раствора. Оптическая плотность D представляет собой десятичный логарифм отношения начальной интенсивности к интенсивности света, вышедшего из образца:

$$D = \frac{\lg I_0}{I}$$

В логарифмической форме закон Ламберта-Бера устанавливает линейную зависимость между концентрацией раствора (c) и оптической плотностью (D) при постоянной длине оптического пути:

$$D = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Следует помнить, что закон Ламберта-Бера выполняется при нескольких условиях:

- 1) свет должен быть монохроматическим, т. е. иметь определенную длину волны;
- 2) частицы вещества должны хаотически распределяться в толще раствора;
- 3) частицы растворенного вещества не должны взаимодействовать друг с другом.

В основе фотометрического определения концентрации перманганат-ионов в растворе лежит линейная зависимость оптической плотности раствора от концентрации перманганат-ионов. Водные растворы калия перманганата ($\text{pH} < 1$) имеют максимум светопоглощения при 528 нм и характеризуются большим значением молярного коэффициента поглощения при этой длине волны.

Оптическую плотность растворов измеряют со светофильтром, имеющим максимум светопропускания в области 540 нм, что, примерно, соответствует максимуму светопоглощения перманганат-ионов. Выполнение закона Бугера-Ламберта-Бера наблюдается для растворов перманганат-ионов с концентрацией от $4 \cdot 10^{-5}$ до $3,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Концентрацию перманганат-ионов в исследуемом растворе можно определять двумя способами: методом градуировочного графика и с помощью среднего молярного коэффициента поглощения, который определяют экспериментально.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Приготовление исследуемых растворов калия перманганата

В 5 мерных колб на 25 мл помещают соответственно 2,0; 6,0; 10,0; 14,0 и 18,0 мл эталонного 0,5 мм раствора калия перманганата, содержимое каждой колбы доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Задание 2. Измерение оптической плотности эталонных растворов калия перманганата. Вычисление среднего молярного коэффициента поглощения раствора калия перманганата

Оптическую плотность приготовленных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре со светофильтром с максимумом светопропускания при 540 нм в кюветах, используя в качестве раствора сравнения воду. Полученные данные вносят в таблицу 1, затем производят расчет среднего молярного коэффициента поглощения $\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540}$ раствора калия перманганата при длине волны 540 нм по формуле:

$$\bar{\epsilon}_{540} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} \epsilon_i = \frac{1}{n} \sum \frac{A_i}{C_i \cdot l},$$

где ϵ_i – молярный коэффициент поглощения для i -го раствора калия перманганата; A_i – оптическая плотность i -го раствора; C_i – концентрация i -го раствора, моль/л; l – толщина кюветы; n – число приготовленных растворов

Таблица 1

Характеристики растворов калия перманганата

№	Концентрация иона (C_i) моль/л	Оптическая плотность, A_i	Средний молярный коэффициент поглощения, $\bar{\epsilon}_{540}$
1	$4 \cdot 10^{-5}$		
2	$1,2 \cdot 10^{-4}$		
3	$2,0 \cdot 10^{-4}$		
4	$2,8 \cdot 10^{-4}$		
5	$3,6 \cdot 10^{-4}$		

По данным таблицы 1 строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс молярные концентрации перманганат-ионов в растворах, а по оси ординат – соответствующие им значения оптических плотностей этих растворов.

Задание 3. Измерение оптической плотности анализируемого раствора калия перманганата и определение концентрации перманганат-ионов в анализируемом растворе с использованием среднего молярного коэффициента поглощения

Контрольную задачу (анализируемый раствор калия перманганата) в мерной колбе на 25 мл доводят дистиллированной водой до

метки, перемешивают и измеряют оптическую плотность приготовленного раствора при 540 нм относительно воды.

Молярную концентрацию перманганат-ионов в анализируемом растворе рассчитывают на основе закона Бугера-Ламберта-Бера по формуле:

$$c(\text{MnO}_4^-) = \frac{\bar{A}(\text{MnO}_4^-)_{540}}{\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540} \cdot l} ,$$

где $\bar{A}(\text{MnO}_4^-)_{540}$ – средняя оптическая плотность анализируемого раствора при 540 нм;

$\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540}$ – среднее значение молярного коэффициента поглощения раствора калия перманганата при 540 нм;

l – толщина кюветы

Задание 4. Определение концентрации перманганат-ионов в анализируемом растворе методом градуировочного графика

Молярную концентрацию перманганат-ионов в анализируемом растворе находят также по градуировочному графику. Для этого строят зависимости оптических плотностей исследуемых растворов от концентрации, откладывая по оси абсцисс молярные концентрации определяемых ионов в растворах, а по оси ординат – соответствующие значения оптических плотностей.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается закон Бугера-Ламберта-Бера?
2. Каким образом можно определить неизвестную концентрацию раствора, используя метод фотоэлектроколориметрии?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. СОГЛАСНО ЗАКОНУ БУГЕРА-ЛАМБЕРТА-БЕРА, ИНТЕНСИВНОСТЬ СВЕТА ПРИ ПРОХОЖДЕНИИ ЧЕРЕЗ РАСТВОР

- 1) логарифмически возрастает
- 2) прямолинейно уменьшается
- 3) экспоненциально уменьшается
- 4) остается без изменений

2. ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ – ЭТО

- 1) десятичный логарифм отношения интенсивности света, вышедшего из образца, к начальной интенсивности света

- 2) натуральный логарифм отношения начальной интенсивности света к интенсивности света, вышедшего из образца
 - 3) натуральный логарифм отношения интенсивности света, вышедшего из образца, к начальной интенсивности света
 - 4) десятичный логарифм отношения начальной интенсивности света к интенсивности света, вышедшего из образца
3. К УСЛОВИЯМ ВЫПОЛНЕНИЯ ЗАКОНА БУГЕРА-ЛАМБЕРТА-БЕРА ОТНОСЯТСЯ
- 1) отсутствие взаимодействия частиц вещества в растворе
 - 2) соблюдение стандартных условий
 - 3) монохроматичность света
 - 4) хаотическое распределение частиц вещества в растворе
4. МАКСИМУМ СВЕТОПОГЛОЩЕНИЯ ПЕРМАНГАНАТ-ИОНОВ (528 НМ) ЛЕЖИТ В
- 1) зеленой области видимого спектра
 - 2) красной области видимого спектра
 - 3) ультрафиолетовой области
 - 4) инфракрасной области
5. ЗАВИСИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ
- 1) экспоненциальная
 - 2) логарифмическая
 - 3) прямолинейная
 - 4) отсутствует
6. ЗАКОН БУГЕРА-ЛАМБЕРТА-БЕРА ОПРЕДЕЛЯЕТ ЗАВИСИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ СРЕДЫ ОТ
- 1) молярного коэффициента поглощения
 - 2) концентрации вещества
 - 3) длины волны действующего света
 - 4) толщины кюветы

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Одинаковая освещенность фотометрических полей была получена при толщине $l_1=8$ мм у эталонного 3 % раствора и $l_2=24$ мм у исследуемого раствора.

Определить концентрацию раствора

Задача 2

Интенсивность света, прошедшего через раствор, уменьшилась в 10 раз. Известно, что это вещество имеет молярный коэффициент поглощения при данной длине волны, равный $500 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{см})$. Толщина кюветы с раствором – 1 см.

Найти концентрацию вещества в растворе.

Задача 3

При прохождении света через раствор с концентрацией $0,5 \text{ моль/л}$ интенсивность света уменьшилась в 5 раз. Толщина кюветы равна $0,3 \text{ см}$.

Рассчитать молярный коэффициент поглощения вещества при длине волны 400 нм .

ЗАНЯТИЕ 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО РАСТВОРА МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

Цель занятия: количественное определение содержания дихромат- и перманганат-ионов при их совместном присутствии в анализируемом растворе.

Материалы и оборудование: фотоэлектроколориметр (КФК-ЗКМ), кюветы, колбы мерные, штатив с пробирками, мерный цилиндр, мерные пипетки, эталонные растворы калия дихромата и калия перманганата (0,5 мМ).

Вопросы для самоподготовки:

1. Сущность фотометрических методов анализа и их возможности.
2. Основной закон светопоглощения.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

При прохождении белого света с интенсивностью I_0 через прозрачный стеклянный сосуд, заполненный раствором, происходит ослабление этого света (рис. 1). Выходящий свет будет иметь другую, меньшую, интенсивность I . Ослабление светового потока связано, в основном, с поглощением световой энергии I_a раствором. Кроме того, имеет место отражение света $I_{отр}$ от границ раздела воздух-стекло, стекло-раствор. Наконец, в растворе происходит рассеяние света I_p мельчайшими взвешенными частицами.

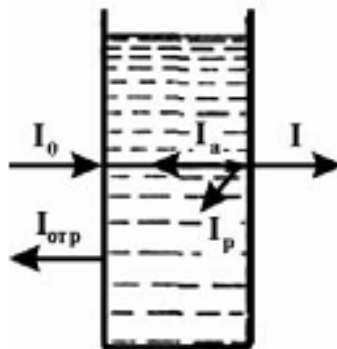


Рис. 1. Поглощение, рассеивание и отражение света от раствора в кювете

А. Бером было установлено, что при прохождении света через газы и растворы степень поглощения вещества зависит от числа частиц в единице объема, то есть оптическая плотность зависит от концентрации вещества по закону:

$$D = \varepsilon \cdot l \cdot C,$$

где ε – молярный коэффициент поглощения, который характеризует поглощательную способность данного вещества;

l – толщина слоя;

C – концентрация вещества

Эта зависимость оптической плотности от концентрации вещества в растворе и толщины поглощающего слоя известна под названием *закона Бугера-Ламберта-Бера*.

Таким образом, оптическая плотность D есть мера непрозрачности вещества толщиной l для оптического излучения. Оптическая плотность характеризует ослабление оптического излучения в слоях различных веществ (красителях, светофильтрах, растворах, газах и т. д.). Оптическая плотность не зависит от площади поперечного сечения падающего на слой вещества светового потока, она зависит только от толщины поглощающего слоя, концентрации поглощающего вещества и поглощающей способности вещества. Величина оптической плотности D безразмерна и связана с концентрацией раствора C прямолинейно (рис. 2).

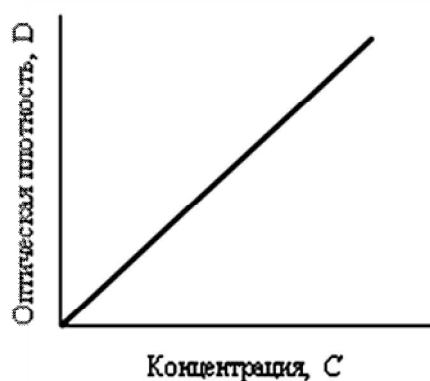


Рис. 2. Зависимость оптической плотности D от концентрации раствора C

Определение дихромат- и перманганат-ионов в растворе при их совместном присутствии основано на различии спектров поглощения определяемых компонентов и использовании закона аддитивности

оптической плотности. Сущностью закона аддитивности является независимость поглощения индивидуального вещества от наличия других веществ, обладающих собственным поглощением, или индифферентных к электромагнитному излучению. Таким образом, при данной длине волны оптическая плотность смеси компонентов, не взаимодействующих между собой, равна сумме оптических плотностей отдельных компонентов при той же длине волны. Этот закон можно применять в данном случае потому, что дихромат- и перманганат-ионы не взаимодействуют между собой и для них выполняется закон Бугера-Ламберта-Бера в используемых в работе пределах концентраций ионов.

При длине волны 528 нм, соответствующей максимуму светопоглощения перманганат-ионов, светопоглощением дихромат-ионов можно пренебречь. При длине волны 350 нм, соответствующей максимуму светопоглощения дихромат-ионов, свет поглощают оба иона; оптическая плотность раствора при этой длине определяется концентрацией обоих компонентов. Для определения содержания дихромат- и перманганат-ионов измеряют оптическую плотность анализируемого раствора на фотоэлектроколориметре с двумя светофильтрами, имеющими максимумы светопропускания при 364 и 540 нм, что примерно соответствует максимумам поглощения дихромат- и перманганат-ионов. Оптическая плотность анализируемого раствора при 540 нм определяется практически только присутствием перманганат-ионов, поэтому по измеренному значению оптической плотности раствора при этой длине волны можно рассчитать концентрацию перманганат-ионов в исследуемом растворе. Зная концентрацию перманганат-ионов, можно рассчитать вклад этих ионов в оптическую плотность анализируемого раствора при 364 нм и на основе закона аддитивности оптической плотности можно рассчитать вклад в оптическую плотность раствора дихромат-ионов при этой длине волны и, следовательно, концентрацию дихромат-ионов в растворе.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Приготовление растворов калия дихромата и калия перманганата

В пять мерных колб на 25 мл помещают по 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5 мл эталонного 0,5 мМ раствора калия дихромата; содержимое каждой колбы доводят до метки дистиллированной водой и тщательно пере-

мешивают. Серию растворов калия перманганата готовят аналогично путем разбавления эталонного 0,5 мМ раствора калия перманганата.

Задание 2. Измерение оптической плотности эталонных растворов калия дихромата и калия перманганата. Расчет средних молярных коэффициентов поглощения

Оптическую плотность приготовленных растворов измеряют в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения воду. Оптическую плотность растворов калия дихромата измеряют с одним светофильтром с максимумом светопропускания при 364 нм. Оптическую плотность растворов калия перманганата измеряют последовательно с двумя светофильтрами с максимумами светопропускания при 364 и 540 нм. Полученные данные вносят в табл. 2, по данным которой рассчитывают значения средних молярных коэффициентов поглощения ($\bar{\epsilon}_\lambda$) перманганат-ионов при 364 и 540 нм, а дихромат-ионов – только при 364 нм по формуле:

$$\bar{\epsilon}_\lambda = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} \epsilon_i = \frac{1}{n} \sum \frac{A_i}{C_i \cdot l} ,$$

где ϵ_i – молярный коэффициент поглощения для i -го раствора этого иона при длине волны λ ;

A_i – оптическая плотность i -го раствора этого иона при длине волны λ ;

C_i – концентрация i -го раствора, моль/л;

l – толщина кюветы;

n – число приготовленных растворов

Таблица 2

Характеристики растворов калия перманганата и калия дихромата

Определяемый ион	№	Концентрация иона (C_i), моль/л	364 нм		540 нм	
			A_i	$\bar{\epsilon}_\lambda$	A_i	$\bar{\epsilon}_\lambda$
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	1	$5 \cdot 10^{-5}$			—	—
	2	$1 \cdot 10^{-4}$			—	—
	3	$1,5 \cdot 10^{-4}$			—	—
	4	$2,0 \cdot 10^{-4}$			—	—
	5	$2,5 \cdot 10^{-4}$			—	—
MnO_4^-	1	$5 \cdot 10^{-5}$				
	2	$1 \cdot 10^{-4}$				
	3	$1,5 \cdot 10^{-4}$				
	4	$2,0 \cdot 10^{-4}$				
	5	$2,5 \cdot 10^{-4}$				

Задание 3. Измерение оптической плотности анализируемого раствора, содержащего калия дихромат и калия перманганат

Контрольную задачу, содержащую смесь калия дихромата и калия перманганата, получают в мерной колбе на 25 мл, разбавляют водой до метки. Затем перемешивают и измеряют оптическую плотность приготовленного раствора на фотоэлектроколориметре с двумя светофильтрами 364 и 540 нм в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см относительно воды. Каждое измерение проводят два раза и записывают средние значения оптических плотностей анализируемых растворов при соответствующих длинах волн.

Задание 4. Расчет концентрации дихромат- и перманганат-ионов в анализируемом растворе с использованием молярных коэффициентов поглощения

Молярную концентрацию перманганат-ионов в анализируемом растворе рассчитывают на основе основного закона светопоглощения по известной величине оптической плотности анализируемого раствора при 540 нм по формуле:

$$c(\text{MnO}_4^-) = \frac{\bar{A}(X)_{540}}{\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540} \cdot l} ,$$

где $\bar{A}(X)_{540}$ – средняя оптическая плотность анализируемого раствора при 540 нм;

$\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540}$ – среднее значение молярного коэффициента поглощения калия перманганата при 540 нм

Согласно закону аддитивности, оптическая плотность $\bar{A}(X)_{540}$ анализируемого раствора при 364 нм равна:

$$\begin{aligned} \bar{A}(X)_{364} &= \bar{A}(\text{MnO}_4^-)_{364} + \bar{A}(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{364} \\ &= c(\text{MnO}_4^-) \cdot \bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{364} \cdot l + c(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}) \cdot \bar{\epsilon}(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{364} \cdot l \end{aligned}$$

Подставляя в это выражение значение концентрации перманганат-ионов в анализируемом растворе, получаем:

$$\bar{A}(X)_{364} = \frac{\bar{A}(X)_{540}}{\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540} \cdot l} \cdot \bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{364} \cdot l + c(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}) \cdot \bar{\epsilon}(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{364} \cdot l$$

Отсюда концентрация дихромат-ионов в анализируемом растворе равна:

$$c(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}) = \frac{\bar{A}(X)_{364} \cdot \bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540} - \bar{A}(X)_{540} \cdot \bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{364}}{\bar{\epsilon}(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{364} \cdot \bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{540} \cdot l} ,$$

где $\bar{A}(X)_{364}$ – средняя оптическая плотность анализируемого раствора при 364 нм;

$\bar{\epsilon}(\text{MnO}_4^-)_{364}$ – среднее значение молярного коэффициента поглощения перманганат ионов при 364 нм;

$\bar{\epsilon}(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{364}$ – среднее значение молярного коэффициента поглощения дихромат ионов при 364 нм

Задание 5. Определение концентрации дихромат- и перманганат-ионов в анализируемом растворе методом градуировочного графика

По данным табл. 2 строят градуировочные графики зависимости оптических плотностей эталонных растворов от концентрации для перманганат-ионов при 540 нм (график 1) и 364 нм (график 2) и для дихромат-ионов при 364 нм (график 3). По оси абсцисс откладывают молярные концентрации определяемых ионов в растворах, а по оси ординат – соответствующие значения оптических плотностей. При соблюдении закона Бугера-Ламберта-Бера получают прямые, исходящие из начала координат.

Расчет концентраций ведут следующим образом.

1. По значению оптической плотности анализируемого раствора при 540 нм с использованием графика 1 находят концентрацию перманганат-ионов в растворе.

2. По графику 2 определяют значение оптической плотности анализируемого раствора при 364 нм, создаваемой за счет присутствия перманганат-ионов в этом растворе (концентрация этих ионов определена по графику 1).

3. Из оптической плотности анализируемого раствора при 364 нм вычитают оптическую плотность, создаваемую перманганат-ионами при той же длине волны, и получают оптическую плотность, обусловленную присутствием дихромат-ионов в этом растворе:

$$\bar{A}(\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-})_{364} = \bar{A}(X)_{364} - \bar{A}(\text{MnO}_4^-)_{364}$$

4. По найденной величине оптической плотности с помощью графика 3 находят молярную концентрацию дихромат-ионов в анализируемом растворе.

Вопросы для самоконтроля

1. Почему концентрации перманганат-ионов и дихромат-ионов при их совместном присутствии в анализируемом растворе можно

- определять на основе закона аддитивности оптической плотности?
2. Как рассчитать концентрации перманганат-ионов и дихромат-ионов при их совместном присутствии в анализируемом растворе с использованием молярных коэффициентов погашения этих веществ?
 3. Как рассчитать концентрации перманганат-ионов и дихромат-ионов при их совместном присутствии в анализируемом растворе с использованием градуировочных графиков?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. ОСЛАБЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА ПРИ ПРОХОЖДЕНИИ ЧЕРЕЗ РАСТВОР СВЯЗАНО С

- 1) поглощением световой энергии
- 2) отражением света на границе фаз
- 3) рассеянием света частицами раствора
- 4) фотохимическими реакциями

2. МОЛЯРНЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ ПОГЛОЩЕНИЯ ХАРАКТЕРИЗУЕТ

- 1) интенсивность света, прошедшего через раствор
- 2) поглощательную способность вещества
- 3) скорость прохождения света через раствор
- 4) количество частиц в единице объема раствора

3. ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ ЗАВИСИТ ОТ

- 1) площади поперечного сечения падающего светового потока
- 2) толщины поглощающего слоя
- 3) концентрации поглощающего вещества
- 4) поглощающей способности вещества

4. ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ

Л

- 1) **МОЛЬ · СМ**
- 2) %
- 3) Вт/м²
- 4) отсутствует

5. ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ РАСТВОРА, СОДЕРЖАЩЕГО НЕСКОЛЬКО КОМПОНЕНТОВ, НЕ ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ МЕЖДУ СОБОЙ, РАВНА
- 1) сумме оптических плотностей компонентов раствора при длинах волн, соответствующих максимуму поглощения каждого из компонентов
 - 2) оптической плотности компонента раствора, имеющего наибольшее её значение
 - 3) среднему арифметическому суммы оптических плотностей каждого из компонентов раствора при той же длине волны
 - 4) сумме оптических плотностей каждого из компонентов раствора при той же длине волны
6. ЗАКОН БУГЕРА-ЛАМБЕРТА-БЕРА ПРИ ОТСУТСТВИИ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫХ ОШИБОК ВЫПОЛНЯЕТСЯ
- 1) всегда
 - 2) для малых толщин поглощающего образца
 - 3) при наличии межмолекулярного взаимодействия
 - 4) при отсутствии межмолекулярного и химического взаимодействия

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

При прохождении через кювету с окрашенным раствором лекарственного вещества интенсивность света уменьшилась на 18 %.

Определить показатель поглощения раствора.

Задача 2

Пучок монохроматического света $\lambda=600$ нм проходит через стеклянную пластинку толщины $l=1$ см. При этом поглощается 0,1 падающего света.

Определить натуральный монохроматический показатель поглощения стекла на этой длине волны.

Какой толщины должна быть стеклянная пластинка, чтобы поглотилась половина падающего света?

Задача 3

Имеется система двух последовательно расположенных кювет с растворами, оптическая плотность которых равна D_1 и D_2 .

Найти общую оптическую плотность D .

ЗАНЯТИЕ 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПОГЛОЩЕНИЯ ОКРАШЕННЫХ РАСТВОРОВ

Цель занятия: определить фотоэлектроколориметрическим методом молярные коэффициенты поглощения предложенных веществ

Материалы и оборудование: фотоэлектроколориметр (КФК-ЗКМ), набор пробирок в штативе, мерные пипетки, 10 % растворы CuSO_4 и NiCl_2 .

Вопросы для самоподготовки:

1. Понятия оптической плотности и молярного коэффициента поглощения.
2. Условия выполнения закона Бугера-Ламберта-Бера.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Теоретической основой метода является закон Ламберта-Бера, устанавливающий зависимость между интенсивностью света, проходящего через раствор вещества, поглощающего свет, и концентрацией этого раствора:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}$$

Здесь I – интенсивность света, вышедшего из раствора;

I_0 – интенсивность падающего света;

ε – молярный коэффициент поглощения, который характеризует поглощательную способность данного вещества;

c – концентрация раствора;

l – длина оптического пути.

Таким образом, закон Ламберта-Бера устанавливает, что интенсивность падающего света экспоненциально уменьшается в зависимости от концентрации раствора и длины оптического пути.

В логарифмической форме закон Ламберта-Бера устанавливает линейную зависимость между концентрацией раствора (c) и оптической плотностью (D) при постоянной длине оптического пути:

$$D = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Здесь обозначения те же, что и приведенные выше.

Молярный коэффициент светопоглощения характеризует чувствительность реакции и является постоянной величиной для данного окрашенного соединения. Для повышения чувствительности определения выбирают реакцию с максимальным значением ϵ . Значение ϵ для различных окрашенных соединений различны: для аквакомплексов меди и др. – ϵ порядка 10, для аммиакатов – $\epsilon=10^2-10^3$, для органических соединений – 10^4-10^5 . Молярный коэффициент поглощения раствора можно рассчитать, если приготовить серию растворов с известными концентрациями веществ и измерить оптическую плотность раствора. Коэффициент линейной регрессии зависимости $D=f(C)$ представляет собой молярный коэффициент поглощения.

Следует помнить, что закон Ламберта-Бера выполняется при нескольких условиях:

1. Свет должен быть монохроматическим, т. е. иметь определенную длину волны.
2. Частицы вещества должны хаотически распределяться в толще раствора.
3. Частицы растворенного вещества не должны взаимодействовать друг с другом.

Последние два условия выполняются, если раствор разбавлен (используются низкие концентрации вещества). При нарушении любого из условий закон не выполняется.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Приготовление калибровочных растворов

Приготовить калибровочные растворы для CuSO_4 и NiCl_2 согласно приведенной ниже прописи (табл. 3).

Таблица 3

№	Концентрация приготавливаемого раствора (%)	Кол-во исходного раствора (мл)	Кол-во воды (мл)
1	8 %	8 мл	2 мл
2	6 %	6 мл	4 мл
3	4 %	4 мл	6 мл
4	2 %	2 мл	8 мл
5	1 %	1 мл	9 мл

Задание 2. Построение калибровочных графиков и определение молярного коэффициента поглощения для каждого исследуемого раствора

Необходимо измерить оптическую плотность исследуемых растворов CuSO_4 и NiCl_2 с концентрацией 6 % в диапазоне длин волн 450-750 нм с шагом в 20 нм. Затем построить график зависимости оптической плотности от длины волны света. Полученный график отражает поглощение света исследуемым веществом и называется *спектром поглощения*. Исходя из полученных графиков, выбрать ту длину волны, которой соответствует максимальное значение оптической плотности. На данной длине произвести изменение величины оптической плотности для остальных эталонных растворов.

По полученным данным построить калибровочные графики для растворов CuSO_4 и NiCl_2 , отражающие линейную зависимость оптической плотности вещества от его концентрации (рис. 3). Для определения молярного коэффициента поглощения растворов необходимо найти тангенс угла наклона прямой на графике к оси абсцисс.

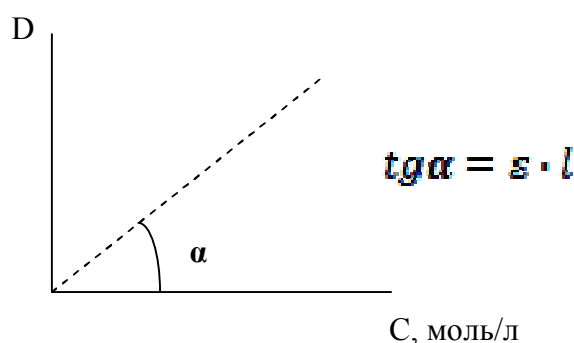


Рис. 3. Калибровочный график

Необходимо помнить, что $\text{tg} \alpha$ равен отношению противолежащего катета (значение оптической плотности) к прилежащему катету (значение концентрации, выраженной в моль/л). Перед вычислениями необходимо процентную концентрацию перевести в молярную. Для этого необходимо знать молекулярную массу сульфата меди и хлорида никеля. Длина оптического пути l , по сути, является толщиной раствора в кювете. Этот параметр (в мм) указан на стенке кюветы.

Вопросы для самоконтроля

1. Каков физический смысл молярного коэффициента поглощения?
2. Каковы приемы для определения молярного коэффициента поглощения?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. ЗАВИСИМОСТЬ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ

- 1) экспоненциальная
- 2) прямолинейная
- 3) логарифмическая
- 4) отсутствует

2. МОЛЯРНЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ ПОГЛОЩЕНИЯ ХАРАКТЕРИЗУЕТ

- 1) интенсивность света, прошедшего через раствор
- 2) поглощательную способность вещества
- 3) скорость прохождения света через раствор
- 4) количество частиц в единице объема раствора

3. ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ НЕ ЗАВИСИТ ОТ

- 1) концентрации поглощающего вещества
- 2) толщины поглощающего слоя
- 3) площади поперечного сечения падающего светового потока
- 4) поглощающей способности вещества

4. ЕДИНИЦА ИЗМЕРЕНИЯ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПОГЛОЩЕНИЯ

- 1) $\frac{\text{л}}{\text{моль} \cdot \text{см}}$
- 2) %
- 3) Вт/м²
- 4) отсутствует

5. СПЕКТР ПОГЛОЩЕНИЯ – ЭТО

- 1) зависимость оптической плотности от молярного коэффициента поглощения
- 2) зависимость оптической плотности от концентрации раствора
- 3) зависимость оптической плотности от длины оптического пути
- 4) зависимость оптической плотности от длины волны падающего света

6. К ПАРАМЕТРАМ КЮВЕТЫ С ВЕЩЕСТВОМ, ОТ КОТОРЫХ ЗАВИСИТ ЕЁ ПРОПУСКАНИЕ ПРИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ, ОТНОСЯТСЯ

- 1) толщина и площадь поперечного сечения
- 2) толщина
- 3) освещённый объём
- 4) форма поперечного сечения

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

В 4-процентном растворе вещества интенсивность света уменьшается в 2 раза на глубине $l_1=20$ мм.

Определить во сколько раз уменьшается интенсивность света на глубине $l_2=30$ мм в 8% растворе того же вещества?

Задача 2

При прохождении монохроматического света через слой вещества толщины $x=15$ см его интенсивность убывает в 4 раза.

Определить показатель рассеяния, если показатель поглощения $k=0,025$ см⁻¹.

Задача 3

При прохождении света с длиной волны λ_1 через слой вещества его интенсивность уменьшается вследствие поглощения в 4 раза. Интенсивность света с длиной волны λ_2 по той же причине ослабляется в 3 раза.

Найти показатель поглощения k_2 для света с длиной волны λ_2 , если для света с длиной волны λ_1 он равен $k_1=0,02$ см⁻¹.

ЗАНЯТИЕ 4

ИЗУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА

Цель занятия: изучить оптические свойства оксигемоглобина и метгемоглобина методом спектрофотометрии.

Материалы и оборудование: спектрофотометр (ПромЭкоЛаб ПЭ-5400УФ), центрифуга, центрифужные пробирки, кюветы, пробирки, свежая кровь, мерные пипетки, 150 мМ раствор хлорида натрия, гепарин, дистиллированная вода.

Вопросы для самоподготовки:

1. Ультраструктура белков, третичная и четвертичная структура.
2. Гемоглобин, его структура и разновидности.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Гемоглобин – это глобулярный белок, способный связывать и переносить молекулярный кислород. Гемоглобин является основным компонентом эритроцитов. В одном эритроците содержится около 280 миллионов молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из 10 тысяч атомов водорода, углерода, азота, кислорода, серы и железа. Основная функция гемоглобина – обратимое связывание молекулярного кислорода и доставка его во все клетки организма. Молекулярный вес гемоглобина равен 68000 Да. Гемоглобин – представитель гемопротейнов, т. е. группы сложных белков. Молекула его состоит из четырех субъединиц – двух α - и двух β -субъединиц. Полипептидная цепь каждой из субъединиц специфическим образом уложена вокруг большого плоского железосодержащего гема. Все четыре цепи гемоглобина сходны между собой по форме. Форма и функция гемоглобинов различных животных сходны, однако аминокислотный состав их различается и тем сильнее, чем более эволюционно они удалены друг от друга.

Гем только в связи с нативным глобином способен лабильно связывать кислород. При поглощении кислорода β -цепи гемоглобина сближаются, при отдаче его – расходятся. Положение α -цепей при этом не меняется. Следовательно, присоединение и отдача кислорода молекулой гемоглобина сопровождается изменением его структуры,

что приводит к изменению спектра поглощения гемоглобина. Присоединив молекулу кислорода, гемоглобин переходит в оксигенированную форму.

К распространенным производным гемоглобина относятся также метгемоглобин и карбоксигемоглобин. В метгемоглобине железо находится в трехвалентном состоянии, в то время как в деоксигенированном и в оксигенированном гемоглобине – в двухвалентном.

Метгемоглобин образуется при выдерживании на воздухе растворов оксигемоглобина. Гемоглобин обладает большим сродством к угарному газу (СО), переходя при взаимодействии с ним в карбоксигемоглобин, не обладающий способностью обратимо присоединять кислород.

Каждая форма гемоглобина характеризуется определенным спектром поглощения, представляющим собой зависимость оптической плотности раствора гемоглобина от длины волны света (рис. 4).

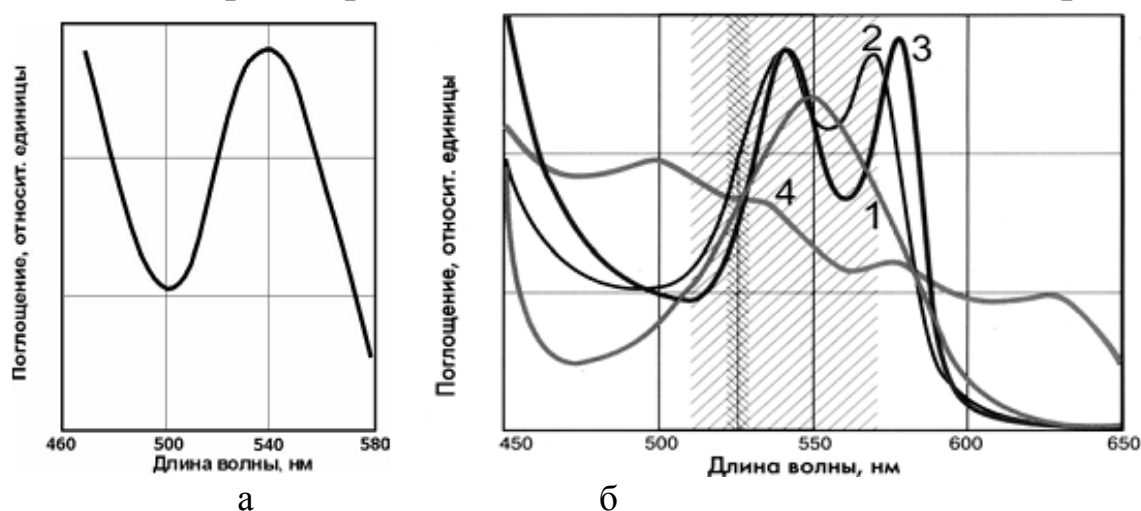


Рис. 4. Спектр поглощения производных гемоглобина: а) спектр поглощения гемиглобинцианида (CnmetHb), б) спектры поглощения производных гемоглобина: 1 – дезоксигемоглобина (HbN); 2 – карбоксигемоглобина (HbCO); 3 – оксигемоглобина (HbO₂); 4 – метгемоглобина (MetHb)

Наиболее интенсивной полосой в спектре поглощения гемоглобина является полоса Соре, принадлежащая порфириновой части его молекулы. По изменению положения интенсивности поглощения этой полосы можно судить о структурных изменениях молекул различных форм гемоглобина (табл. 4).

При хранении растворов гемоглобина прозрачность их уменьшается, что приводит при спектрофотометрировании к увеличению оптической плотности за счет роста светорассеяния в его растворах. Светорассеяние является функцией величины и числа частиц, нахо-

дящихся в растворе, и также позволяет судить о процессах изменения структуры веществ, и в частности белков, под воздействием определенных факторов.

Таблица 4

Спектральные характеристики различных форм гемоглобина

	α -Полоса		β -Полоса		Полоса Соре	
	λ , нм	ϵ_{λ} , $M^{-1}cm^{-1}$	λ , нм	ϵ_{λ} , $M^{-1}cm^{-1}$	λ , нм	ϵ_{λ} , $M^{-1}cm^{-1}$
Оксигемоглобин	577	14600	542	13800	412	135000
Дезоксигемоглобин	555	13500			430	119000
Карбоксигемоглобин	569	13400	539	13400	419	191000

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Получение раствора оксигемоглобина

Растворы гемоглобина даже при хранении в холодильнике в течение трех-четырех дней теряют свою прозрачность и становятся непригодными для спектрофотометрических измерений. В связи с этим для работы рекомендуется использовать свежеприготовленные растворы.

Ниже приводится описание методики выделения оксигемоглобина. В основе метода получения гемоглобина лежит явление гемолиза эритроцитов под влиянием ряда соединений (толуол, вода, и др.).

1. Свежую цельную кровь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 минут, затем удаляют плазму.
2. К осадку эритроцитов добавляют трехкратный объем 150 мМ раствора хлорида натрия.
3. Суспензию еще раз центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об/мин.
4. Полученный осадок подвергают гемолизу дистиллированной водой (соотношение 1:3) в течение 20 минут.

Задание 2. Изучение оптических свойств различных форм гемоглобина

1. Снять спектр поглощения раствора оксигемоглобина в интервале длин волн 400–600 нм.
2. Представить в графическом виде зависимость оптической плотности раствора от длины поглощаемого света, откладывая по оси ординат оптическую плотность раствора, а по оси абсцисс – соответствующие длины волн.

3. Найти длину волны ($\lambda_{\text{макс}}$), на которую приходится максимум поглощения.

4. Образование метгемоглобина при выдерживании на воздухе растворов оксигемоглобина: выдержать раствор при свободном доступе воздуха в течение следующих временных интервалов: 20, 40, 60, 80 минут. По завершении каждого из интервалов измерить оптическую плотность раствора при длине волны, соответствующей максимуму поглощения оксигемоглобина. Построить кинетическую кривую изменения поглощения раствора оксигемоглобина (зависимость оптической плотности раствора от времени выдерживания оксигемоглобина на воздухе). Снять спектр поглощения раствора оксигемоглобина, выдержанного на воздухе в течение 60 минут.

5. Оформить полученные результаты в виде таблицы.

6. Проанализировать полученные данные.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается физиологическая роль гемоглобина?
2. Каковы особенности спектра поглощения гемоглобина?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. РАСПРОСТРАНЕННЫЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА

- 1) дезоксигемоглобин
- 2) карбоксигемоглобин
- 3) метгемоглобин
- 4) оксигемоглобин

2. ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА СВЯЗАНО С

- 1) конформационными перестройками при связывании с кислородом
- 2) денатурацией молекулы гемоглобина
- 3) длительным хранением раствора гемоглобина
- 4) изменением концентрации гемоглобина в растворе

3. ПОЛОСА СОРЕ В СПЕКТРЕ ПОГЛОЩЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА

- 1) характеризует поглощение света порфириновой частью молекулы гемоглобина
- 2) характеризует минимум спектра поглощения гемоглобина
- 3) является наиболее интенсивным максимумом в спектре поглощения гемоглобина
- 4) характеризует поглощение света атомом железа в составе гемма

4. ОКИСЛЕННАЯ ФОРМА ГЕМОГЛОБИНА НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) дезоксигемоглобин
- 2) карбоксигемоглобин
- 3) миоглобин
- 4) метгемоглобин

5. В ОТЛИЧИЕ ОТ ОКСИГЕМОГЛОБИНА В МЕТГЕМОГЛОБИНЕ АТОМ ЖЕЛЕЗА В СОСТАВЕ МОЛЕКУЛЫ

- 1) двухвалентен
- 2) трехвалентен
- 3) находится в более окисленной форме
- 4) находится в более восстановленной форме

6. ОКСИГЕНИРОВАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН ИМЕЕТ МАКСИМУМЫ ПОГЛОЩЕНИЯ В

- 1) синей области спектра
- 2) желтой области спектра
- 3) зеленой области спектра
- 4) красной области спектра

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Показатель поглощения плазмы крови равен $0,836 \text{ см}^{-1}$.

Определить, какая толщина слоя плазмы крови уменьшает интенсивность падающего света в 3 раза?

Задача 2

В кювете находится раствор крови, имеющий концентрацию $C=0,85$ моль/л. Молярный показатель поглощения для этого раствора $\epsilon=0,35$ л/(см*моль).

Определить, во сколько раз уменьшится интенсивность света при прохождении его через кювету длины $l=8$ см, заполненную этим раствором.

Задача 3

При прохождении света через раствор крови в кювете высотой $h=6$ см интенсивность света уменьшилась на 12 %.

*Определить концентрацию раствора, если известно, что его удельный показатель поглощения в законе Бера равен $0,325$ л/(см*моль).*

ЗАНЯТИЕ 5

ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Цель занятия: исследовать явление фотодинамического гемолиза эритроцитов.

Материалы и оборудование: фотоэлектроколориметр (КФК-ЗКМ), осветитель, мерные цилиндры, пипетки, колбы, пробирки, 0,5 % раствор CuSO_4 ; кровь, физиологический раствор, раствор гепарина, дистиллированная вода, раствор тиосульфата натрия, метиленовый синий.

Вопросы для самоподготовки:

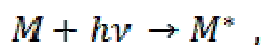
1. Стадии фотохимической реакции.
2. Основные законы фотохимии.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Фотобиология изучает закономерности и механизмы действия света на биологические системы. Фотобиологические процессы протекают под действием излучения в ультрафиолетовой, видимой и близкой инфракрасной области спектра. Под фотобиологическими реакциями следует понимать химические или физические изменения в биологических системах, вызванные этими излучениями.

Фотобиологический процесс представляет собой последовательность различных стадий, начинающихся с момента поглощения кванта световой энергии и заканчивающихся разнообразными биохимическими и физиологическими эффектами. Изучение процессов, происходящих на этих стадиях, требует выбора соответствующих методов исследования.

Физическая реакция поглощения света молекулой, являющаяся первым этапом фотобиологического процесса, может быть записана в следующем виде:



где M и M^* – основное и возбужденное состояния молекулы, соответственно. Возбужденная молекула не отличается по химическому составу и строению от молекулы в основном состоянии E_0 , но имеет

несколько деформированное электронное облако и обладает большей энергией E^* на величину энергии поглощенного кванта света, т. е.

$$E^* - E_0 = h\nu ,$$

Фотохимические превращения претерпевают молекулы не в основном, а в возбужденном состоянии, к которому приводит поглощение кванта света (правило Гротгуса).

Важнейшей количественной характеристикой фотохимической реакции является *квантовый выход реакции* (φ), представляющий собой отношение числа прореагировавших молекул данного вещества к числу молекул, поглотивших фотоны. Если каждый поглощенный фотон вызывает фотохимический акт, то $\varphi = 1$.

Количество образовавшихся фотопродуктов определяется *дозой* – произведением интенсивности падающего света I на время облучения t . Иными словами, для необратимой одноквантовой фотохимической реакции одинаковые произведения $I \cdot t$ создают одинаковые количества фотопродуктов, независимо от численных значений, которые принимают I и t в отдельности (правило Бунзена-Роско).

Поскольку свет имеет фотонную природу, первичным изменением после каждого поглощения кванта света является только одно физическое или химическое превращение молекулы (закон эквивалентности Эйнштейна-Штарка). Однако в случае цепных реакций первичный фотопродукт может генерировать большое количество вторичных продуктов и кажущийся квантовый выход реакций будет больше единицы. С другой стороны, известны и такие реакции, когда для образования конечного продукта необходимо последовательное поглощение двух квантов света.

Для фотобиологии в основном типичны одноквантовые фотохимические реакции. Известны следующие основные типы одноквантовых фотохимических реакций органических молекул:

1. Фотораспад, при котором с разрывом химических связей происходит распад молекулы на радикалы, ионы или нейтральные молекулы.

2. Фотоперегруппировки, в ходе которых один изомер или таутомер превращается в другой.

3. Фотоприсоединение, при котором происходит присоединение к возбужденной молекуле других молекул.

4. Фотоперенос электронов, при котором возбужденная молекула отдает свой электрон второй, невозбужденной молекуле, или, наоборот, получает лишний электрон.

5. Фотоперенос протона; суть этой реакции – в присоединении к возбужденной молекуле протона от невозбужденной кислоты или, наоборот, – в отдаче возбужденной кислотой своего протона основанию.

На такие объекты, как клетки и ткани животных, видимый свет обычно не оказывает заметного эффекта. Однако в присутствии некоторых красителей воздействие света, в особенности ультрафиолетового диапазона, приводит к повреждению или гибели клеток. Это явление носит название фотодинамического действия. Какие молекулярные структуры клетки в этом случае повреждаются в первую очередь, определяется, с одной стороны, природой красителя, с другой – особенностями биологического объекта, а именно проницаемостью клеток для красителя и его распределением внутри клетки. Цепь событий, приводящих к биологическому эффекту, начинается с образования возбужденного состояния молекулы красителя в результате поглощения кванта света. Эта стадия запускает фотохимические превращения, представляющие в основном окисление биологически важных веществ. При этом наиболее эффективно будут разрушаться молекулы тех веществ, с которыми краситель из-за повышенного сродства либо образует комплекс, либо находится в непосредственной близости.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Изучение гемолиза методом фотоколориметрии

При разрушении эритроцитов – гемолизе – происходит уменьшение мутности суспензии, а следовательно, увеличение светопропускания: образец становится более прозрачным. Изменение пропускания суспензии эритроцитов поэтому может служить мерой гемолиза. Пропускание эритроцитов можно измерять на фотоэлектроколориметре (ФЭК). Чтобы поглощение гемоглобина не мешало измерению светорассеяния, определение гемолиза производят при длине волны 670 нм, т. е. в спектральной области, где гемоглобин не поглощает, и все изменения светопропускания связаны исключительно с изменением мутности раствора – светорассеянием.

Для выполнения задания необходимо приготовить взвесь отмытых эритроцитов в физиологическом растворе, для этого:

- 1) цельную кровь стабилизируют гепарином, растворенным в 0,85 %-ном растворе хлористого натрия (физиологическом растворе);
- 2) стабилизированную кровь центрифугируют в течение 20 минут при 2000 об/мин, затем отбирают плазму;
- 3) к эритроцитам добавляют трехкратный объем 0,85 %-ного раствора хлористого натрия, при этом осторожно размешивая суспензию стеклянной палочкой;
- 4) суспензию центрифугируют в течение 5 минут при 2000 об/мин;
- 5) промывают эритроциты 3–4 раза.

Две пробы исходной суспензии развести в 4 раза: одну – дистиллированной водой, другую – физиологическим раствором. Перемешать и оставить на 30 минут при комнатной температуре.

Затем измерить оптическую плотность обоих растворов. В качестве образца сравнения, относительно которых производится измерение светопропускания для обоих образцов, служит кювета с дистиллированной водой. Убедиться в том, что пропускание образца, в который добавлена вода (гипотонический гемолиз), значительно превышает пропускание суспензии эритроцитов в физиологическом растворе (контроль).

Задание 2. Исследование гемолиза эритроцитов под действием освещения в присутствии красителя

В качестве источника для облучения суспензии эритроцитов используют мощную лампу накаливания. Пробирки с облучаемой суспензией помещают на расстоянии 25 см от источника освещения. Чтобы исключить нагревание объекта инфракрасным излучением лампы, между ней и пробирками с суспензией эритроцитов помещают стеклянный сосуд, заполненный 0,5 % раствором CuSO_4 (толщина слоя раствора должна быть около 5-10 см).

1. Приготовить 0,04 % раствор метиленового синего в физиологическом растворе. В две пробирки налить по 4 мл раствора метиленового синего и добавить в каждую пробирку 1 мл суспензии эритроцитов (проба 1 и проба 2).

2. Налить в две контрольные пробирки по 4 мл физиологического раствора и по 1 мл взвеси эритроцитов (проба 3 и проба 4).

3. Тщательно перемешать растворы во всех пробирках.

4. Пробы 1 и 3 облучить в течение 10 минут. Пробы 2 и 4, которые служат темновым контролем, в это время должны находиться в темноте при той же (комнатной) температуре.

5. Поместить все пробирки в темноту и их пропускание измерять через каждые 15 минут в течение 1 часа. Измерения производятся так, как в задании 1. В качестве раствора сравнения использовать 0,04 % раствор эритрозина на физиологическом растворе.

Результаты измерений представить в виде графика зависимости пропускания T от времени после облучения t для всех четырех проб:

- эритроциты + краситель + освещение;
- эритроциты + краситель, без освещения;
- эритроциты + освещение, без красителя;
- эритроциты, без красителя и без освещения.

Задание 3. Влияние антиокислителей на фотодинамический гемолиз

Поскольку в ряде случаев в основе фотодинамического действия лежит реакция фотоокисления белков за счет световой энергии, поглощенной красителем, скорость и степень фотодинамического гемолиза можно уменьшить, добавляя к взвеси эритроцитов вещества антиокислительного характера. В качестве одного из них можно использовать гипосульфит (тиосульфат) натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

1. Приготовить четыре пробирки, содержащие по 4 мл 0,004 % раствора метиленового синего, приготовленного на физиологическом растворе + 1 мл 1 % взвеси эритроцитов.

2. В две пробирки (пробы 1 и 2) добавить по 0,5 мл 0,11 М раствора гипосульфита (раствор этой концентрации изотоничен физиологическому раствору и поэтому не вызовет гемолиза).

3. В две другие пробирки (пробы 3 и 4) добавить по 0,5 мл физиологического раствора, чтобы концентрация суспензии эритроцитов в опыте и в контроле была одинаковой.

4. Пробы 1 и 3 облучить, как в предыдущем задании. Пробы 2 и 4 держать в темноте.

5. Сразу после облучения и затем через каждые 15 минут измерять светопропускание этих проб в течение 1 часа.

Результаты измерений представить в виде графика зависимости пропускания T от времени, прошедшего после облучения, для всех 4 проб:

- эритроциты + краситель + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ + освещение;

эритроциты + краситель + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, без освещения;
эритроциты + краситель + освещение;
эритроциты + краситель, без освещения.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое квантовый выход фотохимических реакций?
2. Что такое фотодинамическое действие?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. ФОТОБИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ – ЭТО ХИМИЧЕСКИЕ ИЛИ ФИЗИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ, ВЫЗВАННЫЕ ИЗЛУЧЕНИЕМ В

- 1) видимой области спектра
- 2) ультрафиолетовой области спектра
- 3) красной области видимого спектра
- 4) области спектра, близкой к инфракрасной

2. КВАНТОВЫЙ ВЫХОД РЕАКЦИИ – ЭТО

- 1) отношение числа прореагировавших молекул данного вещества к числу молекул, поглотивших фотоны
- 2) число молекул, поглотивших фотоны
- 3) произведение интенсивности падающего света (I) на время облучения (t)
- 4) количество поглощенных фотонов

3. ДЛЯ ФОТОНА СПРАВЕДЛИВО УТВЕРЖДЕНИЕ, ЧТО ОН

- 1) имеет нулевую массу покоя
- 2) имеет отрицательный заряд
- 3) является квантом электромагнитного излучения
- 4) электронейтрален

4. ПРИ ПОГЛОЩЕНИИ КВАНТА СВЕТА МОЛЕКУЛА

- 1) изменений не претерпевает
- 2) переходит в возбужденное состояние
- 3) излучает энергию
- 4) претерпевает химическое превращение

5. ПРИ ГЕМОЛИЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ ПРОИСХОДИТ

- 1) уменьшение мутности и увеличение светопропускания суспензии эритроцитов
- 2) увеличение мутности и увеличение светопропускания суспензии эритроцитов

- 3) увеличение мутности и уменьшение светопропускания суспензии эритроцитов
- 4) уменьшение мутности и уменьшение светопропускания суспензии эритроцитов

6. КОЛИЧЕСТВО ФОТОПРОДУКТОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ ВО ВРЕМЯ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ, ЗАВИСИТ ОТ

- 1) дозы облучения
- 2) интенсивности падающего света, но не времени облучения
- 3) времени облучения, но не интенсивности падающего света
- 4) произведения интенсивности падающего света на время облучения

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Раствор вещества А концентрацией 50 мМ имеет максимум спектра поглощения в области 360 нм ($\epsilon=7,2 \cdot 10^3$ л/(моль·см)). Упомянутый раствор поместили в кювету шириной 10 мм и, облучая ультрафиолетовым светом с интенсивностью 200 Лм, зарегистрировали флуоресценцию с интенсивностью 10 Лм.

Определить квантовый выход флуоресценции.

Задача 2

При облучении 50 мМ раствора вещества в кювете шириной 10 мм была зарегистрирована флуоресценция интенсивностью 5 Лм.

Определить коэффициент молярной экстинкции растворенного вещества, если квантовый выход флуоресценции составляет 2,5 %, а интенсивность падающего света – 200 Лм.

Задача 3

При облучении раствора, помещенного в кювету шириной 10 мм, ультрафиолетовым светом интенсивностью 1500 Лм, регистрировали флуоресценцию интенсивностью 5 Лм.

Определить концентрацию растворенного вещества, если коэффициент молярной экстинкции равен $2,5 \cdot 10^3$ л/(моль·см), а квантовый выход флуоресценции – 1,5 %.

ЗАНЯТИЕ 6

ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель занятия: исследовать спектр поглощения трипсина методом ультрафиолетовой спектрофотометрии.

Материалы и оборудование: спектрофотометр (ПромЭкоЛаб ПЭ-5400УФ), наборы пробирок, мерных пипеток, растворы щелочи, хлорида натрия, трипсин, ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан).

Вопросы для самоподготовки:

1. Спектры поглощения сложных веществ (белков, нуклеиновых кислот и др.).
2. Принцип метода спектрофотометрии.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В современной биофизике находят широкое применение спектральные методы изучения биологических объектов. Важную информацию о структуре биополимеров позволяет получить ультрафиолетовая (УФ) спектрофотометрия.

Основным законом абсорбционной спектрофотометрии является закон Ламберта-Бера:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (1)$$

где I – интенсивность света, вышедшего из раствора;

I_0 – интенсивность падающего света;

ε – молярный коэффициент поглощения, который характеризует поглощательную способность данного вещества;

c – концентрация раствора;

l – длина оптического пути

Таким образом, закон Бугера-Ламберта-Бера устанавливает, что интенсивность падающего света экспоненциально уменьшается в зависимости от концентрации раствора и длины оптического пути.

На практике часто используют закон Бугера-Ламберта-Бера в логарифмической форме. Для этого вводится понятие оптической плотности раствора. Оптическая плотность D представляет собой де-

сятичный логарифм отношения начальной интенсивности к интенсивности света, вышедшего из образца:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

В логарифмической форме закон Ламберта-Бера устанавливает линейную зависимость между концентрацией раствора (c) и оптической плотностью (D) при постоянной длине оптического пути:

$$D = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (3)$$

Свет разных длин волн поглощается веществом неодинаково. Зависимость оптической плотности D или молярного коэффициента поглощения (ε) от длины волны (λ) называется спектром поглощения.

Вещества могут поглощать свет в разных участках спектра. Условно весь спектральный диапазон на ультрафиолетовую, видимую и инфракрасную области. УФ-область лежит в интервале λ от 100 до 400 нм и разделяется на вакуумную (100–200 нм), среднюю (200–300 нм) и близкую (300–400 нм). Спектры поглощения белков лежат в средней УФ-области. Эмпирически найдены корреляции между химическим строением молекул и их спектрами. Наличие циклических структур с делокализованными π -электронами обуславливает поглощение УФ-света. Для белка характерно наличие двух максимумов поглощения: один – на границе вакуумной области (200–210 нм), а второй – в средней УФ-области (длинноволновый максимум поглощения). В вакуумной УФ-области поглощают все аминокислоты, а также пептидные связи. Длинноволновый максимум поглощения (240–300 нм) белков обусловлен поглощением трех ароматических аминокислот – триптофана, тирозина и фенилаланина. Поглощение света вызывает $\pi - \pi^*$ -электронными переходами в плоскости ароматического кольца.

Спектрофотометрия позволяет определять количество тирозиновых и триптофановых остатков в белках. В нейтральных растворах поглощение белка при 280 нм представляется как сумма оптических плотностей тирозина и триптофана. Поскольку максимумы спектров поглощения этих аминокислот почти совпадают, измерить содержание этих аминокислот в белке при нейтральных рН трудно. В щелочной среде (при $\text{pH} > 12$) наблюдается спектральное разделение тирозинового и триптофанового поглощения. На этом основании Гудвин и Мортон предложили метод определения содержания тирозиновых и триптофановых остатков в белке.

Метод Гудвина и Мортонa. Берется раствор белка с известной концентрацией C в 0,1 н щелочи. С помощью спектрофотометра находится оптическая плотность раствора белка на двух длинах волн 280 и 294 нм, а затем определяются молярные коэффициенты экстинкции:

$$\varepsilon_{280} = \frac{D_{280}}{c \cdot l} \quad (4)$$

$$\varepsilon_{294} = \frac{D_{294}}{c \cdot l} \quad (5)$$

Здесь l – толщина кюветы. Число молей тирозина ($M^{тир}$) и триптофана ($M^{три}$) на моль белка будет равно:

$$M^{три} = 10^{-3}(0,592\varepsilon_{294} - 0,263\varepsilon_{280}) \quad (6)$$

$$M^{тир} = 10^{-3}(0,263\varepsilon_{280} - 0,170\varepsilon_{294}) \quad (7)$$

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Измерение спектров поглощения ароматических аминокислот

Приготовить растворы в воде триптофана 0,0147 мг/мл, тирозина 0,053 мг/мл и снять их спектры поглощения в области от 210 до 320 нм через 5 нм. По полученным значениям оптических плотностей D найти молярные коэффициенты экстинкции триптофана и тирозина на 250 и 280 нм. Молекулярные массы: триптофана – 204,2; тирозина – 181,2.

Перевести растворы триптофана и тирозина в 0,1 н раствор NaOH, снять спектры поглощения и сравнить со спектрами поглощения нейтральных растворов в воде.

Задание 2. Измерение поглощение спектров поглощения трипсина

Приготовить растворы трипсина в концентрации 0,1 и 0,2 мг/мл. Снять спектр поглощения. Приготовить раствор белка в 0,1 н щелочи. Снять спектр поглощения. Определить оптическую плотность на 280 и 294 нм, а затем определить молярные коэффициенты экстинкции по приведенным выше формулам (4 и 5). Найти количество триптофановых и тирозиновых остатков по методу Гудвина и Мортонa (6 и 7). Молекулярная масса трипсина 23000.

Вопросы для самоконтроля

1. Принцип метода Гудвина и Мортонна. С какой целью используют этот метод?
2. Какие аминокислоты являются хромофорами в белках?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. УФ-ОБЛАСТЬ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ СООТВЕТСТВУЕТ ИНТЕРВАЛУ ДЛИН ВОЛН
 - 1) менее 100 нм
 - 2) 100-400 нм
 - 3) 380-740 нм
 - 4) более 740 нм
2. ДЛЯ БЕЛКОВ ХАРАКТЕРНОЕ ЧИСЛО МАКСИМУМОВ В СПЕКТРЕ ПОГЛОЩЕНИЯ РАВНО
 - 1) 1
 - 2) 2
 - 3) 3
 - 4) 4
3. ДЛИННОВОЛНОВОЙ МАКСИМУМ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКА ОБУСЛОВЛЕН ПОГЛОЩЕНИЕМ СВЕТА
 - 1) пептидными связями
 - 2) карбоксильными группами аминокислот
 - 3) аминогруппами аминокислот
 - 4) циклическими структурами с делокализованными π -электронами
4. ВАКУУМНАЯ УФ-ОБЛАСТЬ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ СООТВЕТСТВУЕТ ИНТЕРВАЛУ ДЛИН ВОЛН
 - 1) 100-400 нм
 - 2) 100-200 нм
 - 3) 200-300 нм
 - 4) 300-400 нм
5. К АРОМАТИЧЕСКИМ АМИНОКИЛОТАМ ОТНОСЯТСЯ
 - 1) триптофан
 - 2) глицин
 - 3) фенилаланин
 - 4) тирозин

6. МЕТОД ГУДВИНА И МОРТОНА ДЛЯ СПЕКТРАЛЬНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА И ТРИПТОФАНА В БЕЛКЕ ЗАКЛЮЧАЕТСЯ В

- 1) закислении раствора определяемого белка
- 2) защелачивании раствора определяемого белка
- 3) нагревании раствора белка
- 4) облучении раствора белка УФ-светом

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

В растворе присутствуют два вещества А и Б, имеющие пики спектров поглощения в области 720 нм и 650 нм соответственно. Коэффициенты молярной экстинкции вещества на пиках поглощения взаимно равны. Оптическая плотность раствора, измеренная на длине волны 650 нм, равна 1,2; на длине волны 720 нм – 0,3.

Найти концентрацию вещества А, если концентрация вещества Б составляет 50 мМ.

Задача 2

Спектр поглощения смеси двух нереагирующих веществ имеет три пика поглощения – в области 540, 610 и 700 нм. Измеренная оптическая плотность на трех названных длинах волн составила 0,28; 0,07 и 0,04 соответственно. Аналогичная смесь с концентрациями А вдвое выше и Б – втрое выше, чем в первом случае, имела оптическую плотность 0,56; 0,21 и 0,12.

Определить, сколько пиков имеет спектр поглощения вещества А.

Задача 3

В раствор в эквивалентных количествах помещены два вещества – А и Б, имеющие пики спектра поглощения в области 360 нм и 720 нм, и коэффициенты молярной экстинкции $1,2 \cdot 10^3$ и $3,8 \cdot 10^3$ л/(моль·см) соответственно. Между веществами протекает химическая реакция по уравнению $2A + 3B = B$. Образующееся вещество В имеет максимум спектра поглощения в области 640 нм.

Найти коэффициент молярной экстинкции вещества В, если после установления равновесия спектр поглощения смеси имеет два пика в областях 360 и 640 нм, а измеренная оптическая плотность на названных длинах волн – 0,12 и 0,04. Ширина кюветы – 1 см.

ЗАНЯТИЕ 7

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ БЕЛКА

Цель занятия: изучить оптические свойства растворов трипсина, модифицированных воздействием различных температур.

Материалы и оборудование: спектрофотометр (КФК-ЗКМ), кюветы, трипсин, термостат, пробирки, мерные пипетки, хим. стаканы.

Вопросы для самоподготовки:

1. Основные компоненты спектрофотометра.
2. Ультраструктура белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Наиболее удобными и доступными для изучения белков являются их спектры, в которых отражаются структурные особенности молекул (оптические свойства), например такое свойство, как опалесценция белкового раствора или раствора олигонуклеотидов. При боковом освещении таких растворов лучи света в них становятся видимыми и образуют светящийся конус – эффект Тиндаля. Объясняется это дифракцией лучей света частицами белка или олигонуклеотидов в растворе. Многие молекулы способны поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой области спектра. Это свойство можно использовать и для определения их концентраций.

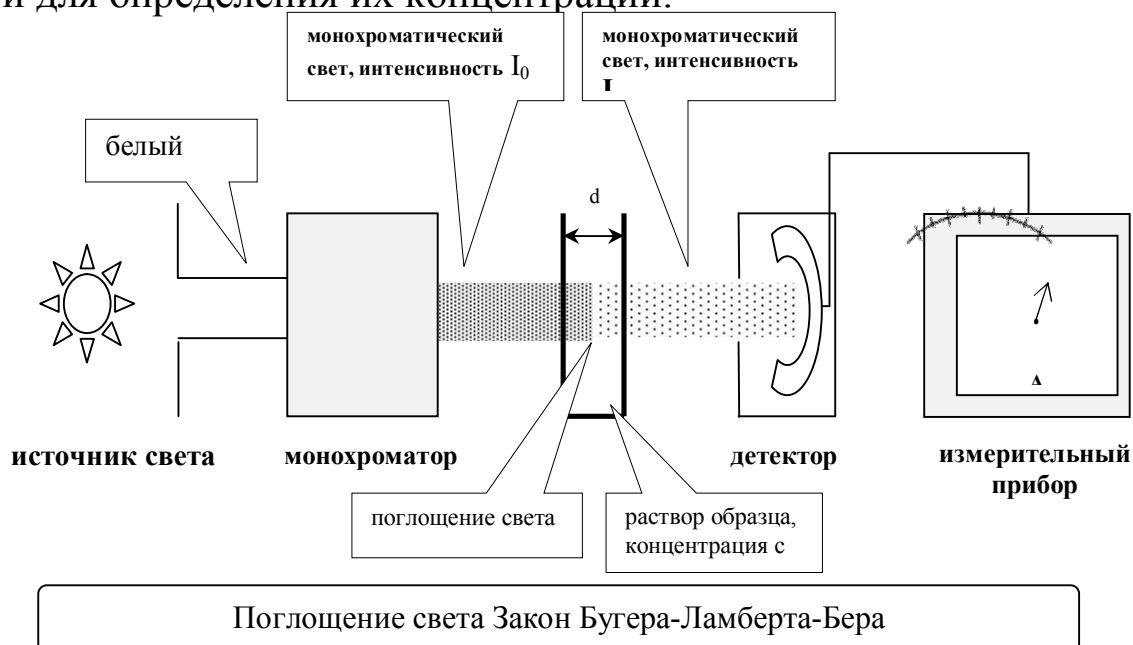


Рис. 5. Схема регистрации поглощения света молекулами в растворе на спектрофотометре

Как следует из уравнения (рис. 5), величина оптической плотности (E) пропорциональна концентрации поглощающего вещества (c), длине оптического пути луча в образце (d) и молярному коэффициенту экстинкции (ε -поглощения).

Поэтому применяют монохроматический свет, т. е. свет определенной длины волны, который можно выделить из белого света с помощью монохроматора. Монохроматический свет интенсивности (I_0) проходит через прямоугольную ячейку из стекла или кварца (кювету), в которой находится раствор поглощающего вещества. Интенсивность (I) выходящего света, ослабленного поглощением, измеряется с помощью детектора. Поглощение света раствором (обозначается буквой D или E) определяется как логарифм отношения I/I_0 . Закон Ламберта-Бера гласит, что E пропорциональна концентрации (c , моль/л) вещества и толщине (d , см) слоя раствора. Раствор с концентрацией 1 моль/л в кювете с толщиной 1 см имеет оптическую плотность, равную ε , т. е. ε численно равен поглощению 1 М раствора при длине пути света 1 см. Молярный коэффициент (ε) уже не зависит от условий измерения (c , d) и характеризует способность молекул данного вещества поглощать свет той или другой длины волны. Размерность его – л/(моль·см). Измерив оптическую плотность раствора (E) в кювете с толщиной 1 см, по значению ε можно определить концентрацию вещества в растворе по формуле:

$$c = \frac{E}{\varepsilon} \text{ (моль/л)}$$

Если толщина кюветы не равна 1 см, то

$$c = \frac{E}{\varepsilon} \cdot d \text{ (моль/л)}$$

Молярные коэффициенты многих веществ определены и приводятся в соответствующих справочных изданиях. Оптическая плотность раствора (E) зависит от длины волны измеряемого света. Кривую, выражающую эту зависимость, называют *спектром поглощения*.

Спектры поглощения однокомпонентных неокрашенных белков (сывороточный и яичный альбумины, гамма-глобулин, трипсин, пепсин и др.) располагаются в области от 200 до 290 нм, включая две полосы поглощения: одну с $\lambda_{\max} \sim 220$ нм, вторую с $\lambda_{\max} \sim 278$ нм. Полоса поглощения с $\lambda_{\max} \sim 275$ нм обусловлена поглощением энергии света электронами ароматических аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин). В области 240-300 нм главный вклад в спектр дает триптофан даже при относительно невысоком содержании в белке и в значительной степени определяет характер его спектра поглощения,

так как коэффициент молярного поглощения ϵ его индольного ядра в 4 раза превышает ϵ тирозина и почти в 30 раз – ϵ фенилаланина. Светопоглощение в самой коротковолновой области спектра (короче 220 нм) связано со светопоглощением хромофора пептидной группы белковой молекулы (рис. 6).



Рис. 6. Пептидные группы в молекуле белка

Третичная структура белка, по сравнению с его вторичной структурой, более чувствительна к внешним воздействиям, вызванным присутствием слабых окислителей и некоторых других реагентов, изменением природы растворителя, ионной силы, pH среды, температуры; воздействием облучения. Явление, при котором под действием внешних факторов разрушается нативная структура белка, называется денатурацией. Денатурацию белков можно вызвать нагреванием до $60 - 80^\circ\text{C}$ или действием других агентов, разрушающих нековалентные связи в нативной структуре белка. Денатурация происходит на поверхности раздела фаз, в щелочных или кислых средах (например, денатурация белка пищи в желудке под действием соляной кислоты), при действии ряда органических соединений – спиртов, фенолов и др. Часто для денатурирования белков используют мочевины или гуанидинхлорид. Такие вещества образуют водородные связи с амино- или карбонильными группами пептидного остова и с некоторыми группами радикалов аминокислот, подменяя собственные внутримолекулярные связи в белке, вследствие чего вторичная и третичная структуры изменяются. При денатурации утрачивается биологическая активность белков. При денатурации первичная структура белка сохраняется, поэтому денатурация может иметь обратимый характер. Процесс, обратный денатурации, называется ренативацией (рис. 7). Процесс ренативации протекает самопроизвольно, и это свидетельствует о том, что организация полипептидной цепи белка в пространстве определяется его первичной структурой.



Рис. 7. Денатурация и ренатурация белковой молекулы

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Приготовить растворы трипсина в концентрации 0,1 мг/мл.
2. Построить спектр поглощения опытного раствора в интервале длин волн 200–300 нм.
3. Найти длину волны (λ_{max}), на которую приходится максимум поглощения.
4. Нагреть термостат до необходимой температуры и поместить в него раствор белка. Выбрать любой из вариантов термостатирования:

Вариант 1. Растворы белка термостатировать при 35, 45 и 50 °С в течение 20 минут.

Вариант 2. Растворы белка нагревать при 40 °С в течение 10, 15, 30, 45 минут.

Вариант 3. Растворы белка нагревать при 50 °С в течение 5; 10; 15; 20 минут.

5. Измерить оптическую плотность термомодифицированных растворов белка.

6. Сделать выводы об оптических свойствах растворов трипсина, модифицированных воздействием различных температур; о связи оптических свойств и структуры молекулы биополимера.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается закон Бугера-Ламберта-Бера?
2. Каковы особенности спектра поглощения белков?
3. Что такое денатурация белка? Какие факторы ее инициируют?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. ЭФФЕКТ ТИНДАЛЯ – ЭТО СВЕЧЕНИЕ РАСТВОРА ВСЛЕДСТВИЕ
 - 1) дифракции света на молекулах белка

- 2) поглощения раствором света определенной длины волны
- 3) увеличения длины волны света после прохождения через раствор
- 4) излучения кванта света при переходе атомов из возбужденного состояния в основное

2. К УСЛОВИЯМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЭФФЕКТА ТИНДАЛЯ ОТНОСЯТСЯ

- 1) размер частиц среды намного меньше длины волны
- 2) низкая концентрация частиц дисперсионной фазы в коллоидной системе
- 3) показатели преломления дисперсионной фазы и дисперсионной среды отличны
- 4) размер частиц равен $1/20$ длины световой волны

3. ЗАКОНУ БУГЕРА-ЛАМБЕРТА-БЕРА СООТВЕТСТВУЕТ ЗАПИСЬ

- 1) $D = \lg \frac{I_0}{I}$
- 2) $D = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon l c$
- 3) $I = I_0 \cdot e^{-\epsilon l c}$
- 4) $\text{tg} \alpha = \epsilon l$

4. ЗНАЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ РАВНО МОЛЯРНОМУ КОЭФФИЦИЕНТУ ПОГЛОЩЕНИЯ, ЕСЛИ

- 1) интенсивности падающего и вышедшего из раствора света равны
- 2) концентрация раствора 1 моль/л, толщина слоя раствора 1 см
- 3) интенсивность света при прохождении через раствор уменьшается в 2 раза
- 4) концентрация раствора 0,001 моль/мл, толщина слоя раствора 0,01 м

5. ИЗМЕНЕНИЕ НАТИВНОЙ КОНФОРМАЦИИ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ДЕСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) декарбоксилирование
- 2) ренатурация
- 3) гидролиз
- 4) денатурация

6. ОСНОВНОЙ ВКЛАД В ХАРАКТЕР СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКА В ОБЛАСТИ 240-300 НМ ВНОСИТ

- 1) тирозин
- 2) триптофан
- 3) фенилаланин
- 4) хромофор пептидной группы белковой молекулы

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

При использовании метода дифференциальной спектрофотометрии оказалось, что интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор и раствор сравнения, относятся как 1:2. Ширина щели монохроматора, через которую шел свет в кювету с исследуемым раствором, равна 0,052 см.

Определить ширину щели монохроматора, через которую шел свет в кювету с раствором сравнения, если чувствительность спектрофотометра равна 2,0.

Задача 2

Для определения показателя поглощения сыворотки крови ее наливают в кювету и с помощью фотометра определяют, что интенсивность света, прошедшего через столлик сыворотки, уменьшается на 14 % по сравнению с интенсивностью падающего света. При прохождении через такую же толщину воды интенсивность света уменьшается на 3 %.

Вычислить показатель поглощения сыворотки, если известно, что показатель поглощения воды $2 \cdot 10^{-3} \text{ см}^{-1}$

Задача 3

Опыты по облучению мазков крови лучами рубидиевого лазера показали, что при энергии луча $0,16 \text{ Дж/см}^2$ происходит разрушение эритроцитов.

Определить, какая энергия необходима для разрушения одного эритроцита, который условно можно считать диском диаметра 8 мкм?

ЗАНЯТИЕ 8

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК

Цель занятия: исследовать влияние ультрафиолетового облучения на поверхностное натяжение липидных пленок.

Материалы и оборудование: торсионные весы, УФ-лампа, металлическое кольцо, чашки Петри, стеклянная палочка; дистиллированная вода, 0,1 % раствор олеата натрия.

Вопросы для самоподготовки:

1. Силы поверхностного натяжения в жидкостях.
2. Факторы, влияющие на поверхностное натяжение.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Исследование мономолекулярных слоев (монослоев) дает информацию о таких физических параметрах индивидуальных веществ, как поверхностное давление монослоя, молекулярная площадь вещества в монослое, зависимость поверхностного давления от молекулярной площади. Для смеси веществ можно получить информацию о смешиваемости компонентов, о стехиометрии и энергетике взаимодействий, о сродстве водорастворимых веществ к липидам.

Определяющую роль в свойствах тонких жидких пленок и капиллярных явлениях играют Ван-дер-Вальсовы взаимодействия. Под ил-дер-вальсовыми взаимодействиями понимают взаимодействия, имеющие флуктуационное электромагнитное происхождение. Для этих взаимодействий во многих случаях характерна универсальная зависимость от расстояния. Сильная зависимость Ван-дер-Вальсовых взаимодействий от расстояния обуславливает их короткодействующий характер и определяет радиус сферы молекулярного действия от нескольких ангстрем до нескольких тысяч ангстрем. Возрастание потенциала Ван-дер-Вальсовых взаимодействий вблизи поверхности конденсированной фазы означает, что молекулы в поверхностном слое обладают дополнительной энергией по сравнению с молекулами внутри жидкости. Избыток свободной энергии ΔF , приходящийся на

единицу площади поверхности раздела фаз ΔS , характеризуется коэффициентом поверхностного натяжения σ :

$$\sigma = \frac{\Delta F}{\Delta S} \quad (1)$$

Часто величину σ называют просто поверхностным натяжением. Величину σ измеряют в Дж/м² или Н/м, либо дин/см.

Свободную энергию образования границы раздела можно понимать как работу, которую необходимо затратить на перенос молекул жидкости из объема (субфазы) на поверхность раздела фаз. Силы, действующие в субфазе на определенную молекулу со стороны других молекул, скомпенсированы, тогда как на молекулу, расположенную на поверхности раздела, действуют силы притяжения только со стороны субфазы. Действием молекул, находящихся над поверхностью, можно пренебречь, так как плотность пара во много раз меньше плотности жидкости. Поэтому переход молекулы из глубины жидкости в поверхностный слой для увеличения поверхности связан с необходимостью совершения работы против действующих в поверхностном слое сил. Эта работа совершается молекулой за счет запаса ее кинетической энергии и идет на увеличение ее потенциальной энергии.

С повышением температуры различие в плоскостях жидкости и ее насыщенного пара уменьшается. В связи с этим коэффициент поверхностного натяжения уменьшается и при критической температуре он обращается в нуль. Растворенные в жидкой фазе вещества также влияют на величину поверхностного натяжения. Например, растворение солей приводит к увеличению коэффициента поверхностного натяжения. С другой стороны, существуют вещества, способные адсорбироваться на поверхности раздела фаз и значительно понижать поверхностное натяжение. Эти вещества называют поверхностно-активными (ПАВ). Поверхностно-активными веществами являются многие органические соединения в водном растворе, у которых молекулы наряду с полярными гидрофильными группами, содержат неполярные углеводородные радикалы. Изначально равномерно растворенные по всему объему в малом количестве ПАВ будут стремиться к адсорбции на границе раздела в виде монослоя. Тогда разность

$$\Delta\sigma = \sigma_0 - \sigma \quad (2)$$

(σ_0 – поверхностное натяжение для чистой воды, σ – поверхностное натяжение после адсорбции ПАВ на границе раздела) соответствует поверхностному давлению монослоя.

Структура липидов, составляющих мембрану, в значительной степени оказывает влияние на механические свойства мембраны: вязкость, поверхностное натяжение, определяющие прочность мембраны и ее стойкость к внешним воздействиям (изменение осмотического давления и т. д.). Также известно, что под влиянием ультрафиолетового облучения ненасыщенные жирные кислоты подвергаются окислительным превращениям с образованием разнообразных продуктов. Результаты таких превращений зависят от наличия в молекуле двойных связей, их расположения. Такие изменения, естественно, приведут к изменениям характера и сил межмолекулярного взаимодействия между углеводородными цепочками молекул. Хорошей моделью для исследования таких воздействий могут служить мономолекулярные пленки, которые можно получить, если поместить на поверхность воды небольшое количество жирной кислоты. Растекаясь по поверхности воды, молекулы ориентируются полярными головками к поверхности воды, а гидрофобными цепочками – в воздух. Для измерения поверхностного натяжения пленки можно использовать *метод «отрыва кольца»*.

Метод отрыва кольца основан на том, что поверхностное натяжение можно также определить как силу, действующую на единицу длины контура поверхности раздела фаз и стремящуюся сократить эту поверхность до минимума. Направлена сила поверхностного натяжения по касательной к поверхности жидкости, перпендикулярно к участку контура, на который она действует.

Величину поверхностного натяжения экспериментально можно определить по силе отрыва кольца, образующего контур по формуле:

$$\sigma = \frac{P - P_0}{2\pi r} \quad (3)$$

где P – вес кольца, [Н], измеренный в момент отрыва; P_0 – абсолютный вес кольца [Н]; r – наружный радиус кольца, [м].

Поскольку весы отградуированы в единицах массы, поэтому формулу (3) удобно привести к виду:

$$\sigma = \frac{g(m - m_0)}{2\pi r} \quad (3a)$$

где g – ускорение свободного падения, равное $9,81 \text{ м/с}^2$; m и m_0 – показание весов в момент отрыва и абсолютная масса соответственно, [кг].

Измерение поверхностного натяжения жидкостей методом отрыва кольца производится при помощи торсионных весов. Для этого легкое металлическое кольцо, подвешенное к торсионным весам, приводится в соприкосновение с поверхностью исследуемой жидкости. Затем увеличивают силу натяжения подвески, медленно поворачивая рычаг натяжения, и фиксируют показания весов в момент отрыва кольца. Значение силы в момент отрыва кольца отражает значение поверхностного натяжения.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Определение поверхностного натяжения воды

1. Подготовить торсионные весы для проведения измерений. Для этого весы устанавливают при помощи опорных винтов так, чтобы пузырек уровня был отцентрирован. Тщательно очищенное металлическое кольцо подвешивают за дужку на крючок коромысла торсионных весов. Рычаг весов переводят в положение «открыто». Отсчетную стрелку устанавливают на 0, контрольную стрелку совмещают с контрольным штрихом.

2. Чистую чашку заполняют дистиллированной водой и устанавливают ее на подъемном столике. При помощи подъемного механизма поднять чашку до тех пор, пока поверхность жидкости не соприкоснется с кольцом. При этом не следует допускать утапливания кольца. Отсчетную стрелку вращать до тех пор, пока кольцо не оторвется от поверхности жидкости. Следует внимательно наблюдать за кольцом, и движение отсчетной стрелки прекращать именно в момент отрыва. Полученный результат (P) занести в протокол.

3. Рассчитать коэффициент поверхностного натяжения по формуле:

$$\sigma = \frac{P \cdot 981 \cdot 10^{-5}}{2\pi r},$$

где σ – коэффициент поверхностного натяжения; P – сила отрыва кольца (г), r – радиус кольца (м).

Задание 2. Изучение влияния поверхностно-активных веществ на поверхностное натяжение воды

Коэффициент поверхностного натяжения различных жидкостей (σ_x) определяется по формуле:

$$\sigma_x = \sigma_{H_2O} \cdot Q$$

При этом

$$Q = Q_x K - K + 1,$$

где Q – относительное поверхностное натяжение данной жидкости.

$$Q = \frac{P_x}{P_{H_2O}},$$

где Q_x – отношение силы отрыва кольца от данной жидкости к силе отрыва кольца от воды;

P_x – сила отрыва кольца от данной жидкости;

P_{H_2O} – сила отрыва кольца от данной жидкости;

K – эмпирическая константа, определяемая для каждого кольца экспериментально.

Для определения K необходимо измерить силу отрыва кольца от воды (P_{H_2O}) и любой другой жидкости (P_0), для которой известен коэффициент поверхностного натяжения (σ_0). Чаще всего для этой цели используют 96⁰ этиловый спирт ($\sigma_0 = 22,27 \cdot 10^{-3}$ н/м).

$$K = \frac{\frac{\sigma_0}{P_0} - 1}{\frac{\sigma_{H_2O}}{P_{H_2O}} - 1}$$

После определения эмпирической константы сформировать на поверхности воды пленку из олеата натрия, измерить силу отрыва кольца от поверхности жидкости и произвести расчеты коэффициента поверхностного натяжения исследуемой жидкости по предложенным выше формулам.

Задание 3. Изучение влияние различных режимов УФ-облучения на поверхностное натяжение липидных пленок

1. Сформировать 2 образца липидных пленок на поверхности воды. Рассчитать величину поверхностного натяжения для полученных образцов пленок.

2. Для изучения действия УФ-облучения провести следующие эксперименты:

а) сформированные на воде липидные пленки облучить в течение 5 и 15 минут и измерить поверхностное натяжение образцов пленок;

б) поместить на 2 предметных стекла по капле олеата натрия и облучить в течение 5 и 15 минут, после чего сформировать из них на поверхности воды пленки и измерить их поверхностное натяжение;

в) результаты экспериментов занести в таблицу 5:

Таблица 5

Время облучения (мин)	Коэффициент поверхностного натяжения (σ_x), пленка олеата натрия на воде	Коэффициент поверхностного натяжения (σ_x), олеат натрия в капле
0		—
5		
15		

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается свойство амфифильности липидов?
2. Что такое поверхностно-активные вещества, как они влияют на поверхностное натяжение жидкости?
3. В чем принцип метода «отрыва кольца»?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. ВАН-ДЕР-ВААЛЬСОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) электростатическими
- 2) гидрофобными
- 3) ковалентными
- 4) ионными

2. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ИМЕЕТ ЕДИНИЦУ ИЗМЕРЕНИЯ

- 1) дин/см
- 2) Н·м/с
- 3) Н/м
- 4) Дж/м²

3. УФ-ОБЛАСТЬ ИЗЛУЧЕНИЯ СООТВЕТСТВУЕТ ИНТЕРВАЛУ ДЛИН ВОЛН

- 1) менее 100 нм
- 2) 100-400 нм
- 3) 380-740 нм
- 4) более 740 нм

4. ПРИ ПОВЫШЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ КОЭФФИЦИЕНТ ПОВЕРХНОСТНОГО НАТЯЖЕНИЯ

- 1) увеличивается
- 2) уменьшается
- 3) остается без изменений

5. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ПРИ ДЕЙСТВИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

- 1) увеличивается
- 2) уменьшается
- 3) остается без изменений

6. МОЛЕКУЛЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЯВЛЯЮТСЯ

- 1) гидрофильными
- 2) гидрофобными
- 3) амфифильными
- 4) нерастворимыми в воде

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Для ослабления роста бактерий в каком-либо веществе его облучают УФ-лучами с длиной волны 254 нм. Интенсивность облучения равна $3 \cdot 10^{-4}$ Вт/см².

Определить, какое количество фотонов попадает при 5-минутном облучении поверхности вещества площадью 150 см²?

Задача 2

Ультрафиолетовые лучи в области 280 нм поглощаются протоплазмой, а в области 254 нм оказывают действие на ядро клетки.

Определить энергии фотонов, соответствующие этим длинам волн.

Задача 3

Некоторые фотобиологические реакции связаны с диссоциацией молекул воды под действием света. Для диссоциации молекулы воды необходима энергия 12,6 эВ.

Определить, какова длина волны света, вызывающего эту реакцию?

ЗАНЯТИЕ 9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ

Цель занятия: определить концентрации хлорофиллов а, в и каротиноидов в растительных препаратах и установить зависимость поглощения света от концентрации пигмента в растворе.

Материалы и оборудование: спектрофотометр (ПромЭкоЛаб ПЭ-5400УФ), аналитические весы, ножницы, фарфоровые чашки с пестиком, пробирки (20 шт.), пипетки объемом 1 и 2 мл (2 шт.), мерный цилиндр на 10 мл, колбочки на 50 или 100 мл (8 шт.), воронки, фильтровальная бумага, карандаш по стеклу, ацетон (80 %).

Вопросы для самоподготовки:

1. Спектры поглощения сложных веществ
2. Строение и механизмы функционирования хлорофиллов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Изучение веществ по их спектрам поглощения широко используется для наблюдения за ходом превращений химических соединений непосредственно в клетках и тканях, не нарушая их целостности. Так как поглощение света связано с векторными переходами между энергетическими уровнями в молекулах, определение спектров поглощения позволяет судить о строении молекул, состоянии веществ в биологических структурах и их ближайшем окружении.

Принцип спектрофотометрического анализа основан на свойстве вещества поглощать свет определенных длин волн, характерных для данного типа соединений. Процесс поглощения кванта света молекулой вещества можно схематически представить в виде перехода молекулы из основного невозбужденного (синглетного) состояния (S_0) в возбужденное состояние с более высоким уровнем энергии (S_1 или S_2), причем энергия поглощенного кванта света будет равна разности уровней возбужденного и основного состояний молекулы (рис. 8). На рисунке такой переход обозначен стрелкой, длина которой равна энергии кванта света $E=h\nu$ (h – постоянная Планка; ν – частота световой волны). Поскольку возбужденные состояния молекул различают-

ся по энергиям, возможны различные переходы молекул из основного в возбужденные уровни. Из квантов света с различными энергиями могут поглощаться только те, у которых энергия ($E=h\nu$) будет соответствовать энергиям переходов между какой-либо парой уровней в молекуле данного вещества. Участие атомов, составляющих сложные органические молекулы, в колебательном и вращательном движении, наряду с указанными электронными уровнями, вызывает появление множества подуровней. В соответствии с этим при поглощении света сложными молекулами возбуждаются многие электронно-колебательные переходы. Вместе с поглощением молекулой квантов с частотой ν_0 (чисто электронный переход 0 – 0) будут поглощаться кванты с близкими значениями частот (0–1, 0–2 и т. д.), и поглощение определится в некотором диапазоне частот около ν_0 . Поэтому, в отличие от линейных спектров атомов, для сложных молекул обычно характерны широкополосные спектры.

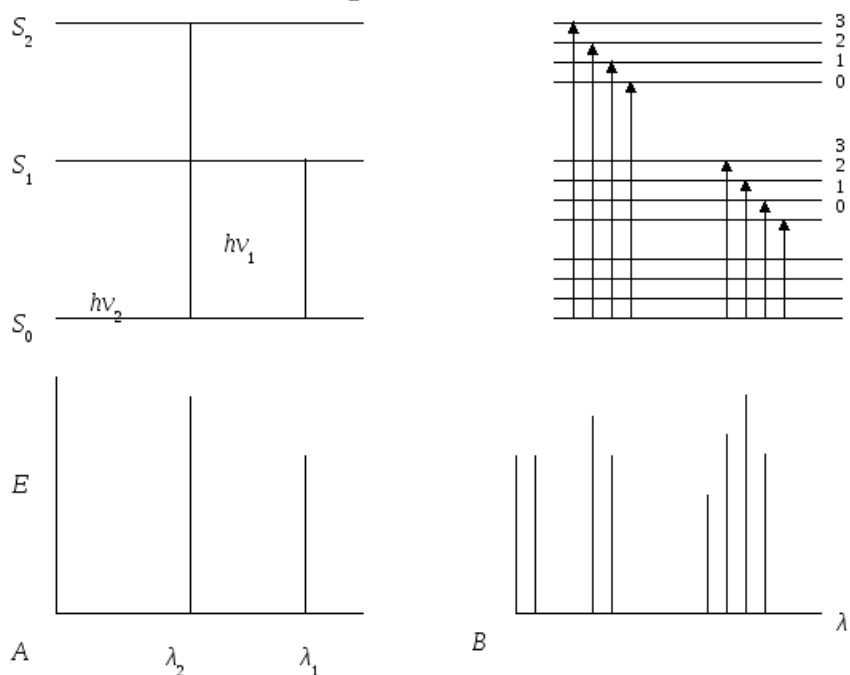


Рис. 8. Переходы между энергетическими уровнями при поглощении света

Интенсивность полос поглощения определяется вероятностью перехода молекул из основного состояния в данное возбужденное состояние. Зависимость вероятности поглощения от частоты или длины волны света называется спектром поглощения. Длина световой волны и ее частота связаны соотношением:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

где λ – длина волны; ν – частота; c – скорость света.

Для измерения спектров поглощения необходимы источники света с непрерывным спектром излучения, так как необходим весь набор длин волн света в интересующей нас области (в ультрафиолетовой области используется водородная лампа, в видимой – лампа накаливания). Практически определение спектров поглощения сводится к оценке доли излучения, поглощенной в объеме определенной толщи для разных длин волн. Поглощительная способность того или иного вида молекул в зависимости от длины волны света (т. е. спектр поглощения) определяется молярным коэффициентом поглощения (коэффициентом экстинкции), который можно найти из закона Бугера-Ламберта-Бера.

Существует несколько видов записи спектров поглощения: если необходимо знать относительное количество квантов, поглощенных образцом при разных длинах волн, то целесообразно использовать спектр $(1-T)$ (величина поглощения). Для определения концентрации вещества, оценки поглощительной способности молекул, их спектроскопических характеристик обычно находят спектр D (оптическая плотность), поскольку форма последнего не зависит от концентрации. Спектры поглощения D и $(1-T)$ совпадают по форме только при малом поглощении.

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

Форма спектра поглощения зависит от типа вещества, его состояния, характера молекулярного окружения (например, растворителя). Восстановление, окисление молекул, их агрегация, комплексообразование, водородные связи, изомеризация, измерение полярности (гидрофобности) окружения существенно сказываются на спектрах поглощения, что позволяет делать определенные выводы о характере состояния исследуемых веществ, конформации молекул и т. д.

По измеренной на спектрофотометре оптической плотности D при известных ε и l можно вычислить концентрацию вещества $c = \frac{D}{\varepsilon l}$. Обычно оптическую плотность измеряют при длине волны, соответствующей максимуму поглощения.

Если в исследуемом объеме имеется несколько веществ, поглощающих свет в одной и той же спектральной области, то для каждой длины волны:

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

где D_A и D_B – оптические плотности для веществ A и B смеси; D_{AB} – оптическая плотность смеси при данной длине волны.

Для пропускания (T):

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

где T_A и T_B – величины пропускания для веществ A и B смеси; T_{AB} – величина пропускания смеси при данной длине волны.

Существует целая группа фотобиологических процессов, смысл которых заключается в синтезе биологически важных соединений за счет поглощения организмом солнечной энергии. К ним, в частности, относится фотосинтез у зеленых растений, бактерий и водорослей. Фотосинтез – единственный биологический процесс, в ходе которого происходит увеличение свободной энергии системы (около 502 Дж). Все другие осуществляются за счет потенциальной энергии, накапливаемой в фотосинтезирующих организмах при поглощении квантов излучения. Важным компонентом фотосинтетического аппарата являются хлорофиллы и каротиноиды. Для каждого вида растений характерен свой пигментный состав.

Хлорофиллы обуславливают зеленую окраску растений и локализованы во внутриклеточных органеллах (хлоропластах или хромофорах) в виде пептидных комплексов. Хлорофиллы относятся к металлопорфиринам и представляют собой производные порфина, молекулы которых содержат циклопентановое кольцо, конденсированное с порфириновым макроциклом, центральный атом Mg, и различные заместители (рис. 9).

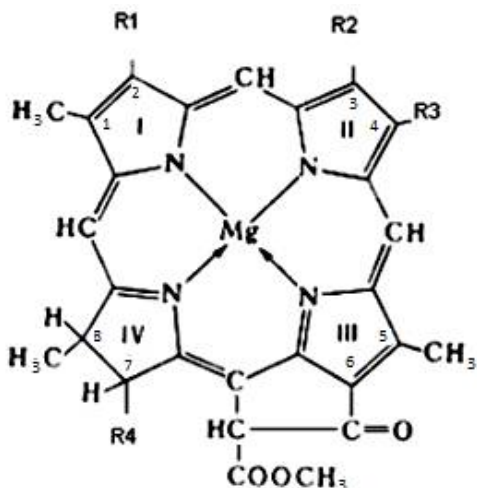


Рис. 9. Строение хлорофиллов: а) хлорофилл a : $R^1 = \text{CH}-\text{CH}_2$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$; б) хлорофилл b : $R^1 = \text{CH}=\text{CH}_2$, $R^2 = \text{CHO}$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$

Из высших растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий выделено и структурно охарактеризовано свыше 50 различных хлорофиллов. Основные пигменты высших растений и зеленых водорослей – хлорофиллы a и b . Основа

этих хлорофиллов – дигидропорфириновый (хлориновый) цикл, содержащий в качестве эфирных групп (Y) остаток спирта фитола. При общем содержании хлорофиллов 0,7–1,1 г на 1 кг зеленой массы растений соотношение хлорофиллов *a* и *b* обычно составляет 3:1 (в зависимости от освещенности, наличия удобрения и других факторов может колебаться от 2:1 до 3,4:1, что используется для контроля за развитием растений).

От состояния пигментов и их состава зависит полнота улавливания солнечной энергии. Поэтому, изучив физико-химические свойства пигмента, можно судить о фотосинтезирующей способности растения.

Синий максимум в абсорбционном спектре хлорофиллов проявляется благодаря замкнутой системе сопряженных связей в молекуле хлорофилла. Положение красного максимума вызвано гидрированием связи между атомами углерода в положениях 7 и 8. Атом магния в молекуле хлорофилла илли вает поглощение в красной области спектра и снижает – в зеленой. Присутствие в молекуле каротиноидов большого количества сопряженных связей объясняет поглощение ими сине-фиолетовых лучей. Необходимо отметить, что максимум поглощения пигментов в живых тканях сдвинут в длинноволновую сторону. Величина сдвигов зависит от состояния пигментов – степени агрегации молекул и связи их с белками. Определение оптических свойств пигментов составляет основу качественного и количественного анализа этих соединений.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 1. Определение концентрации хлорофиллов *a* и *b* в экстрактах из зеленых листьев

Измельчить ножницами 300 мг листьев исследуемого растения, поместить их в ступку и залить 6 мл 80 % ацетона. Тщательно растереть полученную кашицу и профильтровать на воронке через бумажный фильтр. Приготовленная вытяжка не должна содержать никаких взвесей или быть мутной. В противном случае экстракт нужно профильтровать вторично. Полученный экстракт развести 80 %-м ацетоном в соотношении 1:2 с тем, чтобы максимум поглощения при 680 нм был наполовину или немного больше ширины диаграммы в шкале *D*. Определить спектр поглощения этого раствора в прямоугольной кювете толщиной 1 см.

Известно, что поглощение в красной области спектра 600–700 нм определяется поглощением хлорофиллов a и b . Для хлорофилла b в 80 % ацетоне максимум поглощения равен 640, для хлорофилла a – примерно 662 нм. Используя свойство аддитивности оптических плотностей при длинах волн 649 и 665 нм и осуществив перевод молярных коэффициентов экстинкции, известных из таблиц, в удельные, получим систему уравнений Вернона с учетом толщины кюветы (1 см):

$$\begin{aligned} C_{\text{хл. } a} &= 11,63D_{665} - 2,39D_{649} \\ C_{\text{хл. } b} &= 20,11D_{649} - 5,18D_{665} \end{aligned}$$

Подставив в уравнения значения D_{649} и D_{665} , взятые из найденного спектра поглощения, определить концентрацию хлорофиллов a и b (в миллиграммах на литр) в данном разведении.

Зная концентрации хлорофиллов a и b и измерив оптическую плотность при 452 нм, можно рассчитать концентрацию каротиноидов по формуле:

$$C_x = 4,75D_{452,5} - 0,226(C_{\text{хл. } a} + C_{\text{хл. } b})$$

Вычислить, в каких пределах в анализируемых растениях варьирует содержание исследуемых пигментов.

Задание 2. Изучение зависимости поглощения от концентрации вещества

Приготовить ацетоновую вытяжку (см. задание 1). Довести раствор до 10 мл 80 % ацетоном и разделить на две части: по 7 и 3 мл. Первую оставить без изменения, а вторую развести в 2, 4, 8, 16 и 32 раза по следующей схеме:

смесь 1: 3 мл вытяжки + 3 мл ацетона (разведение в 2 раза);

смесь 2: 3 мл смеси 1 + 3 мл ацетона (разведение в 4);

смесь 3: 3 мл смеси 2 + 3 мл ацетона (разведение в 8);

смесь 4: 3 мл смеси 3 + 3 мл ацетона (разведение в 16 раз);

смесь 5: 3 мл смеси 4 + 3 мл ацетона (разведение в 32 раза).

Обратить внимание на тщательность приготовления разведений, поскольку это влияет на точность построения зависимости поглощения от концентрации вещества.

Установить на спектрофотометре длину волны 662 нм. Определить величину оптических плотностей D_{662} и пропусканий T_{662} для исходного раствора и разведений в прямоугольной кювете. В качестве контроля использовать кювету с раствором (80 % ацетона) или воздух.

Построить графики зависимости $D=f(c)$ и $(1-T)=f(c)$. График строится с учетом концентрации, выраженной в долях c_0 (исходная, или нулевая): $1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, c_0$.

Сравнить концентрации, для которых сохраняется линейность по оптической плотности и поглощению $(1-T)$.

Установить, применим ли закон Ламберта-Бера в данном случае.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое спектр поглощения?
2. От каких факторов зависит форма спектра поглощения?
3. Каковы особенности строения фотосинтетических пигментов?

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один или несколько правильных вариантов ответов.

1. ДЛИНА СВЕТОВОЙ ВОЛНЫ И ЕЕ ЧАСТОТА СВЯЗАНЫ СООТНОШЕНИЕМ

- 1) $\lambda = \frac{v}{c}$
- 2) $\lambda = vc$
- 3) $\lambda = \frac{c}{v}$
- 4) $\lambda = v + c$

2. СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ D (ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ) и $(1-T)$ (ВЕЛИЧИНА ПОГЛОЩЕНИЯ) ПО ФОРМЕ

- 1) различаются
- 2) совпадают только при малом поглощении
- 3) совпадают только при большом поглощении
- 4) совпадают при любой величине поглощения

3. СПЕКТР, ПОСТРОЕННЫЙ ПО ВЕЛИЧИНЕ ПОГЛОЩЕНИЯ $(1-T)$, ОБЫЧНО ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- 1) относительного количества квантов, поглощенных образцом
- 2) концентрации вещества
- 3) оптической плотности раствора

4. МАКСИМУМ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА, ЛЕЖАЩИЙ В СИНЕЙ ОБЛАСТИ, ОБУСЛОВЛЕН

- 1) присутствием в молекуле атома магния
- 2) наличием сопряженных связей
- 3) гидрированием связи между атомами углерода в положениях 7 и 8
- 4) гидратированием двойных связей

5. МАКСИМУМ СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ ХЛОРОФИЛЛА, ЛЕЖАЩИЙ В КРАСНОЙ ОБЛАСТИ, ОБУСЛОВЛЕН

- 1) присутствием в молекуле атома магния
- 2) наличием сопряженных связей
- 3) гидрированием связи между атомами углерода в положениях 7 и 8
- 4) гидратированием двойных связей

6. ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ СВОБОДНАЯ ЭНЕРГИЯ СИСТЕМЫ

- 1) увеличивается
- 2) уменьшается
- 3) остается неизменной

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ

Задача 1

Интенсивность флуоресценции триптофана в 10^{-6} М растворе сывороточного альбумина человека, содержащего 17 остатков тирозина на молекулу, составляет 10 единиц.

Определить, чему равна интенсивность флуоресценции триптофана при увеличении концентрации альбумина на порядок, если люминисценция возбуждается при 280 нм, при этом молярный показатель поглощения тирозина равен 5000 л/(моль·см), а толщина кюветы составляет 1 см?

Задача 2

В раствор был добавлен тушитель флуоресценции в концентрации 10^{-3} М, а реакция тушения идет по синглетному типу.

Определить, во сколько раз уменьшится интенсивность флуоресценции триптофана в сывороточном альбумине человека.

Задача 3

Известно, что солнечный свет регулирует развитие растений, действуя на фитохром в узле кущения, на пути ($l=8$ см) свет ослабляется в 20 раз ($I_0/I=20$).

Определить коэффициент поглощения в стеблях растений.

ЭТАЛОНЫ ОТВЕТОВ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

ЗАНЯТИЕ 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРМАНГНАТ-ИОНОВ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	3)	4.	2)
2.	4)	5.	3)
3.	3), 4)	6.	2)

ЗАНЯТИЕ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО РАСТВОРА МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1), 2), 3)	4.	4)
2.	2)	5.	4)
3.	2), 3), 4)	6.	4)

ЗАНЯТИЕ 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПОГЛОЩЕНИЯ ОКРАШЕННЫХ РАСТВОРОВ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	2)	4.	1)
2.	2)	5.	4)
3.	3)	6.	2)

ЗАНЯТИЕ 4. ИЗУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1), 2), 3), 4)	4.	4)
2.	1), 2), 3)	5.	2), 3)
3.	1), 3)	6.	1), 2), 3)

ЗАНЯТИЕ 5. ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1), 2), 3), 4)	4.	2)
2.	1)	5.	1)
3.	1), 3), 4)	6.	1), 4)

ЗАНЯТИЕ 6. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	2)	4.	2)
2.	2)	5.	1), 3), 4)
3.	4)	6.	2)

ЗАНЯТИЕ 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ БЕЛКА

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1)	4.	2), 4)
2.	1), 2), 3)	5.	4)
3.	2), 3)	6.	2)

ЗАНЯТИЕ 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	1)	4.	2)
2.	1), 3), 4)	5.	2)
3.	2)	6.	3)

ЗАНЯТИЕ 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ

№ задания	№ ответа	№ задания	№ ответа
1.	3)	4.	2)
2.	2)	5.	2)
3.	1)	6.	1)

ОТВЕТЫ К СИТУАЦИОННЫМ ЗАДАЧАМ

ЗАНЯТИЕ 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРМАНГНАТ-ИОНОВ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

Задача 1

Концентрация раствора равна 1 %.

Задача 2

Концентрация вещества в растворе равна 0,002 моль/л.

Задача 3

Молярный коэффициент поглощения $\epsilon=1500$ л/(моль·м).

ЗАНЯТИЕ 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО РАСТВОРА МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ

Задача 1

Показатель поглощения $k_\lambda=2,51$ м⁻¹

Задача 2

Показатель поглощения $k_\lambda=0,104$ см⁻¹; толщина стеклянной пластинки $l_{0,5}=6,7$ см

Задача 3

$D=D_1+D_2$

ЗАНЯТИЕ 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПОГЛОЩЕНИЯ ОКРАШЕННЫХ РАСТВОРОВ

Задача 1

Интенсивность света уменьшится в 8 раз

Задача 2

Показатель рассеяния (m) равен 0,067 см⁻¹

Задача 3

Показатель поглощения (k_2) равен 0,016 см⁻¹

ЗАНЯТИЕ 4. ИЗУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА

Задача 1

Толщина слоя плазмы крови (l) равна 1,3 см.

Задача 2

Интенсивность света уменьшится в 240 раз.

Задача 3

Концентрация раствора (C) $\approx 65,6$ ммоль/л.

ЗАНЯТИЕ 5. ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Задача 1

Квантовый выход флуоресценции равен 0,012 (или 1,2 %).

Задача 2

Коэффициент молярной экстинкции равен 8,7 л/(моль·см).

Задача 3

Концентрация растворенного вещества (С) $\approx 0,039$ мМ/л.

ЗАНЯТИЕ 6. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ

Задача 1

Концентрация вещества (А) равна 12,5 мМ/л.

Задача 2

Спектр поглощения вещества (А) имеет один пик.

Задача 3

Коэффициент молярной экстинкции вещества (В) равен $0,4 \cdot 10^3$ л/моль·см.

ЗАНЯТИЕ 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ БЕЛКА

Задача 1

Ширина щели монохроматора (s_0) равна 0,037 см.

Задача 2

Показатель поглощения сыворотки (χ) равен $0,01 \text{ см}^{-1}$

Задача 3

Энергия $\epsilon \approx 8 \cdot 10^{-8}$ Дж.

ЗАНЯТИЕ 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК

Задача 1

Количество фотонов (N) равно $1,7 \cdot 10^{19}$.

Задача 2

Энергии фотонов (E_1 и E_2) равны 4,4 эВ и 4,9 эВ соответственно.

Задача 3

Длина волны (λ) равна 98 нм.

ЗАНЯТИЕ 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ

Задача 1

Интенсивность флуоресценции I равна 9,9 ед.

Задача 2

Интенсивность флуоресценции I уменьшится в 1000 раз

Задача 3

Коэффициент поглощения $\chi \approx 0,374 \text{ см}^{-1}$.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

ОСНОВНАЯ

1. Антонов В. Ф. Физика и биофизика [Текст]: курс лекций для студентов медицинских вузов : учебное пособие для студентов медицинских вузов / В. Ф. Антонов, А. В. Коржуев. – 3-е изд., перераб. И доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 240 с.
2. Лекции по биофизике [Текст]: учебное пособие для студентов / М. Б. Баскаков [и др.] – Томск : Сибирский государственный медицинский университет, 2009. – 200 с.
3. Самойлов В. О. Медицинская биофизика: [Текст]: учебник для вузов / В. О. Самойлов. – 2-е изд., доп. – СПб – СпецЛит, 2007. – 560 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

1. Методы эмиссионного спектрального анализа в биофизике [Текст]: учебное пособие для студентов / М. Б. Баскаков [и др.] – Томск : Сибирский медицинский университет, 2006. – 82 с.
2. Сидоренко В. М. Молекулярная спектроскопия биологических объектов [Текст]: учебное пособие для вузов / В. М. Сидоренко. – М. : Высшая школа, 2004. – 191 с.

Содержание

Введение	3
Занятие 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПЕРМАНГАНАТ-ИОНОВ В РАСТВОРЕ МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ	4
Занятие 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЕДИНЕНИЙ В СОСТАВЕ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО РАСТВОРА МЕТОДОМ ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРИИ	10
Занятие 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЯРНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПОГЛОЩЕНИЯ ОКРАШЕННЫХ РАСТВОРОВ	18
Занятие 4. ИЗУЧЕНИЕ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА	23
Занятие 5. ФОТОДИНАМИЧЕСКИЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ	28
Занятие 6. ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ БЕЛКОВ	35
Занятие 7. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТВОРОВ БЕЛКА	40
Занятие 8. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПЛЕНОК.....	46
Занятие 9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ПО СПЕКТРАМ ПОГЛОЩЕНИЯ	53
Эталоны ответов к тестовым заданиям	59
Ответы к ситуационным задачам	61
Рекомендуемая литература	65

Учебное издание

Авторы:

профессора кафедры биофизики и функциональной диагностики
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

д-р мед. наук **С. В. Гусакова**

д-р биол. наук **И. В. Петрова**

д-р мед. наук **А. В. Носарев**

д-р мед. наук **И. В. Ковалев**

ассистенты кафедры биофизики и функциональной диагностики
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России

канд. мед. наук **Л. В. Смаглий**

Ю. Г. Бирулина

Руководство к практическим занятиям по квантовой биофизике

Учебно-методическое пособие

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8(382-2) 51-41-53
E-mail: otd.redactor@ssmu.ru
Корректор И. А. Зеленская

Подписано в печать 15.03.2016 г.
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать ризограф. Гарнитура «Times». Печ. лист 4,125
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в производственном отделе издательства
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2