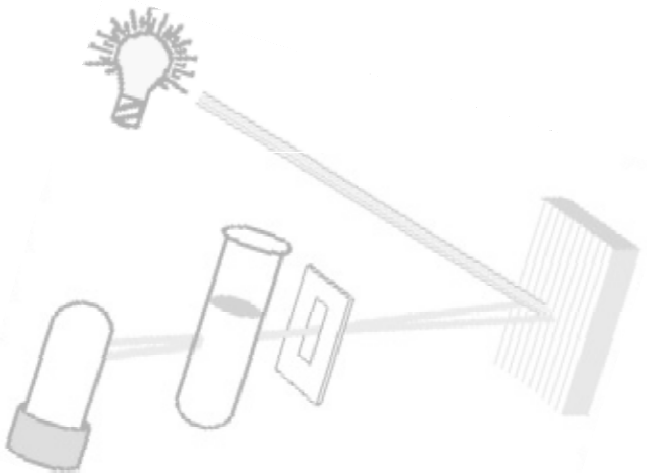
თამაზ მძინარაშვილი



აბსორბციული სპექტროფოტომეტრია ბიოფიზიკაში

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თამაზ მძინარაშვილი

აბსორბციული სპექტროფოტომეტრია ბიოფიზიკაში

უნივერსიტეტის
გამომცემლობა

ნაშრომი ეძღვნება მაკრომოლეკულების სტრუქტურების შესწავლი-სათვის ერთერთ მნიშვნელოვან და სასარგებლო ფიზიკურ მეთოდს, კერძოდ აბსორბციული სპექტროფოტომეტრიას. წარმოდგენილ მასალაში ლაკონურადაა ჩამოყალიბებული მეთოდის ძირითადი არსი და და მუშაობის პრინციპი, მოყვანილია აგრეთვე თანამედროვე სპექტროფოტომეტრების ბლოკსქემების აღწერა და მოქმედების პრინციპები. ამასთანავე განხილულია აბსორბციული სპექტრისკოპიის გამოყენების მარტივი მაგალითები.

ნაშრომი დაეხმარება ბიოფიზიკით დაინტერესებულ ბაკალავრიატის, მაგისტრატურის და დოქტორანტურის სტუდენტებს სწრაფად აითვისონ ნაშრომში წარმოდგენილი ხელსაწყო და შეძლონ პრაქტიკულად გამოიყენონ სამეცნიერო კვლევების წარმოებისას.

რედაქტორი: ნ ი ნ ო შ ე ნ გ ე ლ ი ა

რეცენზენტები: მარიამ ხვედელიძე, ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი
წამლის გადამტანი ნანონაწილაკების განყოფილების გამგე
გრიგოლ მამნიაშვილი - ფიზიკის აკადემიური დოქტორი

შესავალი

ოპტიკური შთანთქმის სპექტროსკოპია წარმოადგენს ბიომოლეკულების ფიზიკო-ქიმიური ანალიზის ერთ-ერთი უძველეს მეთოდს. მეთოდის მოქმედების პრინციპი მარტივია – გარკვეული ტალღის სიგრძის ფოტონები ეჯახება რა საკვლევ მოლეკულას, ახდენს ურთიერთქმედებას მასთან, რომლის შედეგის მიხედვით შეგვიძლია ვიმსჯელოდ შესასწავლი მოლეკულის თვისებებზე. თუ მოლეკულა შთანთქავს სინათლის ტალღას, მაშინ შთანთქმული ენერგიის სიდიდის და ხასიათის მიხედვით შესაძლებელია ვიმსჯელოთ ამ მოლეკულის ბევრი თვისებების შესახებ.

როგორც ვიცით ბიოლოგიური წარმომავლობის მოლეკულებს განეკუთვნება დიდი ზომის მოლეკულები, ანუ ისეთი მოლეკულები რომელთა გეომეტრული ზომები, შესაბამისად მათი მოლეკულური მასა სხვა მოლეკულებზე გაცილებით მეტია. ასეთი ბიოლოგიური მოლეკულებია ცილები, ნუკლეინის მჟავები, პოლისაქარიდები, ლიპიდები და სხვა. ამ მოლეკულებს ხშირად ეძახიან ბიომაკრომოლეკულებსაც ან ბიოპოლიმერებს.

სინათლის ფოტონი, რომელიც ხსნარში მოძრაობისას დაეჯახება ბიომაკრომოლეკულას, შედეგად შეიძლება მოხდეს მისი ენერგიის შთნთქმა მოლეკულის მიერ. შთანთქმის ხასიათის მიხედვით შესაძლებელია იდენტიფიცირება გაუკეთდეს მაკრომოლეკულის შემადგენლობაში არსებული ქიმიურ ჯგუფებს ან კომპონენტებს (მაგალითად, ცილებისთვის ამინომჟავებს). გარდა ამისა შთათქმის სიდიდის და ხასიათის მიხედვით შესაძლებელია განისაზღვრული იყოს მაკრომოლეკულის სივრცული სტრუქტურა და იმ გარემოცვის ბუნება, რამელშიც ეს მოლეკულა იმყოფება. აღსანიშნავია,

რომ ბიოლოგიური მაკრომოლეკულებს შესახებ სამივე ზემოთმოყვანილი ინფორმაციის ცოდნა მნიშვნელოვანია მაკრომოლეკულის უჯრედში ფუნ-ქციონირების შესაძლებლობის გარკვევაში. ამდენად სპექტროფოტომეტრის მეთოდი ამ თვალსაზრისითაც საკვლევი მოლეკულების შესახებ მნიშ-ვნელოვანი ინფორმაციის მიღების შესაძლებლობას იძლევა, რითიც განი-საზღვრება ხელსაწყოს აუცილებლობა სამეცნიერო ლაბორატორიებში.

სპექტროფოტომეტრულად შესაძლებელია დავადგინოთ ბიომოლე-კულებს შორის კომპლექსების არსებობა/არ არსებობა, განისაზღვროს მათი კონცენტრაცია და ზოგადად მიღებული იყოს ბევრი მნიშვნელოვანი ინ-ფორმაცია. უნდა ითქვას, რომ ბიოლოგიური მოლეკულების სივრცულ სტრუქტურას და მის დინამიზმს აქვს გადამწყვეტი მნიშვნელობა ამ მოლეკულის ფუნქციონირებისასთვის ცოცხალ უჯრედში. სპექტროფოტო-მეტრიას მოლეკულის ამ თვისებების დადგენაში შეუძლია შეიტანოს მნიშ-ვნელოვანი წვლილი. გარდა ამისა ხელსაწყო შესაძლებელია გამოყენებული იყოს ისეთ რუტინულ ექსპერიმენტებში როგორებიცაა ხსნარების სისუფ-თავის განსაზღვრა და ხსნარის კონცენტრაციის დადგენა, რის გამოც ამ მეთოდის ცოდნა უდაო აუცილებელობას წარმოადგენს ხოლო თვით სპექ-ტოფოტომეტრი, როგორც ხელსაწყო თანამედროვე საკვევი-სამეცნიერო ლა-ბორატორიის აუცილებელი კომპონენია.

- დამატება

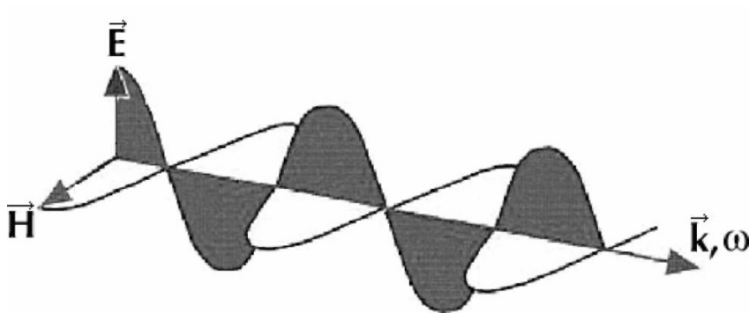
ხშირად სპექტროფოტომეტრიას მოიხსენებენ როგორც ფიზიკის ნაწილს, რომელიც აერთიანებს ფოტომეტრიას და სპექტრომეტრიას (თეორია და პრაქტიკა ელექტრომაგნიტური გამოსხივების ინტენსივობის და ტალღის სიგრძის (ან სიხშირის) გაზომვის შესახებ) ერთად. ზოგადად სპექტროფოტომეტრებს, შესასწავლი სისტემების ტიპების მიხედვით ყოფენ მოლეკულურ და ატომურ სპექტრომეტრებად. ასევე როგორც ასხვავებენ ინფრაწითელ, ხილულ და ულტრაიისფერს სპექტროფოტომეტრიას. ულტრაიისფერ და ხილულ არეებში სპექტროფოტომეტრიის გამოყენება დამყარებულია ელექტრომაგნიტურ გამოსხივების ნივ-

თიერების მიერ შთანთქმასთან, რომელიც მოიცავს მოლეკულაში ქრომოფორულ (მაგალითად, C≡C, C=C, C=O) და აუქსოქრომული (OCH_3, OH, NH_2 და სხვა) ჯგუფებს. მოლეკულების მიერ სინათლის ენერგიის შთანთქმა განპირობებულია მოლეკულაში არსებული s-, p-და n- ელექტრონებით, ისინი გადადიან უფრო მაღალ ენერგეტიკულ დონეზე, რის შედეგადაც მთელი მოლეკულა გადადის აღზნებულ მდგომარეობაში.

ინფრაწითელ სპექტროფოტომეტრში, მოლეკულას შეუძლია შთანთქმოს ინფრაწითელი სინათლე, რომლის ენერგია იხარჯება, მოლეკულების შემადგენლობაში მყოფ ჯგუფების რხევით და ბრუნავ ენერგეტულ დონეებს შორის გადასვლაზე.

1. მოლეკულების მიერ სინათლის შთანთქმის ზოგადი თეორია

ფიზიკის კურსიდან ცნობილია, რომ სინათლე წარმოადგენს ელექტრომაგნიტურ ტალღას, რომელიც წარმოდგენილია ურთიერთპერპენდიკულარულ სიბრტყეებში მერხევ ელექტრული და მაგნიტურ ველებით (ე.წ. გრიგალური ელექტრული ($\bar{E}$) და მაგნიტური ველები ($\hat{H}$), რომლებიც მიღებულია მუხტის და დენის გარეშე), რომლებიც თავის გავრცელების გზაზე იცვლიან თავიანთ მნიშვნელობას სინუსის/კოსინუსის კანონით. აღსანიშნავია, რომ თუ ელექტრული ველი იცვლება სინუსის კანონით, მაშინ მაგნიტური ველი აუცილებლად უნდა იცვლებეოდეს კოსინუსის კანონით (ნახ.1).



ნახ. 1. სინათლის ელექტრო-მაგნიტური ტალღის სქემატური ნახატი

როგორც ითქვა სინათლე ელექტრომაგნიტურ ტალღას წარმოადგენს, თუმცა კვანტური ფიზიკის თვალთახედვით ის ასევე განიხილება როგორც კორპუსკულური, ან ფოტონური ბუნების ნაწილაკების ნაკადი, რომელსაც გააჩნია როგორც ენერგია, ასევე მოძრაობის მასაც. ფოტონი, ელემენტარული ნაწილაკია, რომელსაც სხვანაირად სინათლის ელექტრომაგნიტური ტალღის კვანტსაც ეძახიან. ამ ნაწილაკს გააჩნია მასა მხოლოდ მოძრაობის დროს, ხოლო უძრაობის მისი მასა ნულის ტოლია, ანუ თუ „გაჩერდა“ იგი გაქრება. მოკლედ, ფოტონს, როგორც კვანტურ ნაწილაკს ახასიათებს კორპუსკულა-ტალღური დუალიზმი, ანუ ის შეიძლება <u>გამოვლინდეს</u> როგორც ნაწილაკის, ასევე ტალღური ბუნებით სახით - გააჩნია სინათლეს რომელ ექსპერიმენტში განვიხილავთ და რასთან ურთიერთქმედებს.

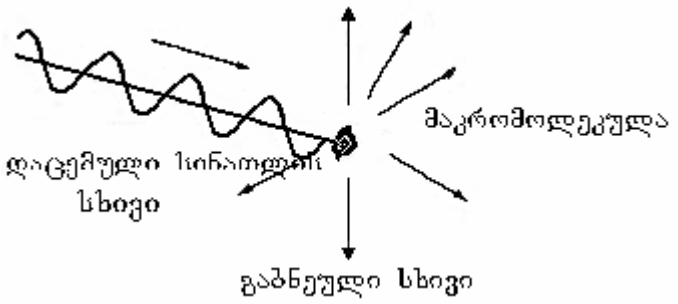
ელექტრომაგნიტური ტალღის ან ფოტონის ენერგიის დასათვლელად გამოიყენება ფორმულა:

$$E=hc/\lambda=h\nu, \quad (1)$$

სადაც ***h***- პლანკის მუდმივაა (***h*** =6.625•10-34ჯ•წმ), ***c*** -ვაკუუმში სინათლის სიჩქარე (300 000კმ/წმ), λ- სინათლის ტალღის სიგრძე (მინიმალური მანძილი ერთფაზაში მერხევ ტალღის წერტილებს შორის), ***ν*** **–** ტალღის სიხშირე (ერთ წამში სრულ რხევათა რიცხვი).

თუ განვიხილავთ სინათლის მოძრაობას ხსნარში, რომელშიც გახსნილია ბიომაკრომოლეკულები და თუ დაუშვებთრომ სინათლე ეჯახება (ურთიერთ-ქმედებს) ხსნარში არსებულ მოლეკულებს, მაშინ ურთიერთქმედების შედე-გად შეიძლება მიღებული იყოს შემდეგი: სინათლე შეიცვლის მოძრაობის მიმართულებას, ანუ გაიბნევა (ნახ.2), ან ბიომოლეკულა შთანთქავს მასზე დაცემულ სინათლეს, ანუ სინათლის ენერგია მთლიანად გადაეცემა მო-ლეკულას და სინათლე აღარ „გამოვა“ მოლეკულიდან. ამ დროს სინათლის

სხივი „გაჩერდება“ და ფოტონი გაქრება (ხსნარის გარეთ სინათლე არ გამოვა), ხოლო მისი ენერგია დარჩება ბიომოლეკულაში.



ნახ.2. სინათის სხივი, რომელიც ურთიერთქმედებს მაკრომოლეკულასთან და არ შთაითქმება მოლეკული მიერ ანუ გაიბნა

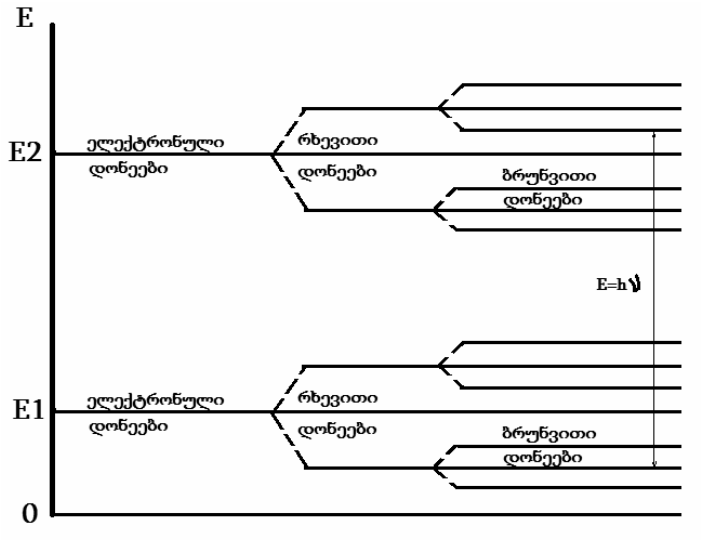
მოლეკულამ, რომელმაც შთანთქა სინათლე მისი შინაგანი ენერგია გაიზრდება, თანაც ზუსტად იმ რაოდენობით რა ენერგიაც ქონდა სინათლეს. ამ დროს ამბობენ, რომ მოლეკულა გადავიდა აღზნებულ მდგომარეობაში. თუ შესაძლებელი იქნებოდა, რომ გვქონოდა ისეთი მიკროსკოპი, რომლითაც შევძლებდით დავაკვირდეთ მოლეკულების მოძრაობას ხსნარში, დავინახავდით, რომ აღზგნებული მოლეკულები განსხვავებით არა აღზნებული მოლეკულებისაგან ინტენსიურად მოძრაობენ. მივიქცევთ ყურადღებას, რომ ყველა მოლეკულამ ვერ მოახდინა სინათლის ენერგიის შთანთქმა, ანუ მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმა არის ალბათური პროცესი - ხსნარში არსებულ ყველა მოლეკულას არ შეუძლია მასზე დაცემული სინათლე შთანთქოს. თუ რატომ არის ეს ასე, ამაზე ქვემოთ იქნება საუბარი.

როგორც აღინიშნა მოლეკულას შეუძლია შთანთქოს ან არ შთანთქოს მასზე დაცემული გარკვეული ტალღის სიგრძის სინათლე. მოლეკულას ან მოლეკულის ნაწილს, რომელსაც გააჩნია უნარი ხილული ან ახლო ულ-ტრაიისფერი სინათლე შთანთქოს და გადავიდეს ენერგეტიკულად მაღალ, აღგზნებულ მდგომარეობაში, ქრომოფორული მოლეკულა, ან უბრალოდ

ქრომოფორს (სინათლისადმი მგრძნობიარე მოლეკულას) უწოდებენ. გასაგებია, რომ სინათლის შთანქმისას მოლეკულის ენერგია გაზრდილი იქნება სტაციონარულ, ან ძირითად ენერგეტიკულ დონესთან შედარებით. ეს მდგომარეობა მოლეკულისთვის არის არა სტაბილური, მოლეკულა დიდხანს ვერ შეინარჩუნებს ამ მდგომარეობას და იგი საბოლოოდ დაუბრუნდება საწყის, ძირითად ენერგეტიკულ მდგომარეობას. როგორც ავღნიშნეთ აღგზნებული მოლეკულა განსხვავდება არააღგზნებული მოლეკულისაგან იმით, რომ იგი მოძრაობს უფრო ინტენსიურად, ამიტომაც აღზნებული მოლეკულა დაიწყებს კინეტიკური ენერგიის შემცირებას რისი მიზეზიც იქნება გამხსნელის მოლეკულები, რომლებსაც გადასცემს თავის კინეტიკური ენერგიის ნაწილს, რაც ჯამში ხსნარის სითბურ ენერგიად გარდაიქმნება. თუმცა, აღზნებული მოლეკულის ენერგია საწყის მდგომარეობაში დაბრუნების სხვა უფრო ალბათური გზაც არსებობს - აღზნებული მოლეკულა უბრუნდება თავის საწყის სტაციონარულ ენერგეტიკულ მდგომარეობას ელექტრომაგნიტურ ტალღის გამოსხივების სახით (შეიძლება ხილული სინათლის), თანაც ეს ენერგია გამოსხივდება ყველა მიმართულებით. ამ მოვლენას, როდესაც მოლეკულის მიერ შთანთქმული ენერგია, გამოსხივდება ისევ სინათლის სახით ფლუორესცენციის სახელით არის ცნობილი.

როგორ შეიძლება გაგებული იყოს მოლეკულის აღზნებული მდგომარეობა? კვანტურ მექანიკური კანონების თანახმად მოლეკულის (ატომების) ენერგია და მისი მნიშვნელობები არის არა უწყვეტი, არამედ წყვეტილი. მოლეკულებს შეიძლება ქონდეს ენერგიის მხოლოდ გარკვეული მნიშვნელობები, ანუ მოლეკულის ენერგია დაქვანტულია (ნახ.3). მოლეკულის ენერგეტიკული დონეები განისაზღვრება მოლეკულის ელექტრონების განაწილებით და ამ დონეებს უწოდებენ მოლეკულის ელექტრონულ ენერგეტიკულ დონეებს (ნახ.3). უნდა აღინიშნოს, რომ ეს ელექტრონული დონეების

მნიშვნელობა არ წარმოადგენენ მუდმივ რიცხვებს, არამედ მოლეკულების ენერგია განიცდის „რხევებს“, ანუ მისი მნიშვნელობა უმნიშვნელოდ, მაგრამ, ყოველთვის განიცდის ცვლილებას. ეს ცვლილება განპირობებულია მოლეკულის შემადგენლობაში მყოფი ქიმიური ჯგუფების, ან თუნდაც ატომების რხევითი (ატომში მასიური ბირთვების რხევა) და ბრუნვითი ენერგეტიკული დონეების არსებობით (ნახ.3). მნიშვნელოვანია, რომ არა მარტო მოლეკულის ელექტრონული დონეებია დაქვანტული, არამედ დაქვანტულია რხევითი და ბრუნვითი დონეებიც, რაზეც მიანიშნებს ნახაზ 3 -ზე მოყვანილი ენერგეტიკული დიაგრამა. ამრიგად, ჩვენს გარშემო არსებულ ყველა მოლეკულას, შეიძლება გააჩნდეს ენერგეტიკული დონეების იერარქია – ელექტრონული, რხევითი და ბრუნვითი ენერგეტუიკული დონეების სახით (ნახ. 3).



ნახ.3. მოლეკულის ენერგეტიკული დონეების სქემატური გამოსახულება

ყველაზე დაბალ ელექტრონულ დონეს უწოდებენ ძირითად ენერგეტიკულ დონეს (E1- ენერგეტიკული დონე), ხოლო უფრო მაღლა (დიდი მნიშვნელობის) მდებარე დონეებს კი აღგრძნებულს. ულტრაიისფერი და

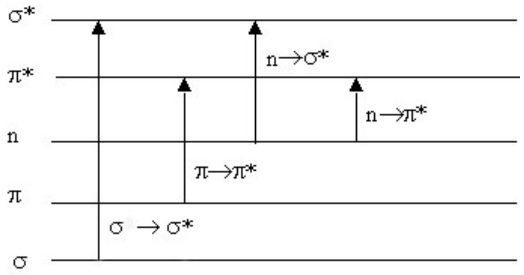
ხილული სპექტროფოტომეტრებში განიხილება გადასვლები ძირითად E1 ენერგეტიკული დონესა და მომდევნო ენერგეტიუკულ დონეს E2 შორეს. ულტრაიისფერი და ხილული სინათლის ენერგიების მნიშვნელობა საკმარისია მხოლოდ მოლეკულის გადასაყვანათ ძირითადი ენერგეტული E1 დონიდან პირველ ენერგეტიკულ დონეზე E2.

დამატება

ელექტრონული გადასვლის ტიპები

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად განასხვავებენ σ და π ტიპის მოლეკულური ორბიტალებს. ორივე ტიპის ელექტრონების ორბიტალები შეიძლება იყვნენ, როგორც დამაკავშირებელი σ და π (ატომების გაერთიანება), ასევე „დამაშორებული“ σ* და π* (ატომების დაცილება). სინათლის შთანთქმისას ადგილი აქვს დამაკავშირებელი σ და π ელექტრონებიდან „დამაშორებული“ σ* და π* ორბიტალებზე გადასვლა.

ნახ. 4-ზე მოცემულია ელექტრონების გადასვლის შესაძლებლობა, სადაც ყველაზე პატარა ენერგია არის საჭირო *n*-π* გადასვლაზე, ხოლო ყველაზე დიდი ენერგია იხარჯება ელექტრონების σ-σ* გადასვლაზე.



E↑ ნახ.4. ელექტრონული გადასვლის ვარიანტები

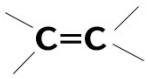
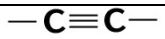
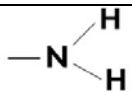
ძირითად მდგომარეობაში σ , π და *n* (შეუწყვილებელი ელექტრონები - დაუკავშირებელი ელექტრონები, რომლებიც ლოკალიზებულია მხოლოდ ერთეულ ატომებზე) ორბიტალები არიან შევსებული, მაშინ როდესაც σ* და π* ორბიტალები თავისუფალია.

ქვემოთ ტაბულაში მოყვანილია ტიპიური ქრომოფორები და მათი მახასიათებლები.

მაგალითად, კარბოქსილური ჯგუფი COOH არის ქრომოფორი, რომელიც შთანთქავს 280ნმ -ის მახლობლობაში, თუმცა კეტონები, რომელთა შემადგენლობაშიც შედის *C=O*, სრულიად

უფერო ნივთიერებაა. ზოგადად თუ ვიტყვით, მსგავს ქიმიურ ჯგუფებს, რომლებიც ტაბულა 1 - შია მოყვანილი, გააჩნია შთანთქმა სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე, რაც საყურადღებოა იმ თვალსაზრისით, რომ ასეთი ჯგუფებით მდიდარია ბიოლოგიური მოლეკულები.

ტაბულა 1. ტიპიური ქრომოფორები და და მათი დახასიათება

ქრომოფორი	ტალღის სიგრძე (ნმ)	ექსტინციის მოლარული კოეფიციენტი ($\varepsilon_{მაქ}$) და შთანთქმის ზოლის ინტენსივობა	აღზნება
	*175* *185*	*14 000* ძლიერი *8 000* ძლიერი	π-ელექტრონები
	*175* *195* *223*	*10 000* ძლიერი *2 000* ძლიერი *150* სუსტი	π-ელექტრონები
	160 *185* *280*	*18 000* ძლიერი *5 000* ძლიერი *15* სუსტი	π-ელექტრონები თავისუფალი ჟანგბადის ელექტრონული წყვილი
	217	*20 000* ძლიერი	π-π*
	184 *200* *255*	*60 000* ძლიერი *4 400* საშუალო *204* სუსტი	π-π* *n*-π*
	185	საშუალო ძალის ზოლი	თავისუფალი ჟანგბადის ელექტრონული წყვილი
	*215*	საშუალო ძალის ზოლი	თავისუფალი აზოტის ელექტრონული წყვილი
	340-370	სუსტი ზოლი	თავისუფალი აზოტის ელექტრონული წყვილი

2. ლამბერტ-ბერის კანონი და მოლეკულის სპექტრი

სხვადასხვა ტიპის და შემადგენლობის მოლეკულები შთანთავენ სხვადასხვა ტალღის სიგრძის სინათლეს, რომელიც განპირობებული იქნება მოლეკულის ენერგეტიკული დონეების სხვადასხვაობით, რომელიც განსხვავებულ მოლეკულებს სხვადასხვა აქვთ. აქედან გამომდინარეობს, განსხვავებული მოლეკულები განსხვავდებიან არა მარტო ქიმიური შემადგენლობით, არამედ მათი ენერგეტიკული დონეებითაც – ყველა მოლეკულას აქვს თავისი დამახასიათებელი ენერგეტიკული დონეები. მოლეკულის მიერ სინათლის ენერგიის შთანთქმა მოხდება მხოლოდ იმ შემთხვევაში თუ დაცემული სინათლის ტალღის სიგრძე ისეთია, რომლის შესაბამისი ენერგიის მნიშვნელობა (ფორმულა (1)) დაემთხვევა მოლეკულის ელექტრონული დონეებს შორის სხვაობას – ელექტრონული, რხევითი და ბრუნვითი დონეების ჩათვლით. ნათქვამი გამომდინარეობს ბორის პოსტულატის პირობიდან, რომლის თანახმად – მოლეკულას შეუძლია გამოასხივოს ან შთანთქმოს ენერგია თუ მოლეკულა ერთი ენერგეტიკული მდგომარეობიდან გადადის მეორე ენერგეტიკულ მდგომარეობაში. თუ განვიხილავთ მოლეკულას, რომელიც იმყოფება E1-ის ტოლი ძირითადი ენერგეტიკული დონეზე, შეუძლია გადავიდეს პირველი აღზნებული დონეზე, რომელსაც შეესაბამება E2 ენერგიის მნიშვნელობა, მოლეკულას შეუძლია შთანთქოს გარედან მიწოდებული ენერგია, რომლის სიდიდე ტოლი იქნება ზუსტად $E_{\text{გარე}} = E2 - E1$ მნიშვნელობისა. თუ გვინდა დავითვალოთ რა ტალღის სიგრძის სინათლე გამოსხივდება მოლეკულიდან, როცა მოლეკულა გადადის მაღალ ენერგეტიკული მდგომარეობიდან ძირითად ენერგეტიკულ მდგომარეობაზე უნდა გამოვიყენეოთ ფორმულა:

$$\lambda = hc/(E_2 - E_1) \qquad (2)$$

ამრიგად, მოლეკულის აღიგზნება ხდება მაშინ, თუ მოლეკულაზე დაცემული სინათლის ენერგიის მნიშვნელობა ზუსტად დაემთხვევა მოლეკულის ძირითად და პირველ ენერგეტიკულ დონეებს შორის სხვაობის მნიშვნელობას. უფრო ნათელი და დეტალური წარმოდგენა რომ შეგვექმნას იმაზე, თუ როგორ მიმდინარეობს მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმა და აიხსნა ის მოვლენა თუ ერთ მოლეკულა სინათლეს შთანთქავს, ხოლო მეორე მოლეკულა კი არ შთანთქავს იგივე სინათლეს, აუცილებლა გვახსოვდეს, რომ მნიშვნელობა აქვს მოლეკულის სინათლესთან ურთიერთქმედების მომენტში, რომელ ენერგეტიკულ დონეზე იმყოფება (როგორი ენერგია) მოლეკულა ძირითად მდგომარეობაში. ნათქვამი გულისხმობს იმას, რომ მოლეკულებს, ძირითად ენერგეტიკულ დონეზე, მოლეკულის რხევითი და ბრუნვითი დონეების გამო, გააჩნიათ მცირედ, მაგრამ მაინც განსხვავებული ენერგიები, რაც განსაზღვრავს იმას თუ სინათლის მოქმედებისას მოლეკულა შთანთქავს ამ სინათლის ენერგიას თუ არა – ზოგი მოლეკულა შთანთქავს ამ ენერგიას ზოგი კი არა, ამიტომაც მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმას განიხილავენ, როგორც ალბათურ პროცესს.

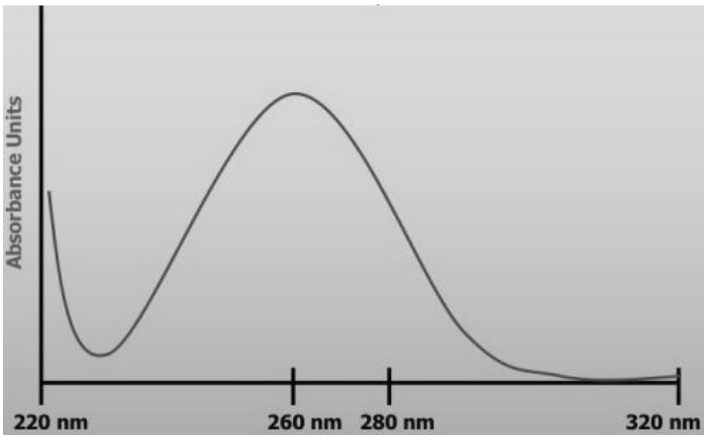
მოლეკულის გადასვლა ელექტრონულ ენერგეტიკულ დონეებს შორის გულისხმობს იმას, რომ ხდება ელექტრონების გადანაცვლება ერთი ორბიტიდან მეორე ორბიტაზე. ნახ. 2-ზე ისრებით ნაჩვენებია ენერგეტიკულ დონეებს შორის გადასვლის ვარიანტები.

მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმის ალბათობის დამოკიდებულებას ტალღის სიგრძეზე მოლეკულის შთანთქმის სპექტრი ეწოდება. აბსორბციული სპექტროსკოპიის ამოცანას წარმოადგენს საკვლევი მოლეკულების სპექტრის გადაღება და მისი ანალიზი. გასაგებია, რომ სხვადასხვა მოლეკულებს, რომლის შემადგენლობაშიც სხვადასხვა მოლეკულური ჯგუფები შედის, სხვადასხვა მნიშვნელობის ენერგეტიკული დონეები გააჩნიათ.

გასაგებია, რომ განსხვავებული ენერგეტიკული დონეების მქონე მოლეკულები (ან მის შემდგენლობაში მყოფი მოლეკულების ჯგუფების) სხვადასხვა ტალღის სიგრძის სინათლეს შთანთქავს და შესაბამისად მათი სპექტრი იქნება განსხვავებული.

მოლეკულის სპექტრი არ წარმოადგენდეს ე.წ. ზოლოვან სპექტრს, ანუ არ არის გამორჩეული ერთი ტალღის სიგრძე, სადაც ხდება მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმა. პირიქით, მოლეკულის მიერ შთანთქმის სპექტრი ფორმა, რეალურად წარმოადგენს გარკვეული სიგანის პიკს, რომელიც მიუთითებს, რომ მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმა ხდება მკაცრად არა ერთ ტალღის სიგრძეზე, არამედ მოლეკულა შთანთქავს გარკვეულ ზოლს, ინტერვალს ტალღის სიგრძისა. უფრო დეტალურად თუ ვიმსჯელებთ, მოლეკულების ის რაოდენობა, რომლებიც გადავლენ ყველაზე დაბალ მნიშვნელობის ელექტრონულ დონიდან (რხევითი და ბრუნვითი დონეების მინიმალური მნიშვნელობა) ყველაზე მაღალ ელექტრონული დონეზე, იქნება ძალიან მცირე. შესაბამისად ამ შემთხვევაში მაქსიმალური მნიშვნელობის სინათლის ენერგის შთანთქმა იქნება მინიმალური სიდიდის. როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ მოლეკულაში გადასვლა შესაძლებელია მოხდეს ნებისმიერ რხევით და ბრუნვით ენერგეტიკულ დონეებზე, რის გამოც ხაზოვანი შთანთქმის ხაზების ნაცვლად ვღებულობთ სპექტრს, რომლის პროფილიც წარმოადგენს მრუდს (მაგალითად, ნახ.5.). მოლეკულის სპექტრში მაქსიმალური შთანთქმის წერტილს შეესაბამება სინათლის ტალღის სიგრძე, რომლის ენერგია შთაინთქა მოლეკულების ყველაზე დიდმა რაოდენობამ, თანაც ყველაზე დიდი ალბათობით. აღსანიშნავია, რომ თითქმის უმეტესი ბიომოლეკულებისათვის ტალღის სიგრძეები, რომელსაც შეესაბამება გადასვლები ძირითადი მდგომარეობიდან პირველ აღზნებულ მდგომარეობაზე ძევს სპექტრის ულტრაიისფერ და ხილულ უბნებში. უფრო მაღალ ენერ-

გეტიკულ დონეზე (მესამე, მეოთხე და ასე შემდეგ) გადასვლისას საჭიროა სინათლის ენერგიები, რომლებიც იმყოფებიან ულტრაიისფერ სინათლის ტალღის სიგრძეებისაგან ძალიან განსხვავებულ უბანში, რომლებიც წარმოადგენენ რენტგენის და გამა – ელექტრომაგნიტურ ტალღათა უბნებს. რაც შეეხება გადასვლებს ერთ ელექტრონულ ენერგეტიკულ დონის ფარგლებში რხევით დონეებს შორის განეკუთვნება განსხვავებულ სპეტროსკოპიას, რომელსაც ინფრაწითელი სპექტროსკოპიის სახელითაა ცნობილი.



ნახ.5. დნმ-ი მოლეკულის ტიპიური სპექტრი

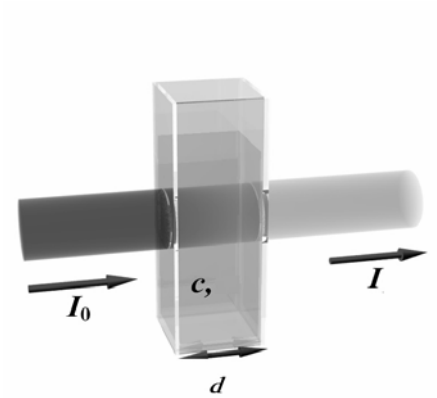
მოლეკულის სპექტროსკოპულად დახასიეთებისას, როგორც წესი იყენებენ ორ პარამეტრს სინათლის ტალღის სიგრძეებს, სადაც დაიმზირება შთანთქმის მაქსიმუმები (λ_{max}) და მოლეკულის მიერ სინათლის კუთრ შთანთქმის მნიშვნელობებს. მოლეკულის მიერ სინათლის ენერგიის შთანთქმის ეფექტურობა არის დამოკიდებული მოლეკულების ქიმიურ შემადგენლობაზე, სტრუქტურაზე და მოლეკულის გარემო არსებულ გარემოს თვისებებზე.

მოლეკულის მიერ სინათლის შთანთქმის რაოდენობრივი აღწერისათვის არსებობს კანონი, რომელიც ცნობილია ლამბერტ-ბერის კანონის სახელით. ნახაზ 6-ზე მოცემულია სპექტროსკოპული d სიგანის კიუვეტა,

სადაც მოთავსებულია საკვლევი ***c*** კონცენტრაციის ხსნარი, რომელსაც ეცემა I_0 ინტენსივობის სინათლე, ხსნარი შთანთქავს სინათლეს და კიუვეტიდან გამოსული სინათლის ინტენსივობა ემორჩილება შემდეგ კანონს:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon dc}, \quad (3)$$

სადაც ε – შთანთქმის კოეფიციენტია, რომელსაც სხვანაირად შთანთქმის ექსტინციის კოეფიციენტს ეძახიან. იმისდა მიხედვით თუ როგორ ერთეულებში განისაზღვრება ხსნარის კონცენტრაცია, შესაბამისად შთანთქმის კოეფიცინტსაც კონცენტრაციის ერთეულის სახელით მოიხსენიებენ.



ნახ.6. d სიგანის და ***c*** კონცენტრაციის ხსნარში გამავალი სინათლის სხივის ინტენსივობების ცვლილება

მაგალითად, ხსნარის შთანთქმის მოლარული ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობა ნიშნავს თუ როგორია ერთი მოლარული კონცენტრაციის ხსნარის შთანთქმა ერთსანტიმეტრიანი სისქის კიუვეტაში. ისევე როგორც არსებობს ექსტინციის კოეფიციენტი – პროცენტული, მოლალული და სხვა, რომელთა შინაარსიც მსგავსია მოლარული ექსტინციის კოეფიცინტისა. თუ მოლეკულას გააჩნია შთანთქმის მაქსიმუმის რამდენიმე უბანი, შესაბამის ტალღის სიგრძეზე, მაშინ შესაძლებელია თითეული ტალღის სიგრძისთვის მიეთითოს ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობები. როგორ დგინდება მოლეკულისათვის ექსტინციის კოეფიცინტი? ამისათვის საჭიროა მოცემული

ტალღის სიგრძეზე განისაზღვროს მოლეკულის ოპტიკური შთანთქმა (***d*** = 1 სანტიმეტრის სიგრძის კიუვეტაში), რომელიც ნორმირებული იქნება ხსნარის კონცენტრაციაზე (გაყოფილი ***c***-ზე) და მიღებული რიცხვი იქნება მოცემულ ტალღის სიგრძეზე მოლეკულის ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობა. თუ (3) ფორმულას ჩავწერთ შემდეგნაირად $I_0/I=10^{\varepsilon dc}$ და გავალოგარითმებთ ტოლობას, მივიღებთ ფორმულას:

$$Lg(I_0/I)=\varepsilon dc, \quad (4)$$

ტოლობის მარცხენა მხარეს, $lg(I_0/I)$, უწოდებენ ხსნარის მიერ სინათლის შთანთქმის სიდიდეს და აღნიშნავენ ***OD***-თი რასაც განსაზღვრავს სპექ-ტროფოტომეტრი. გასაგებია, რომ ***OD*** პარამეტრით შესაძლებელია დახასი-ათდეს საკვლევი ობიექტის შთანთქმის უნარიანობა. შთანთქმის კოეფიცი-ენტის აბრევიატურა გამომდინარეობს ინგლისური სიტყვისაგან - ***optical density***, ანუ ოპტიკური სიმკვრივე $OD=lg(I_0/I)$ (რაც განისაზღვრება სპექტრო-ფოტომეტრზე). ზოგჯერ ***OD*** –ს ნაცვლად იხმარება უბრალოდ ***D***-საც (***density***). გარდა ოპტიკური შთანთქმისა, ხშირად ხსნარის ოპტიკური თვისებების დამახასიათებელ სიდიდეთ გამოიყენებენ ოპტიკურ გამჭვირვალობის პრო-ცენტს ***T***-საც, რომელიც განისაზღვრება ფორმულით:

$$T=I/I_0 \bullet 100\%, \quad (5)$$

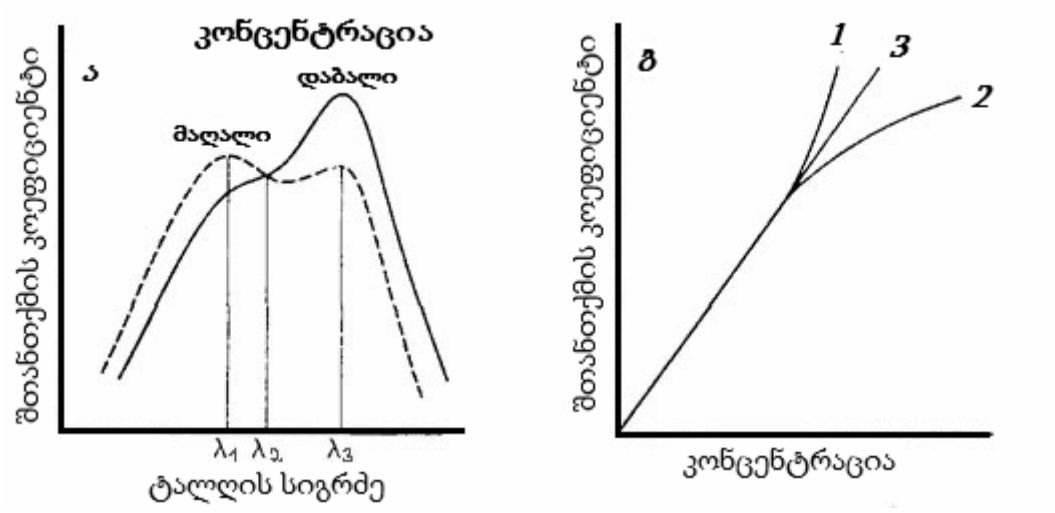
ადვილია კავშირის დადგენა სინათლის შთანთქმას (***D***) და გამჭირ-ვალობის პროცენტს (***T***) შორის, რომელიც გამოითვლება ფორმულით:

$$D=2-lgT, \quad (6)$$

გასაგებია, რომ ხსნარის მიერ სინათლის შთანთქმა დამოკიდებულია ტალღის სიგრძეზე ამიტომაც შთამთქმის კოეფიციენტს ***D***-ს ხშირად გამო-სახავენ ასეთ ნაირად D_λ, სადაც λ ინდექსი მიუთითებს ტალღის სიგრძეს,

რომელზედაც მოხდა შთანთქმის განსაზღვრა. ფორმულა (5) – დან ჩანს, რომ ხსნარის მიერ სინათლის შთანთქმის კოეფიციენტი $(D)_\lambda$ პროპორციული უნდა იყოს ხსნარის კონცენტრაციისაა. მაგრამ, როგორც ექსპერიმენტები აჩვენებენ წრფივი დამოკიდებულება ამ პარამეტრებს შორის შენარჩუნებულია მხოლოდ ხსნარის კონცენტრაციის მცირე მნიშვნელობისათვის, უფრო მაღალ კონცენტრაციებზე წრფივობა (შეიძლება იყოს) დარღველია. ხსნარის დიდი კონცენტრაციების დროს გახსნილი მოლეკულების ურთიერთ გავლენას ერთმანეთზე მივყავართ მოლეკულების გარემოცვის, ისევე როგორც მათი სტრუქტურის ცვლილებასთან, რაც აუცილებლად შეცვლის ხსნარის შთანთქმის ეფექტურობას – გამოიწვევს შთანთქმის ცვლილებას. არ გამოირიცხება ხსნარის მიერ დაცემული სინათლის მოლეკულებზე გაბნევის გაზრდაც, რაც დაკავშირებულია როგორც ხსნარის კონცენტრაციულ, ასევე მოლეკულების დიმერიზაციას და აგრეგაციასთანაც. ჯამში, ზემოთ მოყვანილი მოსაზრებებიდან გამომდინარე ნახ. 7-ზე მოყვანილია ტიპიური კონცენტრაციული ეფექტების სპექტრები და სინათლის შთანთქმის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულების გრაფიკი. ნათლად ჩანს, რომ მაღალ კონცენტრაციებზე ირღვევა წრფივი დამოკიდებულება D_λ -სა c –ს შორის, რაც გასათვალისწინებელია დიდი კონცენტრაციის ხსნარების სპექტროფოტომეტრული ექსპერიმენტული კვლევებისას.

კიდევ ერთი, ხშირად ლამბერტ-ბერის კანონის დასახელების მაგივრად ხმარობენ ბერის კანონს, რაც უზუსტობაა, ვინაიდან ამ სახელით არსებობს სხვა კანონიც, რომელსაც საერთო არ აქვს ზემოთ მოყვანილ შთანთქმის კანონთან.



ნახ.7. ლამბერტ-ბერის კანონის დარღვევა, რომელიც გამოწვეულია ხსნარის კონცენტრაციის გაზრდით

ა) – სპექტრული წანაცვლება, რომელიც გამოწვეული შეიძლება იყოს მოლეკულების აგრეგაციით (დიმერიზაციით), რაც შეიძლება გამოიწვიოს ხსნარის კონცენტრაციის გაზრდამ.

ბ) – კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ლამბერტ-ბერის კანონის დარღვევის შემთხვევები – ე.წ. დადებითი (1) და უარყოფითი (2) გადახრები.

3. სპექტროფოტომეტრის აღწერა

ხსნარის მიერ შთანთქმის სიდიდის განსაზღვრისათვის გამოიყენებენ სპექტროფოტომეტრებს. გასაგებია, რომ ლაბორატორიებში არსებული სპექტროფოტომეტრები განსხვავებულნი არიან აგებულებით და გაზომვის პროცედურებით. თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ როგორიც არ უნდა იყოს სპექტროფოტომეტრი, თანამედროვე ან ძველი წარმოების, მათი აგებულების და გაზომვის პრინციპები არის საერთო. კერძოდ, მათ შემადგენლობაში უნდა შედიოდეს: სინათლის წყარო, დისპერგიური ელემენტი (მონოქრომატორი, რომელიც გამოყოფს გარკვეული სიგრძის ტალღის სინათლეს), გამჭვირვალე

კიუვეტა, სადაც მოთავსებულია საკვლევი ხსნარი, სინათლის დეტექტორი, ელექტრონული მოწყობილობა, რომელიც შეადარებს ერთმანეთს (გაყოფს) გამხსნელში და ხსნარში გასულ სინათლის ინტენსივობებს, და ჩამწერი მოწყობილობა.

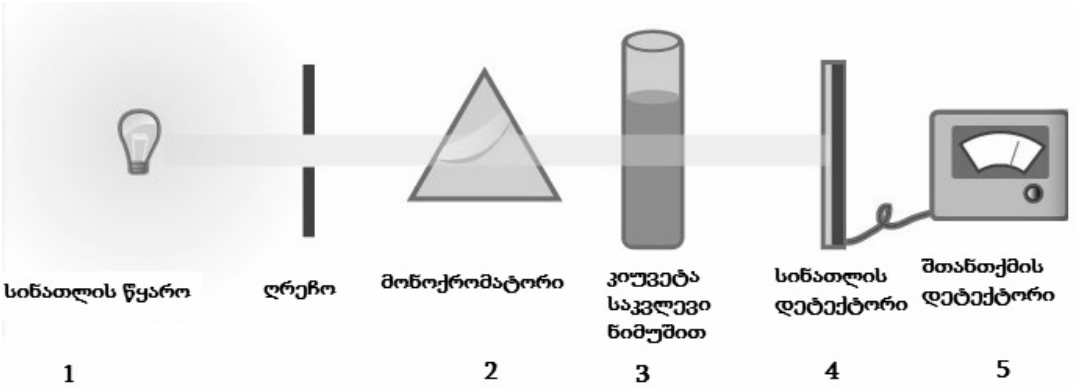
ნახ. 8 -ზე მოცემულია სპექტროფოტომეტრის ბლოკ სქემა, რომელიც მუშაობს შემდეგი პრინციპით: ირჩევენ ტალღის სიგრძეს და პირველად იზომება გამხსნელში გასული სინათლის ინტენსივობა (რომელიც ჩვეულებრივ არის ბუფერული ხსნარი), შემდეგ იზომება (იგივე ინტისივობა და ტალღის სიგრძე) ხსნარში გასული სინათლის ინტენსივობა და (5) ფორმულის თანახმად ხელსაწყოს ელექტრონული სქემის მეშვეობით ხელსაწყო განსაზღვრავს გამხსნელის და ხსნარის კიუვეტებიდან გამოსული სინათლის ინტენსივევობის მნიშვნელობების ფარდობის ათობითი ლოგარითმს ($D=\lg(I_0/I)$), რომელ მნიშვნელობასაც აფიქსირებს ხელსაწყო და რაც წარმოადგენს ხსნარში გახსნილი საკვლევი მოლეკულების შთანთქმის მნიშვნელობას მოცემულ ტალღის სიგრძეზე. მოლეკულების სპექტრის დამახასიათებელი მრუდის ჩაწერა შესაძლებელია როგორც ტალღის სიგრძის კონკრეტულ მნიშვნელობაზე, ანუ გაზომვა ხდება წყვეტილად, განსხვავებულია სხვა პრინციპით მომუშავე სპექტროფოტომეტრებში, სადაც შთანთქმის გაზომვა ხდება უწყვეტად ყველა ტალღის სიგრძეზე. როგორც წესი ხსნარის სპექტრის მისაღებად უფრო ზუსტი და მოსახერხებელია სპექტროფოტომეტრები, რომლებსაც შეუძლიათ ავტომატურად ხსნარის შთანთქმის გაზომვა ჩვენს მიერ მითითებულ ტალღის სიგრძის ინტერვალში უწყვეტ რეჟიმში. ასეთი გზით მიღებულ სპექტრს სკანირებად რეჟიმით მიღებულ სპექტრსაც ეძახიან, სადაც მოლეკულის შთანთქმა განისაზღვრება ნებისმიერი სინათლის ტალღის სიგრძის დროს. ასეთ სპექტროფოტომეტრებს, სადაც შესაძლებელია მიღებული იყოს მოლეკულის უწყვეტი სპექტრული მრუდი

მოცემულ სინათლის ტალღის ინტერვალში სკანირებად სპექტროფოტო-მეტრებსაც ეძახიან.

არსებული სკანირებადი სპექტროფოტომეტრები, როგორც წესი ორი ტიპისაა – განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან ხსნარის სპექტრის მიღების გზით. ერთ შემთხვევაში – ორსხივიანი სპექტროფოტომეტრებში, ისაზღვრება ხსნარის შთანთქმა გამხსნელის მიმართ ერთი და იგივე ტალღის სიგრძის პირობებში. ასეთ ორსხივიანი სპექტროფოტომეტრებში ადგილი აქვს არჩეულ-ი ტალღის სიგრძის სინათლის გაყოფა ორ იდენტურ სხივად (იდენტურია მათი ტალღის სიგრძეები და ინტენსივობა), რომლიდანაც ერთი სხივი გადის გამხსნელში, ხოლო მეორე ხსნარში. იზომება ხსნარიდან და გამხსნელიდან გამოსული სინათლის ინტენსივობების ფარდობა, ყველა ტალღის სიგრძი-სათვის, რაც წარმოდგენილი იქნება მრუდი წირის სახით და წარმოადგენს შესასწავლი მოლეკულის სპექტრს. მეორე ტიპის სკანირებადი სპექტრო-ფოტომეტრებში არ ხდება სინათლის სხივის ორ ნაწილად გაყოფა (რეა-ლურად, სპექტროფოტომეტრი ერთსხივიანია), მაგრამ ხელსაწყოში არსებულ-ი კომპიუტერის მეშვეობით შესაძლებელია სხვადასხვა სიგრძის ტალღაზე (სიზუსტის გაზრდის მიზნით სინათლის ტალღის სიგრძე აიღება მცირე ინტერვალით), გამხსნელში გამავალი სინათლის ინტენსივობის გაზომილი მნიშნელობის დამახსოვრება, რომელიც შემდგომ შედარებული იქნება იგივე ტალღის სიგრძის გამხსნელის კიუვეტიდან გამოსული სინათლის ინტენსი-ვობის მნიშვნელობებთან. კომპიუტერის მეშვეობით უწყვეტად, სინათლის ტალღის სიგრძის არჩეულ ინტერვალის ნებისმიერ მნიშვნელობისთვის გამოითვლება ხსნარიდან გამოსული ინტენსივობის ფარდობა გამხსნელის კიუვეტიდან გამოსულ სინათლის ინტენსივობასთან (დამახსოვრებულია კომპიუტერის მეხსიერებაში) და აიგება ამ თანაფარდობის ათობითი ლოგა-რითმის დამოკიდებულება ტალღის სიგრძეზე, რაც წარმოადგენს ხსნარში

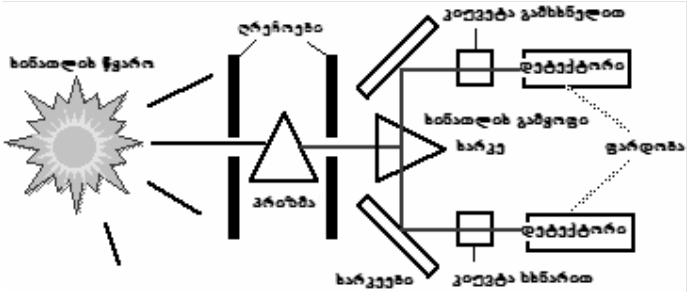
არსებული მოლეკულებების სპექტრს. აღსანიშნავია, რომ დღეს დღეობით საკმაოდ მომრავლდა ასეთი ტიპის სპექტროფოტომეტრები, რომლების აღ-ჭურვილია კომპიუტერული ბლოკით, რომელიც მართავს მთელი ხელსაწყოს მუშაობის პროცესს იმ პარამეტრების ფარგლებში, რომელსაც ჩვენ მივაწვდით და რაც მთავარია ამით გაზრდილია გაზომვის სიზუსტეც, ასევე მოხდა ხელსაწყოების მნიშვნელოვნად გაიაფება (გამარტივდა ხელსაწყოს ძვირად-ღირებული ოპტიკური ნაწილი) რითაც დანადგარი გახდა ბევრი ლაბორატო-რიისთვის ხელმისაწმდომი.

ქვემოთ სურათებზე მოცემულია ერთ და ორსხივიანი სპექტროფო-ტომეტრების პრინციპული სქემები, სადაც ნაჩვენებია და აღწერილია მათი მუშაობის პრინციპი.



ნახ. 8. ერთსხივიანი სპექტროფოტომეტრის პრინციპული სქემა

1- სინათლის წყარო
2- მონოქრომატორი
3- კიუვეტა საკვლევი ნიმუშით
4- სინათლის ინტენსივობის დეტექტორი
5- სინათლის ინტენსივობის გაზომვის ელექტრონული მოწყობილობა



ნახ.9. ორსხივიანი სპექტროფოტომეტრის ბლოკსქემა

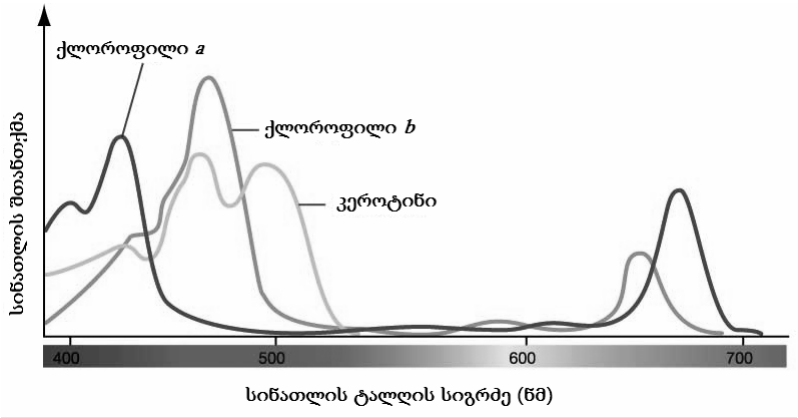
(ნახაზზე მითითებულია ხელსაწყოში გამოყენებული მოწყობილობები).

როგორც წესი არსებული სპექტროფოტომეტრების მარკირება მიგვანიშნებს თუ სინათლის რომელ უბანში შეუძლია მუშაობა დანადგარს, მაგალითად, თუ მარკირება შეიცავს UV/VIZ აღნიშვნას, ეს ნიშნავს, რომ ხელსაწყოს შეუძლია აწარმოოს გაზომვები როგორც ხილულ, ისევე ულტრაიისფერ არეში. გასაგებია, რომ თუ სპექტროფოტომეტრი მუშაობს ულტრაიისფერ უბანში. მაშინ ყველა ოპტიკური დეტალი, სინათლის წყაროდან დაწყებული და დეტექტორით დამთავრებული უნდა იყოს გამჭვირვალე ულტრაიისფერი სხივებისათვის. როგორც წესი დანადგარის შემადგენლობაში არსებული სინათლის წყარო, მონოქრომატორი, კიუვეტა, მიმღები ელემენტი (ნახ. 8,9) დამზადებული უნდა იყოს ულტრაიისფერი სინათლის მიმართ გამჭვირვალე მინისაგან. კვარცისსაგან დამზადებული მინა გამჭვირვალეა ულტრაიისფერ სინათლისათვის (კვარცი ასევე წარმატებით გამოიყენებენ რადიოტექნიკაშიც, როგორც გარე ტემპერატურის მიმართ სტაბილური ელემენტი). ულტრაიისფერი სინათლის წყაროთ იყენებენ მაღალწნევის ქვეშ მყოფ, კვარცის მინაში მოთავსებულ დეიტერიუმის, წყალბადის, ვერეცხლისწყლის, ქსნონის ერთ-ერთ აირს, რომელსაც შესწევს უნარი გამოასხივოს ულტრაიისფერი სინათლის ფართე სპექტრი. ხელსაწყოში, სინათლის ხილულ არის მიღებისათვის იყენებენ ჰალოგენის ტიპის ხილულ ნათურა, რომელსაც მოეთხოვება შედარებით დიდი ინტენსივობის (გამოიყენება მცირე ზომის და დიდი სიმძლავრის ჰალოგენის ნათურა) ხილული სინათლის ნაკადის მიღება.

4. მიღებული მოლეკულური სპექტრის პარამეტრები და ანალიზი

ნივთიერების იდენტიფიცირებისას და სპექტრების ანალიზისას, მნიშვნელობა აქვს დაფიქსირდეს მაქსიმუმების და მინიმუმების შესაბამისი სინათლის ტალღის მნიშვნელობები. სპექტრის მაქსიმუმი ნიშნავს რომ, შესაბამის ტალღის სიგრძეზე მოლეკულის სტრუქტურაში არსებობს ისეთი ქიმიური ჯგუფი, რომელიც შთანთქავს მასზე დაცემულ სინათლეს, შესაბამისად სპექტრის მინიმალური მნიშვნელობა მიუთითებს, რომ მოლეკულაში არ არის ისეთი ქიმიური ჯგუფი, რომელსაც შეეძლო შთაენთქმა შესაბამისი ტალღის სიგძის სინათლის ტალღა. ნივთიერების სპექტროსკოპული ანალიზისას, გარდა ტალღის სიგრძეების ე.წ. ექსტრემუმის მნიშვნელობებისა, ასევე ნივთიერების ოპტიკურ თვისებებიდან გამოარჩევენ შთანთქმული ენერგიის სიდიდესაც (სინათლის ტალღის მაქსიმუმის დროს). ნივთიერების სპექტრში არსებული ტალღის სიგრძის ექსტრემუმების მნიშვნელობებით და შთანთქმული ენერგიის კუთრი მნიშვნელობით, შეგვიძლია ვიმსჯელოთ თუ ნივთიერება რა მოლეკულულებისაგან შედგება, ან რა ტიპის ქიმიური ჯგუფები შედიან მოლეკულის შემადგენლობაში, ან როგორ გარემოცვაში იმყოფებიან მოლეკულათა ეს ჯგუფი.

ნახაზ 10-ზე მოცემულია ტიპიური შთანთქმა კაროტინის და ქლოროფილის (a,b), საიდანაც თვალნათლივ ჩანს თუ რამდენად განსხვავებული სპექტრები აქვთ ამ ცილებს, რაც ხაზს უსვამს იმას თუ რამდენად ინფორმატიულია სპექტროფოტომეტრები ნივთიერებების დასახასიათებლად და იდენტიფიცირებისთვის.



ნახ.10. ქლოროფილის და კაროტინის ტიპიური სპექტრები

განსხვავებული ცილებს გააჩნიათ განსხვავებული სპექტრები - მათ არ შეიძლება ქონდეთ ერთი და იგივე ტალღის სიგრძეზე შთანთქმის მაქსიმუმი და ერთნაირი ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობები (განსხვავებულ მოლეკულებს სპექტრებიც აქვთ განსხვავებული). ამრიგად, ცილების სპექტროსკოპულად დასახასიათებლად საკმარისია ვიცოდეთ ტალღის სიგრძეები, რომელზედაც ცილას გააჩნია შთანთქმის მაქსიმუმი/მინიმუმი და შესაბამისი ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობები, რაც სრულიად საკმარისია ცილების იდენტიფიკაციისათვის (მაგალითად, იხილეთ ქლოროფილის და კეროტინის სპექტრები, ნახ.10).

ზოგიერთი ტიპის ფართედ გავრცელებული ბიოლოგიურად მნიშვნელოვანი მოლეკულებისთვის (მაგალითად ამინომჟავეების, ნუკლეოტიდების, დნმ, რნმ და სხვა) ლიტერატურაში მოიპოვება მათთვის დამახასიათებელი $\lambda_{მაქ}$ -ის და შესაბამისი ექსტინციის კოეფიციენტის, ε - ს მნიშვნელობები. ტაბულა 2 -ში მოცემულია ზოგიერთი ბიოლოგიური წარმოშობის მოლეკულების მონაცემები, საიდანაც ნათელად ჩანს, რომ სპექტროფოტომეტრულად მარტივია მოხდეს თითეული მოლეკულის იდენტიფიცირება. როგორც ზემოთ ავღნიშნავდით მოლეკულის მიერ სინათლის ტალღის შთანთქმის ხასიათი დამოკიდებულია როგორც მოლეკულის ქიმიურ

შემადგენლობაზე, ასევე მოლეკულის სტრუქტურაზე და მის გარემომ-ცველ გამხსნელის პარამეტრებზე. ქრომოფორის სპექტრზე გავლენის მოხ-დენა შეუძლია მის მახლობლობაში მყოფ მეზობელ მოლეკულებსაც, ანუ თუ მოლეკულა, ან მოლეკულაში არსებული ქიმიური ჯგუფები, რომელიც სინათლის მიმართ მგრძნობიარობით გამოირჩევა (წარმოადგენს ქრომო-ფორს), თუ ისინი წარმოქმნიან კომპლექს სხვა მოლეკულებთან, ან სხვა ქიმიურ ჯგუფებთან, მაშინ მოსალოდნელია მოხდეს მოლეკულის სპექ-ტრების ცვლილება – შეიცვალოს მოლეკულის შთანთქმის პარამეტრები (შთანთქმის ტალღის სიგრძე, ექსტინციის კოეფიციენტი). განვიხილოთ ზო-გიერთი ფაქტორის გავლენა მოლეკულის ან მის შემადგენლობაში მყოფი ქრომოფორის ჯგუფის სპექტრზე, საიდანაც შეიძლება გაკეთდეს გარკვეული დასკვნები მოლეკულის სივრცული სტრუქტურის და მისი ცვლილების შესახებ, რაც მეტად მნიშვნელოვანია.

ქვემოთ მოყვანილია ზოგიერთი გარემო პარამეტრების გავლენა მოლე-კულების სპექტრზე:

- pH –ის ეფექტი.

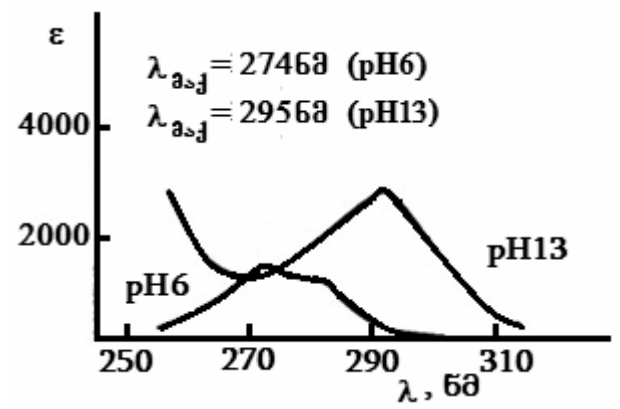
ცნობილია, რომ ხსნარის pH-ი განსაზღვრავს თუ როგორი იქნება მოლე-კულის ან მისი სტრუქტურაში არსებული ქრომოფორის იონიზაციის ხარისხი, რაც იწვევს ქრომოფორის შთანთქმის პარამეტრების ცვლილებას. ნახ.7-ზე მოცემულია ტიროზინის სპექტრის

ტაბულა 2. ზოგიერთი ამინომჟავეების და ნუკლეოტიდების შთანთქმის ტალღის სიგრძის მაქსიმუმზე მოლარული კოეფიციენტის მნიშვნელობები. (ნეიტრალურ pH -ის პირობებში).

შემცველობა	$\lambda_{მაქ}$, ნმ	ε -ის მნიშვნელობა $\lambda_{მაქ}$ **($x10^{-3}$)**
ტრიფტოფანი*	280	5,6
	219	47,0
ტიროზინი*	274	1,4
	222	8,0
	193	48,0
ფენილალანინი*	257	0,2
	206	9,3
	188	60
ჰისტიდინი*	211	5,9
ცისტეინი*	250	0,3
ადენინი	260,5	13,4
ადენოზინი	259,5	14,9
გუანინი	246	10,7
გუანოზინი	252,5	13,6
ციტოზინი	267	6,1
ციტიდინი	271	9,1
ურაცილი	259,5	8,2
ურიდინი	261,1	10,1
თიმინი	264,5	7,9
თიმიდინი	267	9,7
ორჯაჭვიანი დნმ	258	6,6
რნმ	258	7,4
* სხვა ამინომჟავეების შთანთქმა უმნიშვნელოა.		

ცვლილება გამოწვეული გამხსნელის pH-ის ცვლილებით. აღსანიშნავია, რომ ხსნარის pH-ს ცვლილება ყველა სახის ქრომოფორისთვის იწვევს სპექტრის $\lambda_{მახ}$ – ის წანაცვლებით გრძელტალღიან უბანში. ტიროზინის შემთხვევაში,

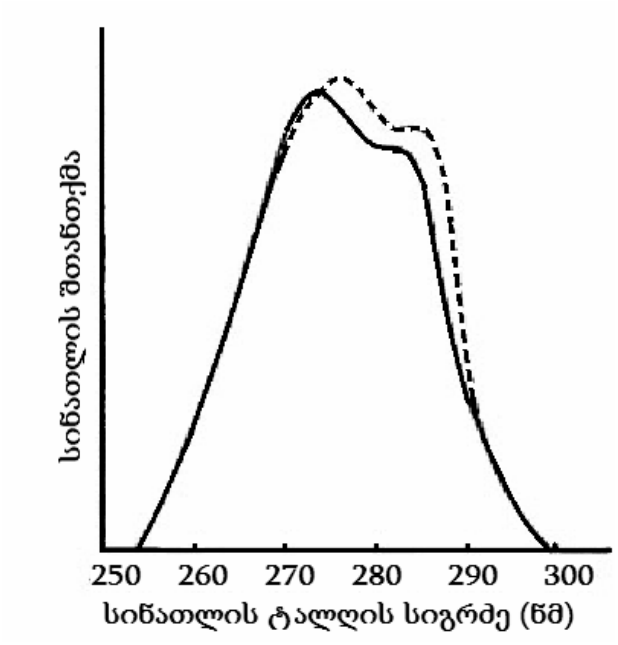
რომელიც მოყვანილია ნახ.11-ზე განპირობებულია გამხსნელის ტუტე არეში ტიროზინის ფენოლური OH- ჯგუფის დისოციაციით.



ნახ.11 ტიროზინის სპექტრები სხვადასხვა მჟავიანობისას

• გამხსნელის პოლარობის ეფექტი.

თუ მოლეკულის შემადგენლობაში პოლარული ქრომოფორია, მაშინ პოლარულ გამხსნელში მოლეკულის სპექტრის მაქსიმუმი წაინაცვ-ლებს უფრო მოკლეტალღიან უბანში ($\Delta\lambda_{\text{მახ}}<0$). შესაბამისად თუ ასეთი მოლეკულას მოვათავსებთ არა პოლარულ გამხსნელში მოლეკულის სპექტრის მაქსიმუმი ($\Delta\lambda_{\text{მახ}}>0$) გადაინაცვლებს გრძელტალღიან უბანში.



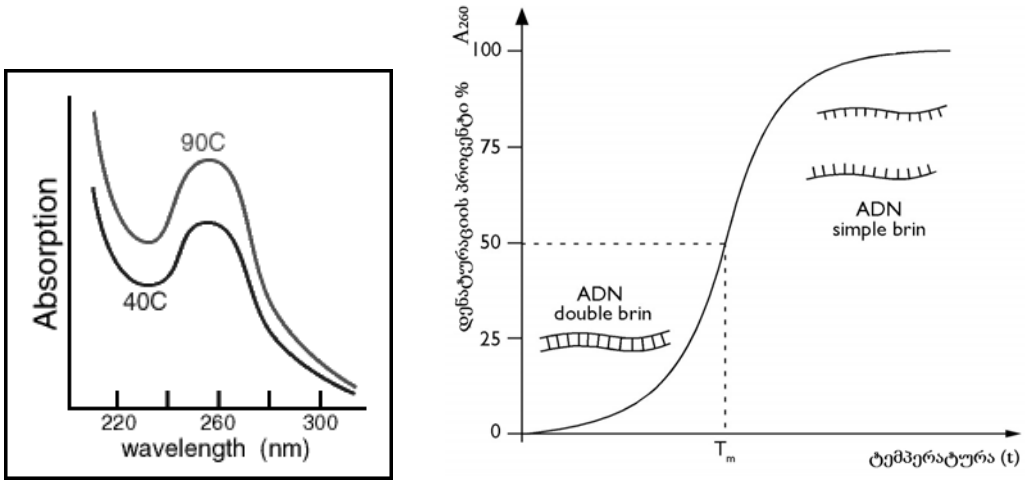
ნახ.12. ტიროზინის სპექტრის (უწყვეტი) ცვლილება ხსნარში ეთინელგლიკოლის დამატებისას (წყვეტილი)

• ქრომოფორის ურთიერთგანლაგება

მოლეკულისთვის $\lambda_{მახ}$ – ის და ε - ის მნიშვნელობები დამოკიდებულია მოლეკულის გეომეტრიულ პარამეტრებზე და სტრუქტურის თავისებურებებზე. ნაგულისხმებია მოლეკულაში არსებული ქრომოფორების ურთიერთგანლაგება, რაც განსაზღვრავს მოლეკულის შთანთქმის სპექტრის სახეს, რაც აუცილებლად შეიცვლის თავის მნიშვნელობას თუ ადგილი ექნება ამ ქრომოფორების ნებისმიერ ურთიერთგანლაგების ცვლილებას. ამის დასტურად გამოდგება დნმ-ის მოლეკულაში არსებული ნუკლეოტიდების (რომლებიც შეგვიძლია განვიხილოთ ქრომოფორებად) განლაგების ცვლილებისას სპექტრული პარამეტრების ცვლილების კონტექტში. საქმე ეხება ე.წ. ჰიპერქრომულ ეფექტს, რომელიც მდგომარეობს იმაში, რომ ნატიური ორჯაჭვიანი დნმ-ს შთანთქმა არის უფრო მცირე ($\lambda_{მაქ}$ = 260 ნმ დროს), ვიდრე

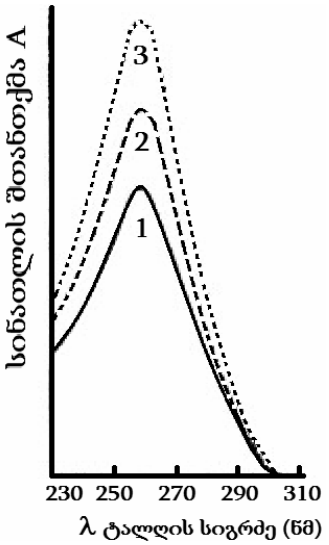
დენატურირებული (გაშლილი) მოლეკულის შთანთქმის სპექტრი, რომელიც ნატიური მოლეკულის სპექტრთან შედარებით გაზრდილია დაახლოებით 40% -ით.

ნახაზ 13-ზე მოცემულია დნმ-ის ხსნარის შთანთქმის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე. ტემპერატურა იწვევს დნმ-ის მოლეკულის დენატურაციას, ორმაგ სპირალარული სტრქტურა იშლება ცალკეულ დნმ-ის ძაფებად და როგორც სურათიდან ჩანს ტემპერატურის გაზრდით ადგილი აქვს მოლეკულის ძაფების დაცილებას ერთმანეთის მიმართ, რის შედეგადაც მოლეკულის სინათლის შთანთქმის სიდიდე ხდება უფრო მეტი, ვიდრე ორმაგსპირალური, ნატურალური დნმ-ის შთანთქმის მნიშვნელობა. კონკრეტულად, თუ ნატიური დნმ-ი დაბალ ტემპერატურებზე (ოთახის ტემპერატურა) იმყოფება მთლიანად სპირალურურ მდგომარეობაში, მაშინ დენატურაციის შემდეგ (მაგალითად, 90^{0}C-ზე) λ = 260 ნმ ტალღის სიგრძის დროს ადგილი ექნება შთანთქმის მომატებას ~40%-ით.



ნახ.13 დნმ-ის ტემპერატურული დენატურაციის სპექტროფოტომეტრული კვლევის შედეგები

ნახაზ 14-ზე მოყვანილია ფაგური ორჯაჭვიანი (1), ერთჯაჭვიანი (2) დნმ-ებისა სპექტრები და მხოლოდ ნუკლეოტიდების ნარევის სპექტრი (3). სპექტრების შედარებით შესაძლებელია გაკეთდეს ერთმნიშ-ვნელოვანი დასკვნა, რომლის მიხედვითაც ნუკლეოტიდის ექსტინციის კოეფიციენტი მცირდება მას შემდეგ, რაც ნუკლეიტიდები წარმოქმნიან პოლინუკლეოტიდურ ჯაჭვს ანუ ერთჯაჭვიან დნმ-ს ე.ი. ნუკლეო-ტიდების დაახლოებამ ერთმანეთთან ერთჯაჭვიან დნმ-ის შემადგენ-ლობაში იწვევს შთანთქმის შემცირებას. უფრო მოწესრიგებული ორ-ჯაჭვიანი დნმ-ის კუთრი შთანთქმის კოეფიციენტი უფრო მცირეა, ვიდრე ერთჯაჭვიანი დნმ-ისა. გამოდის, რომ ნუკლეოტიდები რაც უფრო მეტად მოწესრიგებულ სტრუქტურას წარმოქმნის მით უფრო ნაკლებია ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობები (ასევე იხილეთ ტაბულა 2).



ნახ.14. ერთი და იგივე ნუკლეოტიდების შემცველი ორჯაჭვიანი (1), ერთჯაჭვიანი (2) და ნუკლეოტიდების ნაკრების (3) სპექტრები

თუ მოლეკულა განიცდის სტრუქტურულ ცვლილებებს, რომელიც გამოწვეულია სხვადასხვა სახის (ფიზიკური, ქიმიური, ბიოლოგიური) ზემოქმედებისას ეს ინფორმაცია აისახება მოლეკულის სპექტრ ის ცვლილებაში და პირიქით, თუ მოლეკულის სპექტრი შეიცვალა ეს ნიშნავს, რომ მოლეკულამ განიცადა გარკვეული გარე (ფიზიკური, ქიმიური, ბიოლოგიური) ზემოქმედება.

უნდა აღინიშნოს შემდეგი – მოლეკულის შთანთქმის (A) და სინათლის შთანთქმის მაქსიმუმის შესაბამისი ტალღის სიგრძის ($\lambda_{მაქ}$) მნიშვნელობის ცოდნით შეგვიძლია მოლეკულის იდენტიფიცირება და განვსაზღროთ მისი კონცენტრაცია, მაშინ როდესაც ამ პარამეტრების ცვლილებით შესაძლებელია დადგინდეს მოხდა თუ არა მოლეკულის გარემოცვის ცვლილება, ან წარმოქმნა თუ არა მოლეკულამ სხვა მოლეკულებთან კომპლექსი.

<u>დამატება</u>

აუქსოქრომები, ეს ისეთი ფუნქციონური, მაგალითად, *–OH, –OR, –NH₂* ჯგუფებია, რომლებიც შეუკავშირდება რა ქრომოფორებს თავისი გაუწყვილებელი ელექტრონებით, წარმოქმნიან ახალ, განსხვავებულ ქრომოფორს.

ხსნარის მიერ გარკვეულ ტალღის სიგრძის სინათლის შთანთქმის ინტენსივობაზე (მუდმივი კონცენტრაციის პირობებში) გავლენას ახდენს გამხსნელის ფიზიკო-ქიმიური თვისებები (ბუნება), რომელშიც გახსნილია ქრომოფორი მოლეკულა. კერძოდ, გამხსნელის პოლარობის ხარისხზე და მისი შეცვლით იქნება დამოკიდებული თუ როგორ შეიცვლება მოლეკულის შთანთქმა და როგორ წაინაცვლებს შთანთქმის ტალღის მაქსიმუმი (λ_{max}), რომელიც შეიძლება იყოს როგორც გრძელტალღიან, ისევე მოკლეტალღიან უბნებისკენ.
სპექტრული ცვლილებების ხასიათი შეიძლება გამოწვეული იყოს:
ა) ბატოქრომული ეფექტით - გრძელტალღიანი წანაცვლება, რომელიც შეიძლება მოხდეს ალკილური ჯგუფის სიახლოვით ქრომოფორთან;
ბ) ჰიპსოქრომნული წანაცვლებით (ლურჯი წანაცვლება) – ზოლის წანაცვლება მოკლე ტალღებისკენ;
გ) ჰიპერქრომული ეფექტი – შთანთქმის ზოლის ინტენსივობის გაზრდა (მუდმივი შთანთქმის ტალღის სიგრძის მაქსიმუმის პირობებში);
დ) ჰიპოქრომული ეფექტი-შთანთქმის ზოლის ინტენსივობის შემცირება (მუდმივი შთანთქმის ტალღის სიგრძის მაქსიმუმის პირობებში);

5. კავშირი ბიოპოლიმერების სტრუქტურასა და სინათლის შთანთქმის კანონებს შორის

• ცილის და ამინომჟავეების შთანქმის სპექტრები

ზოგიერთი ცილის შემთხვევაში ამინომჟავებისაგან გამოარჩევენ ისეთი ამინომჟავეებს, რომლის გარეშეც მოცემული ცილა თავის ფუნქციას ვერაფრით ვერ შეასრულებს. მიზეზი კი ის არის, რომ ისინი იმყოფებია სტრუქტურაში იმ ადგილას, რასაც ეძახიან ცილის აქტიურ ცენტრს. აქედან გამომდინარე მნიშვნელობანია ვიცოდეთ თუ როგორ გარემოპირობებში იმყოფება ეს ამინომჟავეები ცილის აქტიურ ცენტრში. ამ ინფორმაციის გარკვევა შესაძლებელია სპექტრომეფოტმეტრის მეშვეობით. მაგალითად, ტიროზინის სპექტრი განსხვავებული იქნება იმის მიხედვით, თუ როგორია მისი გარემოცვა, ანუ იგი იმყოფება არაპოლარულ თუ პოლარულ გარემოცვაში. შეგახსენებთ, რომ თვითონ ტიროზინი პოლარული ბუნების ამინომჟავაა. თუ ტიროზინი გახსნილია წყალში და წყალხსნარს შეერევა ეთინელგლიკოლი, მოხდება ხსნარის პოლარობის შეამცირება, რაც მომენტალურად აისახება ტიროზინის სპექტრში, მოხდება სპექტრის ცვლილება – ტიროზინის სპექტრის λმაქ - ი და ε - ი განიცდის მნიშვნელოვან ცვლილებას (ნახ.12).

სპექტროსკოპიული მეთოდის საშუალებით შესაძლებელია მიღებული იყოს მეტად მნიშვნელოვან ინფორმაცია ცილის სტრუქტურის შესახებ, კერძოდ შეიძლება თუ სად არიან განლაგებული ამინომჟავეები ცილის სტრუქტურაში – მის ზედაპირზე თუ ცილის შიგნით. ამისათვის იყენებენ ისეთ კვლევებს, რომელიც დაკავშირებულია ცილების გატიტვრით გამოწვეულ ცვლილებებზე, რომელიც ცილის სპექტრის ცვლილებებში აისახება. ქვემოთ მოყვანილია ზოგიერთი მაგალითი ასეთი კვლევებისა.

ა) ამინომჟავა, რომელიც შედიც ცილის სტრუქტურაში და მისი შთანთქმის სპექტრული პარამეტრები $\lambda_{მაქ}$ და ε გაზრდილია, ვიდრე იგივე ამინომჟავას პარამეტრები თავისუფალ მდგომარეობაში (არა ცილის შემადგენლობაში და პოლარულ გამხსნელში) (ნახ.8), ასეთი მონაცემები სრულიდ საკმარისია, რომ შეიძლებოდეს გაკეთდეს დასკვნა, – ამინომჟავა არის ცილის გლობულას შიგნით "დამალული" და იმყოფება არაპოლარულ გარემოში, სადაც წყალი (პოლარული გამხსნელი) ვერ აღწევს.

ბ) თუ ცილის დენატურაციისას ადგილი აქვს ამინომჟავას სპექტრში $\lambda_{მაქ}$-ის ლურჯ წანაცვლებას (წანაცვლება უფრო მოკლეტალღური სინათლისკენ) და ამავე დროს შთანთქმის ექსტინციის კოეფიციენტი ε შემცირებულია ნატიურ მდგომარეობასთან შედარებით, მაშინ ეს ამინომჟავა უნდა იმყოფებოდეს ცილის გლობულის შიგნითა ნაწილში არაპოლარულ გარემოცვაში. ცნობილია, რომ ცილის დენატურაციას თან ახლავს წყლის შეღწევა ცილის გლობულაში (ცილის დენატურაციისას მისი სიბლანტე იზრდება).

გ) ზოგადად, თუ ცილის სპექტრი აღმოჩნდა მგრძნობიარე გამხსნელის პოლარობის ცვლილების მიმართ, მაშინ ქრომოფორი ამინომჟავა იმყოფება ცილის სტრუქტურის ზედაპირზე პოლარულ ნაწილში.

დ) თუ ცილის სტრუქტურაში არსებული ამინომჟავის დამახასიათებელი სპექტრის პარამეტრები არ ამჟღავნებს მგრძნობიარობას გამხსნელის პოლარობის ცვლილების მიმართ, მაშინ ამინომჟავა იმყოფება ცილის შიგნით (გამხსნელის პოლარობის შეცვლა ვერ აღწევს ცილის შიგნით).

ე) ცილის pH-ით გატიტვრით და გადაღებული სპექტრების ანალიზით შესაძლებელია დადგენილი იყოს ამინომჟავების, მაგალითად, OH ტიროზინის ან SH ცისტეინის ცილის სტრუქტურაში მდებარეობა.

ვ) თუ ცილის pH-ით გატიტვრისას ადგილი არ აქვს ამინომჟავას სპექტრის ცვლილებას, მაშინ ამინომჟავა ცილის გლობულას შიგნით არის

“დამალული”, ვინაიდან ცილის მჟავიანობის ცვლილება, ვერ აღწევს ცილის შიგნით.

ზ) თუ გამხსნელის pH – ის ცვლილება აისახება ამინომჟავას სპექტრის ცვლილებაში, მაშინ ეს ამინომჟავა* იმყოფება ცილის ზედაპირზე.

- დნმ-ის შთანქმის სპექტრების ანალიზი

ცნობილია, რომ დნმ-ის მოლეკულის შემადგენლობაში მყოფ პურინის და პირიმიდინის ციკლური მოლეკულებს (აზოტოვზნი ფუძეები) გააჩნიათ მათთვის დამახასიათებელი შთანთქმის სპექტრები, შესაბამისი კარგად არის ცნობილია თითეოეული მათგანის $\lambda_{მაქ}$ და ε მნიშვნელობები (ცხრილი 2). როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ თუ ნუკლეოტიდები განთავსებულია ერთმანეთის გვერდით, რომლებიც ერთმანეთთან გარდა წყალბადური კავშირებისა წარმოქმნიან სტეკინგ ურთიერთქმედებასაც, მაშინ მოლეკულის (დნმ -ის მოლეკულა) სინათლის შანთქმა $\lambda_{მაქ}$ -ის მნიშვნელობაზე არის მცირე სიდიდის, ვიდრე თავისუფალი ნუკლეოტიდებისა (იგივე შემადგენლობის) და შთანთქმა განსაზღვრულია შემდეგი კანონზომიერებით: თავისუფალი ნუკლეოტიდების შთანთქმა მეტია, ვიდრე ფუძეებისა, რომლებიც იმყოფებიან ერთჯაჭვიან პოლინუკლეოტიდის შემადგენლობაში, სადაც არ არსებობს სტეგინკ ურთიერთქმედება (გაშლილი ჯაჭვი). თავისა მხრივ თუ ჯაჭვები დაეხვევა სპირალში და გაჩნდა სტეგინკ ურთიერთქმედებანი ნუკლეოტიდებს შორის, ამით მოლეკულის შთანთქმა მცირდება.

თუ ხსნარი წარმოადგენს სუსპენზიას, ანუ ხსნარში იმყოფება შედარებით დიდი ზომის (მასის) ნაწილაკები, რომლებიც შეტივტივებულ მდგომარეობაში არიან, მაშინ ასეთი ხსნარის ოპტიკური თვისებები განსხვავებულია. საქმე იმაშია, რომ სპექტრფოტომეტრზე მიღებული სინათლის შთანთქმა

განპირობებულია არა ნაწილაკების მიერ სინათლის შთანთქმით, არამედ იმით, რომ ეს ნაწილაკები სინათლეს გააბნევენ (რომლებიც ხელსაწყოს დეტექტორს ვერ აღწევს). უჯრედების, ბაქტერიების, ვირუსების და სხვა მასიური ნაწილაკების რიცხვს (რომლებიც სუსპენზიას წარმოქმნიან ხსნარში ერთ მილილიტრში) ნაწილაკების ტიტრს ეძახიან. თუ სინათლე ეცემა ასეთ ნაწილაკებს სუსპენზიაში, მაშინ მოხდება სინათლის გაიბნევა ნაწილაკებზე და სუსპენზია თეთრი ფერის შეფერილობას იძენს. რაც უფრო ნაწილაკების ტიტრი დიდია სუსპენზია მით უფრო თეთრი შეფერილობისაა და გა-უმვირვალეა. დადგინილია, რომ გაბნეული სინათლის ინტენსივობის სიდი-დე, გარდა გახსნილი ნაწილაკების ტიტრისა, ასევე დამოკიდებულია დაცე-მული სინათლის ტალღის სიგრძეზე, რომელიც აღიწერება რელეის კანონით. რელეის გაბნევის კანონის თანახმად გაბნეული სინათლის ინტენსიობა დამოკიდებულია როგორც ნაწილაკების ზომებზე ასევე დაცემული სინათ-ლის ტალღის სიგრძეზე (მუდმივი ტიტრის პირობებში), კერძოდ, გაბნეული სინათლის ინტენსივობა უკუპროპორციულია სინათლის ტალღის სიგრძეზე, როგორც λ^{-4}.

6. აბსორბციული სპექტროსკოპიის გამოყენების მაგალითები

- დნმ-ის კონცენტრაციის განსაზღვრა

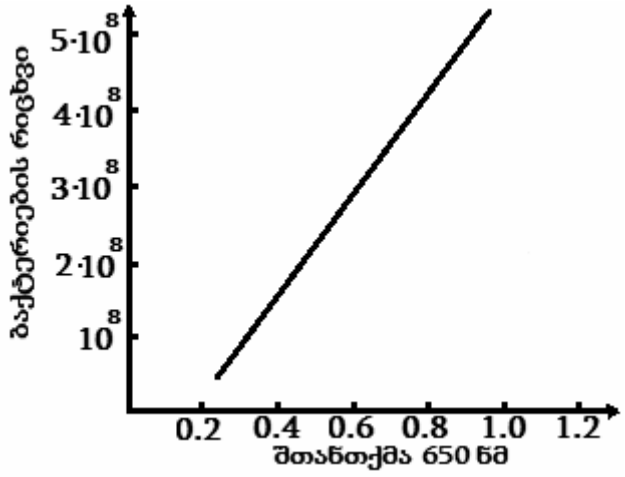
ლამბერტ-ბერის კანონი იძლევა საშუალებას განისაზღვროს ბიომო-ლეკულების კონცენტრაცია, რისთვისაც საჭიროა ვიცოდეთ ბიომოლეკულის ექსტინციის კოეფიციენტი. (2) ფორმულიდან გამომდინარე, სპექტროსკო-პულად, შეიძლება განსაზღვრული იყოს მოლეკულების კონცენტრაცია ხსნარში, რისთვისაც შეგვიძლია ვისარგებლოდ ფორმულით:

$$c=\varepsilon/d\cdot OD \quad (7)$$

დნმ-ის მოლეკულის შემთხვევაში, ექსტინციის კოეფიციენტის მნიშვნელობით 50 მკგ/მლ კონცენტრაციის დნმ-ისთვის (შეგვიძლია დნმ-ის მოლარული კონცენტრაცია განისაზღვროს მოლარული ექსტინციის კოეფიციენტის გამოყენებით - 6600 OD/მოლ; ცხრილი 2) დნმ-ის შთანთქმა $\lambda_{მაქ}$=260ნმ ტალღის სიგრძეზე, შეადგინა OD_{260}=1-ს. აქვე გვინდა ავღნიშნოთ, რომ ექსტინციის კოეფიციენტის ეს მნიშვნელობა არის მიახლოებითი, ვინაიდან იგი იცვლება, ე.ი დამოკიდებულია როგორც გამხსნელის თვისებებზე, ასევე ნუკლეიტიდურ წყვილების პროცენტულ შემადგენლობაზეც, ანუ G-C და A-T წყვილების თანაფარდობაზე. ქვემოთ მოყვანილია მაგალითი თუ პრაქტიკულად როგორ განისაზღვრება დნმ-ის კონცენტრაცია ხსნარში. დაუშვათ ერთ სანტიმეტრის სისქის კიუვეტაში დნმ-ის ხსნარის შთანთქმა, λ=260ნმ სინათლის ტალღის სიგრძეზე შეადგინა OD_{260}=2 ერთეული, მაშინ (7) ფორმულის თანახმად დნმ-ის კონცენტრაცია ხსარში ტოლი იქნება 100 მკგ/მლ-ის. თუ არმოჩნდა, რომ საწყისი დნმ-ის ხსნარის შთანთქმა იქნება უფრო მეტი ვიდრე OD_{260}>2 ერთეული, მაშინ უნდა გვახსოვდეს, რომ მოსალოდნელია დარღვეული იყოს კონცენტრაციის პროპორციულობა შთანთქმის კოეფიციენტის მიმართ (აღარ არის სწორე მე- 7 ფორმულა). ზემოთ აღინიშნა, რომ ლამბერტ-ბერის კანონი სამართლიანია მხოლოდ ხსნარის მცირე კონცენტრაციის დროს, რომელიც ირღვევა დიდი კონცენტრაციის პირობებში (მოლეკულების ექსტინციის კოეფიციენტი დამოკიდებულია კონცენტრაციაზე). ასეთ შემთხვევაში საჭიროა ხსნარი განვაზავოთ მანამდე, სანამ ხსნარის შთანთქმა არ იქნება მცირე, ვიდრე OD_{260}=2. არ უნდა დაგვავიწყდეს, რომ ხსნარის საწყისი კონცენტრაციის გასაგებად (მაგალითად, დნმ-ის) საჭიროა გაზომილი კონცენტრაციის მნიშვნელობა გავამრავლოთ განზავების კოეფიციენტზე, რითიც მიიღება საწყისი დნმ-ის ხსნარის კონცენტრაცია.

- ბაქტერიების ტიტრის განსაზღვრა

ქვემოთ მოყვანილია ის მიდგომა, რომელიც მოგვცემს საშუალებას სპექტროფოტომეტრული მეთოდით, ნაკლები ცდომილებით განვსაზღროთ ბაქტერიის ტიტრი. როგორც აღინიშნა ბაქტერიის მიერ დაცემული სინათლის გაბნევა მით უფრო ინტენსიურია, რაც უფრო დიდია ბაქტერიების ტიტრი. გაბნევის სინათლის ტალღის სიგრძეზე დამოკიდებულების (რელეის გაბნევის კანონი) გათვალისწინებით, ცდომილება შესაძლებელია მინიმუმამდე იქნას დაყვანილი. კერძოდ, საჭიროა, რომ სუსპენზიის გაბნევა განისაზღვროს λ=650ნმ-ი ტალთის სიგრძისას, ვინაიდან უფრო მოკლე ტალღის სიგრძის დროს გარდა გაბნევის ეფექტისა, სპექტროფოტომეტრით მიღებულ მნიშვნელობაში იქნება ბაქტერიის (მასში შემავალი მოლეკულების) შთანთქმის კომპონენტიც, რომლის გათვალისწინებაც იქნება რთული. უცნობი ბაქტერიის ტიტრის დასადგენად პირველ რიგში საჭიროა მოხდეს სპექტროფოტომეტრის დაკალიბრება ბაქტერიის ცნობილი ტიტრის გამოყენებით, რისთვისაც აიგება საკალიბრო მრუდი, რომელიც გამოხატავს დამოკიდებულებას ბაქტერიულ ტიტრსა (რომელიც განისაზღვრება ბიოლოგიური მეთოდით) და სინათლის შთანთქმას λ=650ნმ-ზე ტალღის სიგრძისთვის. დასაკალიბრებელი ბაქტერიის ტიტრი ისაზღვრება ბიოლოგიური მეთოდით, ხოლო უცნობი ბაქტერიული ტიტრის დადგენისათვის გამოიყენება საკალიბრო მრუდი. საკალიბრო მრუდის მაგალითი მოცემულია ნახ.15-ზეა მოცემული.

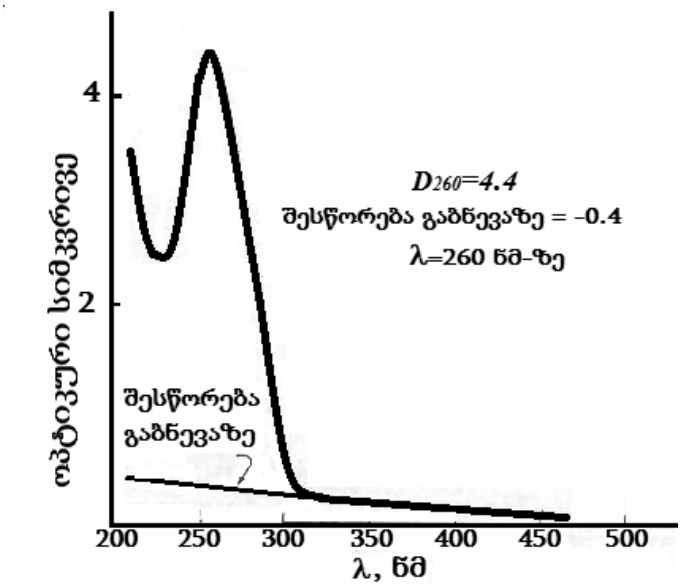


ნახ.15 ბაქტერიების საკალიბრო მრუდი

- ფაგების დნმ-ის შთანთქმის სპექტრის კორექტირება

ფაგები, ისევე როგორც ბაქტერიები წარმოქმნიან სუსპენზიას, შესაბამისად შესაძლებელია სპექტროფოტომეტრული მეთოდით დიდი სიზუსტით განისაზღვროს ბაქტერიოფაგების მცირე რაოდენობა ხსნარში. წარმოდგენილი მეთოდი ემყარება შემდეგ მიდგომას: განსხვავებით ბაქტერიული სუსპენზიისაგან ფაგების შემადგენლობაში მყოფი დნმ-ის მოლეკულას გააჩნია დიდი ინტენსივობის შთანთქმა λ_{max} =260ნმ –ისას, რაც იძლევა იმის შესაძლებლობას შეფასდეს ფაგის რაოდენობა სუსპენზიაში. გასათვალისწინებელია ის გარემოება, რომ ფაგურ სუსპენზიას გააჩნია რელეის გაბნევა, მითუმეტეს აქ ლაპარაკია ძალიან მოკლე ტალღის სიგრძის სინათლეზე (260ნმ), სადაც შესამჩნევი სისდიდისაა რელეის გაბნევა. ამიტომაც საჭიროა მოხდეს შთანთქმის კოეფიციენტის კორექტირება რელეის გაბნევაზე. ნახაზ 16-ზე მოცემულია ტიპიური სურათი ფაგური სუსპენზიის შთანთქმის სპექტრი. ამ ნახაზის მიხედვით რელეის გაბნევა გამოხატულია აბსცისათა ღერძის მიმართ სპექტრის არა პარალელურობაში (ნახ.16). შესაძლებელია, რომ დნმ-

ის შთამთქმის მნიშვნელობა იყოს კორექტირებული რელეის გაბნევის გათვალისწინებით, რისთვისაც საჭიროა სპექტრის გაბნევის მრუდის ექსტრა-პოლაცია λ_{max} =260ნმ წერტილში, როგორც ეს ნახაზ 16-ზეა მოყვანილი. ცხადია, რომ ამ შემთხვევაში ფაგური დნმ-ის კონცენტრაცია განისაზღვრება არა ნულოვანი დონიდან არამედ ექსტრაპოლირებული მრუდიდან λ_{max} =260ნმ წერტილში.



ნახ. 16. T7 ფაგის სპექტრი, სადაც ნათლად ჩანს, რომ რელეეს კანონის თანახმად ფაგების სუსპენზია გააბნევს მასზე დაცემულ სინათლეს
ნაჩვენებია თუ როგორ ხდება სინათლის გაბნევით გამოწვეული შთანთქმის მნიშვნელობის გათვალისწინება

დამატება

სპექტროფოტომეტრული მეთოდით დნმ-ის შემცველი ვირუსების ტიტრის განსაზღვრა

შესაძლებელია განისაზღვროს დნმ-ის შემცველი ვირუსების ტიტრი სუსპენზიაში, იმ პირობით თუ ცნობილია ვირუსში შემავალი დნმ-ის მოლეკულური მასა ($M_{\text{დნმ}}$) . ცნობილია, რომ ვირუსებში არსებობს ერთი დნმ-ის მოლეკულა, რაც გამოიყენება იმისთვის, რომ რა მოლარული კონცენტრაციის იქნება დნმ-ი, იგივე რაოდენობა (კონცენტრაციის) იქნება სუსპენზიაში ვირუსული ნაწილაკიც. ვირუსული დნმ-ის მოლარული კონცენტრაციის გაგებისათვის კი საჭიროა ვიცოდეთ ვირუსული დნმ-ის შთანთქმის ზუსტი მნიშვნელობა

(OD), რომლის განსაზღვრაც შესაძლებელია და განისაზღვრება იმ მიდგომით, რომელიც ზემოთ არის მოყვანილი.

$c=\varepsilon/d\cdot OD$ (7 ფორმულა) ფორმულის გამოყენებით შეგვიძლია გავიგოთ დნმ-ის კონ-ცენტრაცია, რისთვისაც საჭიროა ვიცოდეთ ვირუსული დნმ-ის შთანთქმა (OD) და მისი მოლარული ექსტინციის კოეფიციენტი ε=6600/მოლი დნმ-ის ბაზისური წყვილი. თუ ამმნიშვნელობებს შევიტანთ ფორმულაში ამით ჩვენ გავიგებთ დნმ-ის ბაზისურ წყვილების რაოდენობას 1 ლიტრ გამხსნელში. იმისათვის, რომ გავიგოთ თუ რამდენი ბაზისური წყვილისაგან შედგება $M_{\text{დნმ}}$ (დალტონი) მასის დნმ-ი ამით შესაძლებელია გავიგოთ დნმ-ი მოლეკულების რიცხვი (1 ლიტრ გამხსნელში). ცნობილია, რომ დნმ-ის ერთი ბაზისური წყვილების მოლეკულური მასა შეადგენს 650 დალტონი/მოლი, მაშინ $M_{\text{დნმ}}/650$ იქნება ერთ ვირუსულ დნმ-ში ბაზისური წყვილების რაოდენობის. მარტივი მისახვედრია, რომ 1 მილილიტრში ვირუსული დნმ-ის რაოდენობა და შესაბამისად ვირუსების ტიტრი დაითვლება ფორმულით:

$$c/(M_{\text{დნმ}}/650)= (\varepsilon/d\cdot OD)//(M_{\text{დნმ}}/650)$$

ლიტერატურა:

1. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. М.: Мир, 1980
2. Волькенштейн М.В. Биофизика. М: Наука, 1981

ლაბორატორიული ამოცანები

ამოცანა N 1

სპექტროფოტომეტრულად მაკრომოლეკულების ოპტიკური აქტივობის ოპტიმუმების მოძებნა

ნებისმიერი მაკრომოლეკულა გარკვეულ ტალღის სიგრძეზე შთანთქავენ სინათლის სხივს. ამიტომ საკვლევ ნივთიერების ოპტიკური აქტივობის გამოსავლენად ხდება ნიმუშის ხსნარის შთანთქმის დამოკიდებულების დადგენა სინათლის სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე, რომლიდანაც განისაზღვრება სინათლის ტალღის ის მნიშვნელობა, სადაც საკვლევი მოლეკულა იქნება ოპტიკურად აქტიური.

ცდის მსვლელობა: წინასწარ მზადდება საკვლევი ნივთიერების კონცენტრაციის ხსნარი (მაგალითად, ცილის, რომლის კონცენტრაცია შეადგენს 2მგ/მლ). სპექტროფოტომეტრის საშუალებით 1 მლ-იან კიუვეტაში იზომება საკვლევი ნიმუშის ოპტიკური შთანთქმის მნიშვნელობები სხვადასხვა ტალღის სიგრძეებზე. აიგება მრუდი, რომელიც გამოხატავს მოცემული ხსნარისათვის სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე (აბსცისათა ღერძი) და შთანთქმის (ორდინატა ღერძი) დამოკიდებულებას. მიღებული მრუდიდან მოხდება საკვლევი მოლეკულის ოპტიკური აქტიურობის განსაზღვრა, რომელიც განისაზღრება მრუდის მაქსიმუმით და მისი მნიშვნელობით.

მაგალითად, თუ ნიმუშად აღებული იქნება დნმ-ის მოლეკულა, მაშინ მისი შთანთქმის მაქსიმუმი უნდა შეესაბამებოდეს 260 ნმ-ის ტალღის სიგრძეზე, ხოლო ცილის მაქსიმუმი, როგორც წესი შეიძლება გამოვლინდეს 280 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

მაგალითისათვის, ვთქვათ დნმ-ის ხსნარის ოპტიკური შთანთქმის მნიშ-ვნელობები სვადასხვა სინათლის ტალღის სიგრძეებზე ისეთია, როგორიც მოყვანილი ცხრილში:

ცხრილი

ტალღის სიგრძე	230	240	250	260	270	280	290	300
ოპტიკური შთანთქმა	0,158	0,222	0,355	0,365	0,300	0,197	0,088	0,028

მონაცემების მიხედვით აიგება ხსნარის შთანთქმის (ორდინატა ღერძი) სი-ნათლის ტალღის სიგრძეებზე (აბსცისათა ღერძი) დამოკიდებულების მრუ-დი, რაც არის დნმ-ის შთნთქმის სპექრტრი. მიღებული მრუდის მაქსიმუმი, რომელიც გვიჩვენებს იმ ტალღის სიგრძის მნიშვნელობას (260ნმ-ი), სადაც დნმ-ი არის ოპტიკურად აქტიური.

ამოცანა N 2

ნივთიერების კონცენტრაციის განსაზღვრა (ცილა, დნმ)

სამუშაოს მიზანი: საკვლევი ნივთიერების კონცენტრაციის დადგენა, რისთვისაც სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე (ნმ-ზე) წარმოებს ოპტიკური შთანთქის პარამეტრის რეგისტრირება, ანუ ხდება სპექტრის გადაღება.

ა) ცდის მსვლელობა: წინასწარ მზადდება საკვლევი ნივთიერების წყალხსნარი. მაგალითად, ცილა ქიმოტრიფსინი იხსნება წყალში. როგორც წესი ნატიური ცილები შთანთქავენ სინათლის ულრტაიისფერ უბანში. ამიტომ ულტრაიისფერი უბნის სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე იზომება ოპტიკური შთანთქმა სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით 1 მლ-იან კიუვეტაში. აგებენ დამოკიდებულებას სხვადასხვა ტალღის სიგრძესა

(აბსცისა) და ოპტიკურ შთანთქმას (ორდინატა) შორის. მიღებული გრაფიკის მიხედვით პოულობენ მრუდის მაქსიმალურ წერტილს, რასაც შესაბამება მოცემული ცილის ოპტიკური აქტივობის მნიშვნელობა. მაგალითად, თუ ცილის (უცნობი ცილის) შთანთქმის მაქსიმუმის მნიშვნელობა არის 0,640-ი 280ნმ ტალღის სიგრძეზე, მაშინ შესაძლებელი იქნება დადგინდეს ამ ცილის კონცენტრაცია, რომელიც კიუვეტაში არის მოთავსებული. ამისათვის წინასწარ უნდა იყოს აგებული ცნობილი კონცენტრაციის ცილის (იღებენ, როგორც წესი ალბუმინის ცილას) საკალიბრო მრუდი, სადაც აბსცისათა ღერძზე გადაზომილია ალბუმინის ოპტიკური შთანთქმის მნიშვნელობები (280ნმ-ზე), ხოლო ორდინატთა ღერძზე კი ალბუმინის კონცენტრაციები ხსნარში. ამ მრუდით იძებნება აბსცისთა ღერძზე 0,640 ოპტიკური შთანთქმის შესაბამისი წერტილი, რომელსაც შესაბამება ორდინატთა ღერძზე ცილის რაოდენობას (მაგალითად, 80 მკგ/მლ-ში). ეს ნიშნავს, რომ საანალიზოდ აღებული ცილის კონცენტრაციაა შეადგენს 80 მკგ/მლ-ს.

ბ) ცდის მსვლელობა: წინასწარ მზადდება საკვლევი ნივთიერების წყალხსნარი.

მაგალითად ელენთის დნმ-ის ლიოფილური ნიმუში (წარმოდგენილია თეთრი ძაფების სახით), რომელიც კარგად უნდა გაიხსნას წყალში. ნატივური ნუკლეინის მჟავები შთანთქავენ ულრტაიისფერ უბანში. ამიტომ ულტრა-იისფერი უბნის სხვადასხვა ტალღის სიგრძეზე იზომება ოპტიკური შთანთქმა სპექტროფოტომეტრის გამოყენებით 1 მლ-იან კიუვეტაში.

აგებენ დამოკიდებულებას სხვადასხვა ტალღის სიგრძესა (ორდინატა) და ოპტიკურ შთანთქმას (აბსცისა) შორის. მიღებული გრაფიკის მიხედვით პოულობენ პიკის მაქსიმუმს, რაც შესაბამება მოცემული დნმ-ის აქტივობის მაქსიმუმს. მაგალითად, მიღებული ოპტიკური პარამეტრებიან მაქსიმუმი

არის 0,530 260ნმ-ზე. დნმ-ის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის გამოიყენება პროპორცია, რომელიც

ლიტერატურიდან არის ცნობილი: 260 ნმ-ზე 50 მკგ/მლ დნმ-ის ოპტიკური შთანთქმა არის 1 ერთეულის ტოლი. აქედან გამომდინარე პროპორციის წესით იანგარიშება საკვლევი ნიმუშში დნმ-ის კონცენტრაცია.

მაგალითად, საკვლევი დნმ-ის (X) ოპტ. შთან. 260 ნმ-ზე არის 0,530 და 50 მკგრ - 260 ნმ-ზე 1,0-ია

აქედან X= 50 x 0,530= 26,5 მკგ/მლ

ამოცანა N 3

მაკრომოლეკულების კვლევის სპექტროსკოპული მეთოდი

დნმ-ის პრეპარატის სისუფთავის პარამეტრები

ბიოლოგიური კვლევები გულისხმობს როგორც საფირმო პრეპარატების, ასევე ლაბორატორიულ პირობებში მიღებულ მაკრომოლეკულებზე ექსპერიმენტული კვლევების ჩატარებას. იგულისხმება, რომ ლაბორატორიულ პირობებში მიღებული პრეპარატები უნდა აკმაყოფილებდეს პრეპარატების სისუფთავის (მონო სისტემის) პარამეტრებს. ამიტომ აუცილებელია პარამეტრების მონიტორინგი, რომელიც ეფუძვნება სპექტროფოტომეტრული მონაცემების ანალიზს.

მაგალითისათვის, სხვადასხვა ობიექტებიდან ექსპერიმენტული გზით მოღებული დნმ შესაძლებელია შეიცავდეს ცილურ ან პოლისაქარიდულ მინარევებს. ამის გასაკონტროლებლად საკვლევ დნმ-ის პრეპარატის ოპტიკურ შთანთქმას საზღვრავენ დნმ-ის მაქსიმუმის (260 ნმ), ცილის მაქსიმუმის (280 ნმ) და პოლიოსაქარიდების მაქსიმუმის (230 ნმ) უბნებში.

კონტროლირდება თანაფარდობები 260/280 – ზე (ცილური მინარევი) და 260/230 (პოლისაქარიდული მინარევი)

შენიშვნა: სუფთა დნმ-ის პრეპარატის მახასიათებლებია

1,6 – 2,0 260/280 ნმ

2,0 – 2,5 260/230

მაგალითად, დნმ-ის სავლევი პრეპერატის ოპტიკური შთნთქმის პარამეტრებია:

260 ნმ-ზე -- 0,620 260/280 = 0,620/0,360 = 1,7

280 ნმ-ზე -- 0.360 მაშინ

230 ნმ-ზე -- 0,250 260/230 = 0,620/0,250 = 2,4

ანუ მიღებული პარამეტრები 1,7 და 2,4 დნმ-ის სისუფთავის მოთხოვნებს აკმაყოფილებს და ვარგისია შემდგომი ექსპერიმენტული კვლევებისათვის.

ამოცანა N 4

მაკრომოლეკულების კვლევის სპექტროსკოპული მეთოდი
დნმ-ის ჰიპერქრომული ეფექტის შესწავლა

დნმ-ის მოლეკულა ნატიურ მდგომარეობაში არის ორჯაჭვიანი სტრუქტურა, რომელსაც 260 ნმ ტალღის სიგრძეზე გააჩნია ოპტიკური შთანთქმის მაქსიმუმი. მოლეკულის სტრუქტურის რღვევა შესაძლებელია გამოიწვიოს სხვადასხვა ფაქტორებმა როგორებიცაა ტემპერატურა, ზოგიერთი ქიმიური რეაგენტის დამატებამ და სხვა. ტემპერატურული ზრდის პირობებში ხდება ორჯაჭვიანი დნმ-ის ძაფების განცალკევება, რაც ოპტიკური შთანთქმის პარამეტრის ცვლილებით აისახება. კერძოდ, ადგილი აქვს

ოპტიკური შთანთქმის მატებას, რის მიხედვითაც მსჯელობენ დნმ-ის ძაფების დაცილების ხარისხზე. საბოლოოდ დნმ-ის ძაფების დაცილებით მიიღება დენატურირებული (არა აქტიური) დნმ. ჰიპერქრომული ეფექტი ეს არის ოპტიკური შთანთქმის პარამეტრების სხვაობა მთლიანად ან ნაწილობრივ დენატურირებული დნმ-ის მაჩვენებელსა და ნატივურ მდგომარეობის მაჩვენებელს შორის. პროცენტულად დნმ-ის ჰიპერქრომული ეფექტი სრული დენატურაციისას 40%-ს აღწევს.

ცდის მსვლელობა: დნმ-ის პრეპარატის ნატივური მდგომარეობის ოპტიკური შთანთქმის მაქსიმუმის ისაზღვრება 260 ნმ-ზე 1 მილილიტრიან კიუვეტაში. აიღება მონაცები. შემდგომ დნმ-ის პრეპარატი დენატურირდება, რისთვისაც სადენატურაციო სინჯარით (მაღალტემპერატურის გამძლე) თავ-სდება 100^0 C -ზე 10 წუთის განმავლობაში. ამ პერიოდში ხდება დნმ-ის ძაფების განცალკევება. აღნიშნული დროის გასვლის შემდეგ სადენატურაციო სინჯარა დნმ-ის პრეპარატით სწრაფად გადაიტანება ყინულიანი წყლის აბაზანაში (დნმ-ის ძაფების უკუ აღდგენის (რენატურაცია) თავიდან ასაცი-ლებლად). აითვლება დენატურირებული დნმ-ის ოპტიკური შთანთქმის სიდიდე.

მაგალითად, დნმ-ის ნატივური პრეპარატის ოპტიკური შთანთქმა 260 ნმ-ზე არის 0,440. დენატურაციის შემდეგ (100^0 C-ზე გაცხელება 10 წთ) ოპტიკური შთანთქმა იმავე ტალღის სიგრძეზე გახდა 0,550.

ანგარიში: ნატივური დნმ-ის ოპ. შთ. 0,440 -- 100%

დენატ.- ნატ. სხვაობა 0,550- 0,440=0,110 0,110 -- X

საიდანაც X = (0,110 x 100)/0,440 = 25%

შედეგი: აღნიშნულ პირობებში დნმ-ის პრეპარატი ორჯაჭვიანი სტრუქ-ტურა თითქმის მთლიანად დენატურირდა.

ამოცანა N 5

საკალიბრო მრუდები მაკრომოლეკულების კონცენტრაციის დასადგენად

ბრედფორდის რეაქტივის გამოყენებით ცილის კონცენტრაციის
განსაზღვრა ალბუმინის მაგალითზე;

ბრედფორდის რეაქტივის მომზადება
100 მგ კუმასი G-250 იხსნება 50 მლ 90%-იან სპირტში მაგნიტურ სარეველაზე ენერგიული არავის პირობებში 1 სთ-ის გამმავლობაში. შემდგომ ემატება 100 მლ 85%-იანი H_3PO_4 და მოცულობა გამოხდილი წყლით შეივსება 1 ლიტ-რამდე. მიღებული ნარევი იფილტრება. საღებავი ვარგისია 2 კვირის გან-მავლობაში

ცილის რაოდენობის დასადგენად ოპტიკური შთანთქმის მონაცემის გადაყვანა წარმოებს საკალიბრო მრუდის საშუალებით. საკალიბრო მრუდის ასაგებად აიღება 1 მგ/მლ კონცენტრაციის ალბუმინის ხსნარის განზავებული რაოდენობა, რომელიც შესაბამისად განსხვავებული რაოდენობის ცილებს შეიცავენ. ასე მაგალითად: 5 მკლ (5 მკგ), 10 მკლ (10 მკგ) . . . 50 მკლ (50 მკგ) . . . 90 მკლ (90 მკგ), 100 მკლ (100 მკგ).

თითოეულ ნიმუშს ემატება ცილის საღებავი ბრედფორდის რეაქტივი და მიღებული ლურჯი შეფერვა ისაზღვრება სპექტროფოტომეტრით 595 ნმ ტალღის სიგრძეზე. საკალიბრო მრუდი აიგება ცილის რაოდენობასა (ორ-

დინატა) და ოპტიკურ შთანთქმას (აბსცისა) შორის, რაც პირდაპირპრო-პორციული დამოკიდებულებით გამოიხატება.

უცნობი კონცენტრაციის ნიმუშის ოპტიკური შთანთქმის შესაბამისი წერტილი აღინიშნება აბცსისთა ღერძზე, რომლის გადაკვეთით მრუდზე ცილის შესაბამის რაოდენობას პოულობენ ორდინატაზე.

ცდის მსვლელობა: – მზადდება ცნობილი ცილის (მაგალითად, ალბუმინი) 1 მგ/მლ კონცენტრაციის ხსნარი.

აიღება რამოდენიმე განზავების წერტილი: 5 მკლ (5 მკგ), 10 მკლ (10 მკგ) . . . 50 მკლ (50 მკგ) . . . 90 მკლ (90 მკგ), 100 მკლ (100 მკგ).

- თითოეულ განზავებას ემატებას 1,5 მლ წყალი.
- შემდგომ ემატება 1,5 მლ ბრედფორდის რეაქტივი.

- ინკუბირდება ოთახის ტემპერატურაზე-ზე 20 წთ.
- იზომება ოპტიკური შთანთქმა სპექტროფოტომეტრზე 595 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

მაგალითად, უცნობი კონცენტრაციის ცილის ნიმუშის ოპტიკური შთნთქმა არის 0,400. მაშინ ცილის რაოდენობა ყოფილა 40 მკგ/მკლ.

№6 ამოცანა

ბარტონის რეაქტივით დნმ-ის კონცენტრაციის განსაზღვრა

დნმ-ის შემთხვევაშიც ანალოგიურად მზადდება სხვადასვა განზავების დნმ-ის ხსნარები, რომელთა შეღებისათვის გამოიყენება ბარტონის რეაქტივი.

ცდის მსვლელობა: – მზადდება ცნობილი დნმ-ის (მაგალითად, ხბოს დნმ) 1 მგ/მლ კონცენტრაციის ხსნარი.

- აიღება რამოდენიმე განზავების წერტილი: 5 მკლ (5 მკგ), 10 მკლ (10 მკგ) . . . 50 მკლ (50 მკგ) . . . 90 მკლ (90 მკგ), 100 მკლ (100 მკგ).

- თითოეულ ემატებას 0,5 მლ 6% $HClO_4$ და აცხელებენ 65^0 C-ზე 15 წთ.

- გაცივების შემდგომ ემატება 1,2 მლ დიფენილამინის რეაქტივი.

(დიფენილამინის რეაქტივი: 150 მგ დიფენილამინი იხსნება 10 მლ CH_3COOH – H_2SO_4 (200:3))

- ინკუბირდება 30^0 C-ზე 18 სთ.

- იზომება ოპტიკური შთანთქმა სპექტროფოტომეტრზე 595 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

დნმ-ის რაოდენობასა (ორდინატა) და ოპტიკურ შთანთქმას (აბსცისა) შორის აიგება დამოკიდებულების საკალიბრო გრაფიკი.

მაგალითად, უცნობი კონცენტრაციის დნმ-ის ნიმუშის ოპტიკური შთნთქმა არის 0,340. მაშინ დნმ-ის რაოდენობა ყოფილა მრუდზე გადაკვეთით მიღებული ორდინატას სიდიდე ანუ 44 მკგ/მკლ.

გამომცემლობის რედაქტორი	მარინე გიორგობიანი
გარეკანის დიზაინი	თინათინ ჩირინაშვილი
დაკაბადონება	ეკა თეთრაშვილი

0179 თბილისი, ი. ჭავჭავაძის გამზირი 14

14 Ilia Tchavtchavadze Avenue, Tbilisi 0179

Tel 995(32) 225 14 32

www.press.tsu.edu.ge