

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

БИОФИЗИКА

Практикум для студентов

Составители:
О.В. Башарина,
В.Г. Артюхов

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета
2009

Введение

Биофизика – важнейший раздел современной биологии, представляющий собой неотъемлемую часть профессиональной подготовки студентов биологических, медицинских, фармацевтических и других специальностей вузов. Она изучает элементарные взаимодействия и превращения ионов и молекул, лежащие в основе биологических процессов и явлений.

Основными разделами биофизики являются:

- квантовая биофизика, которая рассматривает электронную структуру биомолекул, механизмы поглощения квантов света атомами и молекулами, миграцию энергии, фотохимические реакции, лежащие в основе фотобиологических процессов;
- молекулярная биофизика, изучающая структурную организацию и механизмы функционирования биомакромолекул и их комплексов;
- биофизика клеточных процессов, изучающая физико-химические основы процессов, протекающих в отдельных клеточных системах, в том числе формирование электрических потенциалов, механизм транспортных процессов, закономерности взаимодействия лигандов с клеточными рецепторами;
- биофизика сложных систем, включающая важнейшие разделы биофизической науки, в том числе термодинамику и кинетику биопроцессов;
- радиационная биофизика, исследующая процессы взаимодействия ионизирующего излучения с биосистемами, развитие лучевого поражения на молекулярном, клеточном и организменном уровнях;
- прикладная биофизика, которая рассматривает вопросы, связанные с практическим применением положений, понятий, законов, моделей и методов биофизической науки.

Для подготовки квалифицированных провизоров, обладающих высоким интеллектуальным уровнем творческого характера в решении профессиональных задач, необходимо постоянное совершенствование учебного процесса на основе фундаментализации знаний. С другой стороны, знания, умения и навыки по фундаментальным дисциплинам представляют собой ценность для будущего специалиста только тогда, когда они вписываются как элемент в систему знаний по данной специальности. Именно для решения названной проблемы нам представлялось необходимым издание «Практикума по биофизике», переработанного и дополненного с учетом профессиональной направленности для студентов фармацевтического факультета.

В настоящее время биофизика как комплексная самостоятельная дисциплина изучается на фармацевтическом факультете ВГУ на II курсе (3 семестр) (во 2-ом семестре – на заочной форме обучения): учебным планом предусмотрены лекции (36 часов) и лабораторные занятия в таком же объеме. Практикум включает пять тем, в каждой из них содержится теоретическая часть, подробное описание физико-химических основ методов анализа, устройство приборов и

можно связать с определенными электронными переходами, обусловленными строением молекулы исследуемого вещества. Это позволяет по спектрам поглощения в видимой и УФ-области получать качественную информацию о наличии определенных групп атомов в молекулах данного вещества, о его структурном состоянии. Эти методы применяют также для определения концентраций поглощающего вещества в растворе. В фармацевтическом анализе они используются для установления структуры, идентификации, оценки чистоты, количественного определения лекарственных веществ в индивидуальном виде и в лекарственных формах.

Для характеристики поглощающей способности вещества используют такие величины, как оптическая плотность, светопропускание и светопоглощение.

Оптическая плотность (D) – это десятичный логарифм отношения интенсивности света, падающего на образец (I_0), к интенсивности света, выходящего из образца (I):

$$D = \lg I_0/I. \quad (1.1)$$

Оптическая плотность является безразмерной величиной.

Светопропускание (T) – отношение интенсивности света, вышедшего из образца, к интенсивности света, падающего на него:

$$T = I/I_0. \quad (1.2)$$

Светопоглощение (α) – величина, равная разности между единицей и величиной светопропускания:

$$\alpha = 1 - T \quad (1.3)$$

Светопоглощение и светопропускание измеряются в долях или в процентах.

Поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после его прохождения через исследуемый объект. Эта закономерность выражается *законом Бугера–Ламберта–Бера*:

Если интенсивность падающего монохроматического светового потока равна I_0 , то интенсивность света после поглощения слоем вещества будет равняться

$$I = I_0 10^{-\varepsilon Cl}, \quad (1.4)$$

где ε – молярный коэффициент экстинкции (поглощения), $(\text{л} \cdot (\text{моль} \cdot \text{см})^{-1})$; C – концентрация вещества (моль/л); l – длина оптического пути (толщина слоя вещества), (см).

Коэффициент экстинкции характеризует способность молекул вещества поглощать свет определенной длины волны и определяется структурными особенностями молекул данного вещества, соответствует величине оптической плотности раствора с концентрацией 1 моль/л при длине оптического пути 1 см.

Важнейшим *следствием* из закона Бугера–Ламберта–Бера является следующее положение: оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации вещества:

$$D = \varepsilon Cl. \quad (1.5)$$

Закон Бугера–Ламберта–Бера выведен для достаточно разбавленных растворов при использовании монохроматического света. Значительные отклонения от закона могут быть обусловлены:

1) свойствами анализируемого образца – способностью молекул вещества при больших концентрациях образовывать агрегаты, что приводит к росту светорассеяния и кажущемуся повышению его оптической плотности (рис. 1.1, кривая 2). Поэтому фотометрируемый раствор должен оставаться истинно молекулярным во всем интервале исследуемых концентраций. Если это условие не соблюдается, необходимо перейти в область более низких концентраций или применять защитные коллоиды, препятствующие образованию твердой фазы, или же изменить схему всего процесса измерения спектральных свойств образца;

2) конструкцией прибора: при использовании немонохроматического пучка света (например, при работе на фотоэлектроколориметрах с светофильтрами) (рис. 1.1, кривая 3), а также при работе в области, где погрешность прибора максимальна (см. раздел 1.2).

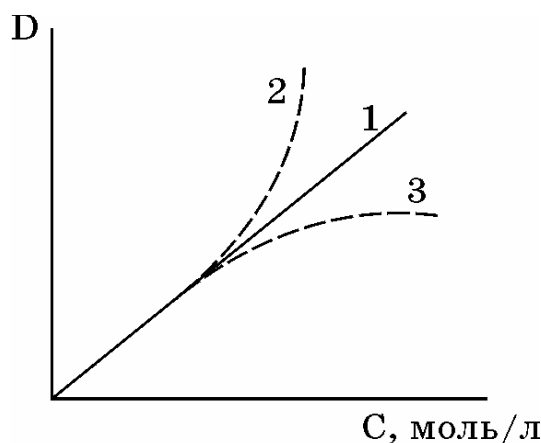


Рис. 1.1. Зависимость оптической плотности от концентрации вещества: 1 – при подчинении закону Бугера–Ламберта–Бера; 2 – при положительном отклонении; 3 – при отрицательном отклонении

Спектр поглощения – это график зависимости оптической плотности (или коэффициента экстинкции) от длины волны света, падающего на объект. При этом по оси ординат откладывают D (или ϵ), а по оси абсцисс – длину волны измерения (нм).

При одноэлектронном переходе зависимость D (или ϵ) от λ обычно описывается кривой распределения Гаусса. Полоса поглощения в спектре характеризуется тремя основными параметрами:

- максимальным значением оптической плотности (D_{\max}) или молярного коэффициента экстинкции (ϵ_{\max}) (максимум поглощения);

- длиной волны максимального поглощения (λ_{\max} , нм), соответствующей D_{\max} ;

- эффективной шириной полосы поглощения $\Delta\lambda_{1/2}$, нм (или полушириной полосы поглощения), она соответствует расстоянию между двумя точками полосы поглощения, находящимися на высоте, равной половине максимальной ($1/2D_{\max}$). Она измеряется в нм.

Таким образом, при интерпретации спектров поглощения необходимо указывать положение полос поглощения, их интенсивность (D_{\max}) и полуширину.

Поглощение света осуществляется не всей молекулой, а определенными ее участками. *Хромофоры* – это отдельные группы атомов в молекуле вещества, поглощающие кванты света. Основными хромофорами в белках являются пептидные группы, ароматические (тирозин, триптофан, фенилаланин) и серосодержащие аминокислоты (цистин, цистеин, метионин). В нуклеиновых кислотах хромофоры – пуриновые и пиримидиновые азотистые основания (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил). Указанные хромофоры поглощают в УФ-области спектра.

Однокомпонентные неокрашенные белки (сывороточный и яичный альбумины, трипсин, пепсин, глобулины и др.) не поглощают свет в видимом диапазоне (400–700 нм).

Хромофорами сложных белков, в частности гемопroteидов, в видимой области являются гемовые группы. Так, благодаря железопорфиру в составе гембелка раствор оксигемоглобина обнаруживает несколько максимумов поглощения в этой области спектра: самый значительный (интенсивный) в области 412–414 нм (полоса *Soret*) и максимумы меньшей интенсивности при 542 и 578 нм.

Поглощение видимого и УФ-света происходит главным образом с участием π - и n -электронов (π - π^* и n - π^* – переходы). Чем длиннее система сопряженных связей в молекуле, тем при большей длине волны располагается максимум поглощения.

Спектры поглощения применяются для качественного (установления структуры, подлинности, чистоты) и количественного (выбор аналитических длин волн) анализа лекарственных средств.