***На правах рукописи***

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное

Учреждение высшего образования

**«Оренбургский государственный университет»**

Кафедра биофизики и физики конденсированного состояния

Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

*«М.1.В.ДВ3.1 Спектроскопические методы анализа»*

Уровень высшего образования

МАГИСТРАТУРА

Направление подготовки

*03.04.02 Физика*

(код и наименование направления подготовки)

*Биохимическая и медицинская физика*

(наименование направленности (профиля) образовательной программы)

Квалификация

*Магистр*

Форма обучения

*Очное*

Оренбург

Составитель \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Бердинский В.Л.

Методические указания рассмотрены и одобрены на заседании кафедры биофизики и физики конденсированного состояния

Заведующий кафедрой \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Бердинский В.Л.

Методические указания является приложением к рабочей программе по дисциплине Спектроскопические методы анализа, зарегистрированной в ЦИТ под учетным номером\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Содержание**

[Тема 1 Электронная спектроскопия в биохимии…………………….…………………4](#_Toc13067154)

Тема 2 Зависимость электронных спектров от температуры ……....…………………4

Тема 3. Спектры поглощения биологически важных соединений…………………….5

Тема 4. Люминесцентная спектроскопия………………………………………………..5

Тема 5. Ферменты…………………………………………………………………………6

Тема 6. Инфракрасная спектрофотометрия……………………………………………..6

Тема 7. Спектроскопия комбинационного рассеяния…………………………………..7

Тема 8. Метрологические аспекты при спектральных измерениях……………………7

Тема 9. Масс-спектроскопия…………………………………………………………..…8

**Тема 1. Электронная спектроскопия в биохимии**

**Лекция 1**

В начале занятия по данной теме преподаватель излагает следующие основные вопросы:

1. Предмет биохимии и основные методы биохимии;

2. Связь биохимии с родственными дисциплинами, статистическая и динамическая биохимия;

3. Экспериментальные методы исследования биообъектов.

4. Основы электронной спектроскопии.

В ходе обсуждения доложенных положений в форме взаимного диалога между преподавателем и студентами рассматриваются и обсуждаются следующие основные вопросы:

1. Способы изображения электронных спектров.

2. Взаимосвязь электронных спектров и структуры органических молекул.

3. Хромофоры и ауксохромы.

4. Классификация полос поглощения.

**Практическое занятие 1**

В начале занятия по данной теме заслушиваются следующие самостоятельно подготовленные сообщения студентов (рефераты):

1. Характеристика и принцип работы прибора - спектрофотометра.

2. Зависимость интенсивности поглощения падающего света от длины волны, как основная характеристика, изучаемая в спектрофотометрии.

В ходе обсуждения доложенных положений в форме взаимного диалога между преподавателем и самими студентами рассматриваются и обсуждаются следующие основные вопросы:

1. УФ-спектрофотометрия, принцип метода, практическое использование в анализе.

2. Спектрофотометрия при изучении строения и состава различных соединений (комплексов, красителей, аналитических реагентов и др.).

**Тема 2. Зависимость электронных спектров от температуры**

**Лекция 2**

В начале занятия по данной теме преподаватель излагает следующие основные вопросы:

1. Измерение спектров при низкой температуре.

2. Влияние температуры на ширину полос.

3. Повышение разрешения перекрывающихся полос при понижении температуры.

Вопросы для обсуждения:

1. Квазилинейчатые спектры.
2. Техника измерения спектров при низкой температуре.
3. Двухлучевой и двухволновой метод измерения.

**Практическое занятие 2**

Темы рефератов:

1. Приложения абсорбционной спектроскопии органических соединений.

2. Приборы и методы анализа в ближней инфракрасной области.

Вопросы для обсуждения:

1. Адсорбционная спектроскопия, характеристика, приложение для исследования биомолекул.

2. Фурье-спектроскопия, особенности, применение.

**Тема 3. Спектры поглощения биологически важных соединений**

**Лекция 3**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Свойства оптической плотности при последовательном и параллельном прохождении лучей через объекты.

2. Спектры поглощения биологически важных соединений (белки, нуклеиновые кислоты, пигменты).

Вопросы для обсуждения:

1. Двухлучевой способ измерения оптической плотности D.

2. Спектры поглощения, форма контура спектральных полос, гауссовские полосы, полуширина и площадь, расчет силы осциллятора.

**Практическое занятие 3**

Темы рефератов:

1. Уширение линий поглощения и излучения.

Вопросы для обсуждения:

1. Характеристика биомолекул, поглощающих в ультрафиолетовой (200 - 400 нм), видимой (400—760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра.

2. Отражение изменения конформации макромолекул в УФ спектрах.

**Тема 4. Люминесцентная спектроскопия**

**Лекция 4**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Принцип измерения люминесценции.

2. Принципиальная схема измерения флуоресценции для определения концентрации веществ.

3. Метод зондов.

Вопросы для обсуждения:

1. Определение концентрации вещества, условия измерений.

2. Эффект экранирования, выбор оптимальных условий.

3. Спектральные проявления эффектов.

**Практическое занятие 4**

Темы рефератов:

1. Флуоресцентные микроскопы: устройство и принципиальные особенности эпи-флуоресцентного и конфокального сканирующего микроскопов, области применения.

Вопросы для обсуждения:

1. Геометрия системы, выбор и проверка скрещенных светофильтров.

2. Измерение спектров флуоресценции, качественный анализ вещества.

3. Флуоресценция веществ в смеси.

4. Эффекты экранирования и реабсорбции флуоресценции, оптимальные условия измерения.

**Тема 5. Ферменты**

**Лекция 5**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Общие принципы определения активности ферментов.

2. Измерение активности ферментов по скорости изменения концентрации субстрата.

3. Определение скорости изменения концентрации субстрата.

Вопросы для обсуждения:

1. Биомедицинское значение ферментов.

2. Основные свойства ферментов.

**Практическое занятие 5**

Темы рефератов:

1. Ферменты – как основные деструкторы биологических молекул, разрушающие биоматериал в ходе его дезинтеграции. Ингибиторы активности ферментов.

Вопросы для обсуждения:

1 Определение скорости изменения концентрации субстрата калориметрическим способом.

2. Определение скорости изменения концентрации субстрата спектрофотометрическим способом.

3. Определение скорости изменения концентрации субстрата люминесцентным способом.

**Тема 6. Инфракрасная спектрофотометрия**

**Лекция 6**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Молекула как ротатор и осциллятор, уровни вращательной и колебательной энергии и характер спектров поглощения.

2. Постоянный дипольный момент молекулы. Общие правила отбора для вращательных и колебательных переходов.

3. Фурье-спектроскопия, особенности, применение.

Вопросы для обсуждения:

1. Информация о свойствах молекулы, получаемая при исследовании ИК-спектров, методы их измерения.

2. ИК-микроскопия.

3. Кривая потенциальной энергии молекулы, колебательные волновые функции и уровни энергии.

**Практическое занятие 6**

Темы рефератов:

1. ИК- спектры биомакромолекул, принципы, практическое использование в анализе.

2. Разрешенные вращательные и колебательные переходы.

Вопросы для обсуждения:

1. ИК-спектроскопия: принцип метода, сферы применения, особенности пробоподготовки материала.

**Тема 7. Спектроскопия комбинационного рассеяния**

**Лекция 7**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Основные закономерности светорассеяния.

2. Применение КР-спектроскопии для исследования биологически важных соединений.

3. Методы измерения спектров КР.

Вопросы для обсуждения:

1. Рассеяние света, как совокупность физических явлений (отражение, преломление, дифракция, комбинационное рассеяние и др.), которые влияют на направление распространения света в веществе и могут изменять длину волну света.

2. Стоксовы и антистоксовы линии рассеяния.

**Практическое занятие 7**

Темы рефератов:

1 Типы рассеяния света: эластичное (упругое) релеевское – без изменения длины волны света; неэластичное (неупругое) рамановское – с изменением длины волны света.

Вопросы для обсуждения:

1. Рассеяние света, виды рассеяния.

2. Применение КР для изучения строения белков, полипептидов, липидов, олигосахаридов.

3. Клинические исследования биотканей организмов.

**Тема 8. Метрологические аспекты при спектральных измерениях**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Погрешности измерений в биохимии.

2. Источники систематических ошибок при измерении спектров поглощения биологически важных макромолекул.

3. Погрешности при измерениях кинетики биохимических процессов и стационарных спектров поглощения и люминесценции биообъектов.

Вопросы для обсуждения:

1. Принципы выбора оптимальных условий при спектрально-люминесцентных измерениях биообъектов.

2. Оптимальная величина оптической плотности для спектрально-люминесцентных измерений.

**Практическое занятие 8**

Темы рефератов:

1. Принципы построения калибровочных графиков при проведении колориметрических исследований.

2. Специфичность и универсальность спектральных методов, предел чувствительности и ошибки измерений.

Вопросы для обсуждения:

1. Приборные ошибки при проведении спектральных измерений.

2. Оценка ошибок при использование спектральных методов для исследований и в клинической практике.

**Тема 9. Масс-спектроскопия**

Основные вопросы, излагаемые преподавателем:

1. Общие принципы метода масс-спектрометрии.

2. Основные правила и подходы к интерпретации масс-спектров.

3. Концепция стабильности ионов и нейтральных частиц.

Вопросы для обсуждения:

1. Анализ высокомолекулярных соединений (белки, полипептиды, синтетические полимеры и пр.) методом масс-спектрометрии.

2. Детектировать следовых количеств веществ.

**Практическое занятие 9**

Темы рефератов:

1. История развития масс-спектрометрии органических веществ.

2. Элементный анализ неорганических веществ.

Вопросы для обсуждения:

1. Специализированное программное обеспечение для работы с масс-спектрами.

2. Изучение элементарных химических процессов: ионизации, перегруппировок, ионных реакций методом масс-спектрометрии.