

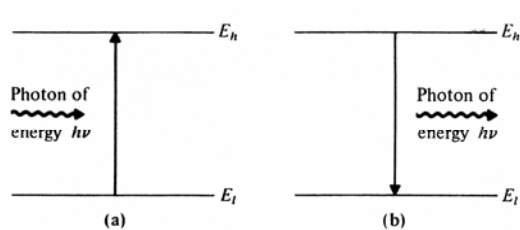
## فصل سوم

### اسپکتروسکوپی ماوراء بنفش - مرئی<sup>۱</sup>

اسپکتروسکوپی عبارت است از مطالعه میان کنش بین ماده و تابش الکترومغناطیس. مولکولها نور را جذب می کنند و مقدار نور جذب شده و طول موجهایی که در آنها جذب صورت می گیرد، بستگی به ساختمان مولکولها و نیز محیط پیرامون آنها دارد و به همین دلیل اسپکتروسکوپی ابزار مفیدی برای شناسایی ساختمان و محیط اطراف مولکولها و ماکرومولکولها محسوب می شود.

#### ۱-۳. جذب و نشر<sup>۲</sup>:

تمامی شاخه های اسپکتروسکوپی را می توان به دو دسته تقسیم کرد: اسپکتروسکوپی جذبی و اسپکتروسکوپی نشری. شمای این دو نوع اسپکتروسکوپی در شکل (۱-۳) نشان داده شده است:



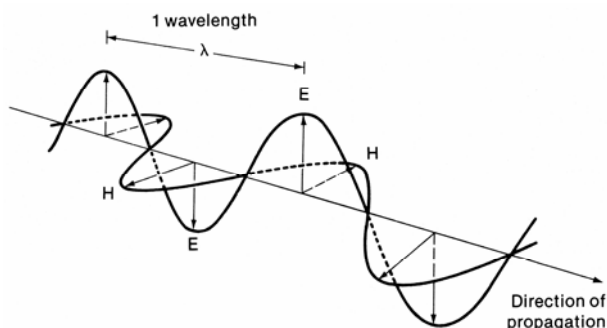
شکل (۱-۳): شمای (a) جذب نور، شمای (b) نشر نور.  $E_h$  تراز انرژی بالاتر و  $E_l$  تراز انرژی پایین تر می باشد. ماده با جذب فوتون نور از تراز  $E_l$  به تراز  $E_h$  منتقل می شود و در اسپکتروسکوپی جذبی، پارامترهای جذبی اندازه گیری می شود. با نشر فوتون نور، ماده از  $E_h$  به  $E_l$  باز می گردد و در اسپکتروسکوپی نشری اندازه گیری پارامترهای نشری مورد توجه می باشد.

#### ۱-۱-۳. تئوری ساده جذب نور توسط مولکولها:

نور از میدان های الکتریکی و مغناطیسی نوسان کننده سینوسی عمود بر هم تشکیل شده است که بر جهت انتشارشان نیز عمودند. در شکل (۲-۳) بردارهای الکتریکی (E) و مغناطیسی نور (H) نشان داده شده است:

<sup>۱</sup> Ultraviolet-Visible Spectroscopy

<sup>۲</sup> Absorption and Emission

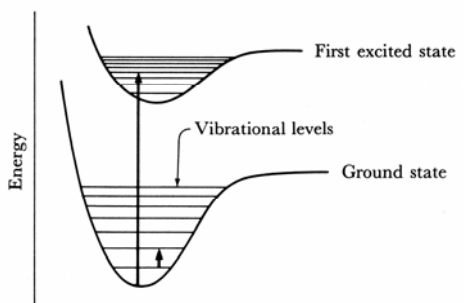


شکل (۳-۲): انتشار یک موج الکترومغناطیس در فضا. بردارهای E و H بر یکدیگر و بر جهت انتشارشان عمودند.

انرژی موج از رابطه  $E = h\nu = hc/\lambda$  بدست می‌آید که در آن،  $h$  ثابت پلانک،  $c$  سرعت نور در خلاء و  $\lambda$  طول موج است. وقتی چنین موجی به یک مولکول برخورد می‌کند، ممکن است متفرق شود (جهت انتشارش تغییر کند)، جذب شود (انرژی‌اش به مولکول منتقل شود) و یا بدون جذب عبور کند. احتمال وقوع هر یک از این فرآیندها بستگی به خواص مولکول دارد. اگر انرژی الکترومغناطیس نور جذب شود، مولکول برانگیخته<sup>۳</sup> می‌گردد. مولکول و یا بخشی از مولکول که در اثر جذب نور برانگیخته می‌شود، کروموفور<sup>۴</sup> نامیده می‌شود. این انرژی برانگیختگی معمولاً در اثر برخورد مولکول برانگیخته با مولکول‌های دیگر (مثلاً مولکول‌های حلال) به انرژی گرمایی تبدیل می‌شود. در اثر فرآیند جذب، شدت نور عبور کرده از محلول کروموفورها کمتر از شدت نور تابیده شده اولیه خواهد بود. یک مولکول برانگیخته می‌تواند یکی از مجموعه سطوح انرژی برانگیخته را دارا باشد. این سطوح انرژی، سطوح انرژی الکترونی نامیده می‌شوند که بر روی آنها سطوح انرژی ارتعاشی بر روی یکدیگر چیده شده‌اند و بر روی سطوح انرژی ارتعاشی نیز سطوح انرژی چرخشی قرار گرفته‌اند. در شکل (۳-۳) این سطوح انرژی نشان داده شده‌اند:

<sup>۳</sup> Excited

<sup>۴</sup> Chromophore



شکل (۳-۳): دیاگرام سطوح انرژی تراز پایه و اولین تراز برانگیخته. ترازهای انرژی ارتعاشی به صورت خطوط باریک افقی نشان داده شده‌اند. بر روی هر تراز انرژی ارتعاشی نیز ترازهای انرژی چرخشی قرار گرفته که نشان داده نشده‌اند. فلش بلند، انتقال الکترونی بین حالت پایه و چهارمین سطح ارتعاشی اولین حالت برانگیخته و فلش کوتاه، انتقال ارتعاشی در حالت پایه الکترونی را نشان می‌دهد.

پایین‌ترین سطح الکترونی، حالت پایه و دیگر سطوح الکترونی، سطوح برانگیخته نامیده می‌شوند. جذب انرژی توسط ماده وقتی بیشترین احتمال را دارد که مقدار انرژی جذب شده برابر با اختلاف دو سطح انرژی باشد. پس می‌توان گفت که اگر نوری با طول موج  $\lambda$  به ماده بتابد تنها وقتی جذب خواهد شد که طول موج آن از رابطه زیر تبعیت کند:

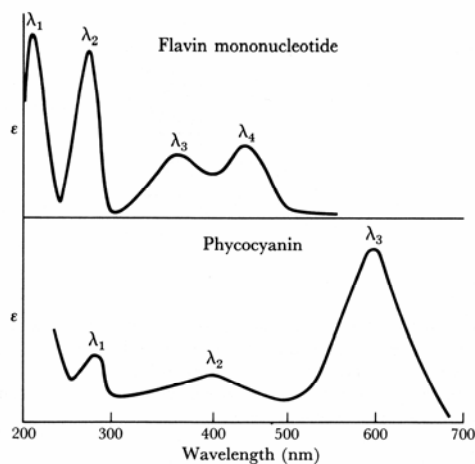
$$\lambda = \frac{hc}{E_2 - E_1} \quad (1-3)$$

در این معادله،  $E_1$  سطح انرژی مولکول قبل از جذب و  $E_2$  سطح انرژی مولکول بعد از جذب نور می‌باشد.

تغییر در سطوح انرژی، انتقال نامیده می‌شود. نموداری که نشان‌دهنده احتمال جذب در مقابل طول موج است، طیف جذبی<sup>۵</sup> نام دارد. اگر تمامی انتقال‌ها تنها بین پایین‌ترین سطح ارتعاشی حالت پایه و اولین حالت برانگیخته روی می‌داد، طیف جذبی از خطوط مجزای باریکی تشکیل می‌شد ولی انتقال از یک سطح انرژی الکترونی به سطح بعدی می‌تواند به طرق مختلفی روی دهد زیرا تمامی مولکول‌های

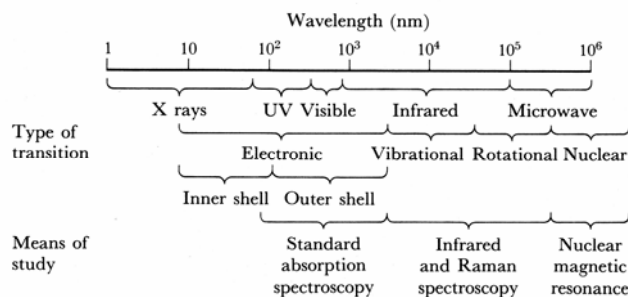
<sup>۵</sup> Absorption Spectrum

موجود در حالت پایه الکترونی، در پایین ترین تراز ارتعاشی نیز توزیع نشده‌اند. به همین دلیل طیف جذبی معمولا یک طیف پهن و گسترده است. طیف جذبی فلاوین مونونوکلوئوتید (FMN) و فیکوسیاینین که هر یک دارای چندین پیک جذبی می‌باشند، در شکل (۳-۴) نشان داده شده است:



شکل (۳-۴): طیف جذبی دو مولکول بیولوژیک، فلاوین مونونوکلوئوتید و فیکوسیاینین که نشان می‌دهد طیف های جذبی مولکول های مختلف می‌تواند بسیار متفاوت باشد. این دو طیف جذبی به وضوح نشان می‌دهند که از تفاوت های موجود در طیف جذبی مولکول های بیولوژیک غالباً می‌توان برای شناسایی آنان استفاده نمود.

برای بیشتر مولکول ها، طول موج های مربوط به انتقال بین حالت پایه الکترونی و تراز های ارتعاشی اولین حالت برانگیخته الکترونی در محدوده ماوراء بنفش و مرئی نور واقع شده است. انتقال های کوچک در یک تراز الکترونی بین تراز های ارتعاشی نیز امکان پذیر است. این گونه انتقال ها، موجب تابش در محدوده مادون قرمز می‌شوند. در شکل (۳-۵) نواحی مختلف طیف الکترومغناطیس، انتقال های مربوط به نواحی مختلف و روش های اسپکتروسکوپی مورد نیاز جهت مطالعه هر نوع انتقال نشان داده شده است:



شکل (۳-۵): بخشی از گستره طیف الکترومغناطیس از تابش‌های ایکس تا امواج مایکرو ویو.

### ۳-۱-۲. جمعیت سطوح انرژی<sup>۶</sup>:

یک مولکول دارای منابع مختلف انرژی است. با تقریب، انرژی کل یک مولکول توسط رابطه زیر داده می‌شود:

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Translational}} + E_{\text{Rotational}} + E_{\text{Vibrational}} + E_{\text{Electronic}} + E_{\text{Electron Spin Orientation}} + E_{\text{Nuclear Spin Orientation}}$$

هر یک از این انرژی‌ها دارای مقادیر کوانتیزه می‌باشند. در هر مطالعه تجربی، ما با تعداد بسیار زیادی از مولکول‌ها سروکار داریم. در هر دمای معین، مولکول‌ها به واسطه آشفتگی حرارتی<sup>۷</sup> در بین ترازهای انرژی در دسترس‌شان توزیع می‌شوند. توزیع دقیق مولکول‌ها بستگی به دما (انرژی حرارتی) و جدایی ترازهای انرژی ( $\Delta E$ ) در نردبان انرژی دارد. در هر دما، تعداد مولکول‌ها در تراز یا حالت بالایی ( $n_{\text{upper}}$ ) نسبت به تعداد مولکول‌ها در تراز یا حالت پایینی ( $n_{\text{lower}}$ ) توسط قانون توزیع بولتزمن<sup>۸</sup> داده می‌شود:

$$\frac{n_{\text{upper}}}{n_{\text{lower}}} = \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right) \quad (۲-۳)$$

<sup>۶</sup> Population of Energy Levels

<sup>۷</sup> Thermal Agitation

<sup>۸</sup> Boltzmann Distribution Law

که در این رابطه،  $k$  ثابت بولتزمن،  $T$  دمای مطلق و  $\Delta E$  اختلاف انرژی ترازهای بالایی و پایینی است. وقتی  $\Delta E$  برای یک مول تعریف شده باشد، جمله سمت راست به صورت  $\exp(-\Delta E/RT)$  در می‌آید که در آن  $T$  دمای مطلق و  $R$  ثابت جهانی گازهاست. واضح است وقتی که  $\Delta E \ll kT$  باشد،  $\exp(-\Delta E/kT) \approx e^0 = 1$  می‌شود یعنی تعداد مولکول‌ها در ترازهای بالاتر و پایین‌تر معادل خواهد بود و وقتی که  $\Delta E \gg kT$  باشد، تعداد مولکول‌های تراز بالاتر به تعداد مولکول‌های پایین‌تر قابل نظر خواهد بود.

**مثال:** نسبت مولکول‌ها در تراز بالاتر به تراز پایین‌تر را در  $300 \text{ K}$  وقتی که جدایی بین ترازها طبق مقادیر زیر باشد را محاسبه کنید:

$$1 - 1/19 \times 10^{-2} \text{ J.mol}^{-1} \text{ (Nuclear Reorientation)}$$

$$2 - 11/9 \text{ J.mol}^{-1} \text{ (Rotational)}$$

$$3 - 11/9 \text{ kJ.mol}^{-1} \text{ (Vibrational)}$$

$$4 - 119 \text{ kJ.mol}^{-1} \text{ (Electronic)}$$

حل:

$$\frac{n_{\text{upper}}}{n_{\text{lower}}} = \exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)$$

$$1 - \frac{n_{\text{upper}}}{n_{\text{lower}}} = \exp\left(\frac{-1/19 \times 10^{-2}}{8/314 \times 300}\right) = 0.9999952$$

$$2 - \frac{n_{\text{upper}}}{n_{\text{lower}}} = \exp\left(\frac{-11/9}{8/314 \times 300}\right) = 0.9952$$

$$3 - \frac{n_{\text{upper}}}{n_{\text{lower}}} = \exp\left(\frac{-11/9 \times 10^3}{8/314 \times 300}\right) = 8/5 \times 10^{-3}$$

$$4 - \frac{n_{\text{upper}}}{n_{\text{lower}}} = \exp\left(\frac{-119 \times 10^3}{8/314 \times 300}\right) = 1/86 \times 10^{-21}$$

همان طور که مشاهده می‌شود در دو حالت ۱ و ۲، مولکول‌های توزیع شده در دو تراز تقریباً معادلند. در حالی که برای سطوح انرژی ارتعاشی و الکترونی در دمای  $300\text{ K}$ ، تقریباً تمام مولکول‌ها در تراز پایین‌تر جای گرفته‌اند.

### ۳-۱-۳. قانون بیر-لامبرت<sup>۹</sup>:

بر اساس قانون بیر-لامبرت، مقدار نور جذب شده<sup>۱۰</sup>  $(A)$  توسط یک محلول حاوی کروموفور بستگی به ماهیت شیمیایی کروموفور  $(\epsilon)$ ، غلظت کروموفور  $(c)$  و طول مسیر عبور نور  $(l)$  از درون محلول حاوی کروموفور دارد. این قانون را به زبان ریاضی می‌توان توسط رابطه زیر بیان نمود:

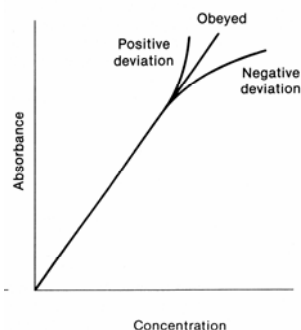
$$(A) = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l c \quad (3-3)$$

که در آن  $I_0$  شدت نور ورودی،  $I$  شدت نور عبور کرده،  $l$  طول مسیر عبور نور بر حسب سانتی‌متر،  $c$  غلظت کروموفور و  $\epsilon$  ضریب جذب می‌باشد. بسته به واحد غلظت، واحد ضریب جذب متفاوت خواهد بود. مثلاً اگر واحد غلظت گرم درصد باشد،  $\epsilon$  را ضریب جذب ویژه می‌گویند. معمولاً غلظت بر حسب واحد مولار بیان می‌شود و در این صورت  $\epsilon$  را ضریب جذب مولی<sup>۱۱</sup> می‌نامند و واحد آن،  $\text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$  یا  $\text{lit} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  خواهد بود. احتمال جذب یک طول موج منفرد توسط ضریب جذب مولی در آن طول موج داده می‌شود که بستگی به ماهیت شیمیایی ماده دارد. نمودار تغییرات جذب در مقابل غلظت خط راستی خواهد بود با شیب برابر با  $\epsilon l$  که معمولاً در غلظت‌های بیش از  $0.5\text{ M}$  دچار خمیدگی و انحراف خواهد شد. همانطور که در شکل (۳-۶) مشاهده می‌شود، این انحراف می‌تواند مثبت و یا منفی باشد.

<sup>۹</sup> Beer-Lambert Law

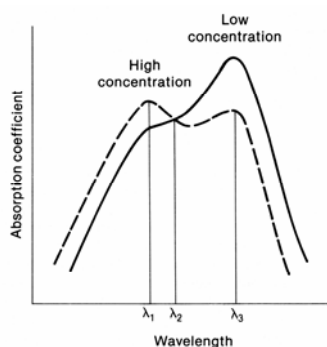
<sup>۱۰</sup> Absorbance

<sup>۱۱</sup> Molar Absorption Coefficient



شکل (۳-۶): انحراف‌های مثبت و منفی از قانون بیر-لامبرت. تنها در بخش خطی نمودار جذب در مقابل غلظت از قانون بیر-لامبرت تبعیت می‌شود.

دلایل زیادی برای انحراف از قانون بیر-لامبرت وجود دارد. مثلا ممکن است با افزایش غلظت محلول، مولکول‌های زیادی تشکیل دای‌مر، اولیگومر و یا پلی‌مر دهند و طیف جذبی دای‌مرها و یا دیگر گونه‌های مولکولی ممکن است با طیف جذبی مونومرها متفاوت باشد. این اثر ممکن است موجب انحراف مثبت و یا منفی از قانون بیر-لامبرت شود. در شکل (۳-۷) اثر تغییر غلظت بر طیف جذبی یک کروموفور مشاهده می‌گردد.

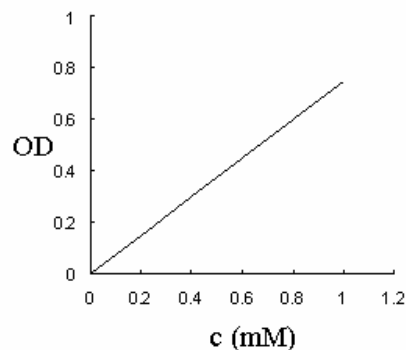


شکل (۳-۷): با افزایش غلظت کروموفور، طیف جذبی جابجا می‌شود که غالباً ناشی از پلی‌مریزاسیون است. در طول موج  $\lambda_1$  انحراف مثبت و در طول موج  $\lambda_3$ ، انحراف منفی از قانون بیر-لامبرت وجود دارد. توجه داشته باشید که در یک طول موج خاص ( $\lambda_2$ ) در اثر تغییر غلظت، ضریب جذب مولی تغییر نمی‌کند.



طول موج خاصی که در آن ضریب جذب گونه‌های حاضر مستقل از غلظت است را نقطه ایزوسبستیک<sup>۱۲</sup> می‌نامند. در نقطه ایزوسبستیک، ضریب جذب گونه‌های درگیر در تعادل با هم برابر است. همچنین در غلظت‌های بالا ممکن است تجمع<sup>۱۳</sup> روی دهد. تجمعات مولکولی غالباً موجب تفرق نور شده و با کاستن مقدار نور عبور کرده از نمونه موجب انحراف مثبت از قانون بیر-لامبرت می‌شوند. این تجمعات همچنین ممکن است موجب میان‌کنش‌های الکترونی شوند که باعث کاهش و یا افزایش ضریب جذب شود. از دلایل دیگر انحراف از قانون بیر-لامبرت، غیرطبیعی شدن پروتئین‌ها در غلظت‌های پایین و واکنش‌های شیمیایی در غلظت‌های بالاست.

اگر طول مسیر عبور نور ۱ cm باشد، غالباً به جای  $A$  از اصطلاح چگالی نوری<sup>۱۴</sup> (OD) استفاده می‌شود. نمودار تغییرات چگالی نوری در مقابل غلظت خط راستی خواهد بود که شیب آن برابر با ضریب جذب خواهد بود (شکل ۳-۸):



شکل (۳-۸): نمودار چگالی نوری در مقابل غلظت کروموفور.

پارامتر مفید دیگر عبور<sup>۱۵</sup> ( $T$ ) است که به صورت  $T = \frac{I}{I_0}$  تعریف می‌شود.

<sup>۱۲</sup> Isobestic Point

<sup>۱۳</sup> Aggregation

<sup>۱۴</sup> Optical Density

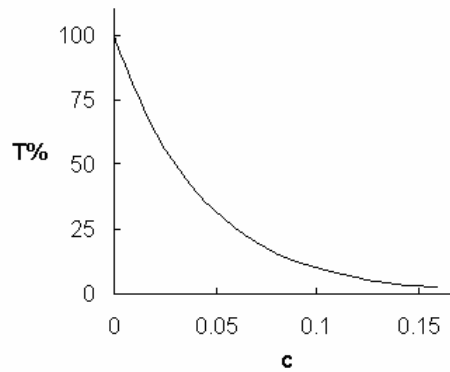
<sup>۱۵</sup> Transmittance

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{و} \quad \frac{I_0}{I} = \frac{1}{T} \Rightarrow A = \log \frac{1}{T} = -\log T$$

معمولا  $T$  را به صورت درصد نمایش می‌دهند و رابطه زیر بین  $T$  و  $A$  وجود دارد:

$$A = 2 - \log T \quad (۴-۳)$$

رابطه  $T$  و غلظت نیز در شکل (۳-۹) نشان داده شده است:



شکل (۳-۹): نمودار درصد نور عبور کرده در مقابل غلظت کروموفور. در غلظت‌های کم کروموفور، درصد نور عبور کرده بیشتر است و با افزایش غلظت کروموفور از میزان نور عبور کرده کاسته می‌گردد.

**مثال:** ۱۵/۸٪ از تابش ورودی با طول موج ۳۴۰ nm از محلولی حاوی NADH عبور می‌کند. ضریب جذب مولی NADH در این طول موج  $۶/۲۲ \times ۱۰^۶ \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$  می‌باشد. اگر طول مسیر عبور نور ۱ cm باشد، غلظت مولار NADH در این محلول چقدر است؟

$$A = 2 - \log T = 2 - \log(15/8) = 0.8 \quad \text{حل:}$$

$$A = \epsilon l c \Rightarrow c = \frac{A}{\epsilon l}$$

$$c = \frac{0.8}{6/22 \times 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1} \times 1 \text{ cm}} = 1/29 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3} = 1/29 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{lit}^{-1}$$

**مثال:** جذب یک محلول  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  آنزیم آدنیلات سیکلاز ( $M = 21000$ )  $0.53$  است. اگر طول مسیر عبور نور  $1 \text{ cm}$  باشد، ضریب جذب مولی را حساب کنید.  
حل:

$$c = \frac{1 \text{ mg}}{\text{ml}} = \frac{1 \times 10^{-3} \text{ g}}{21000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} = 4/76 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$$

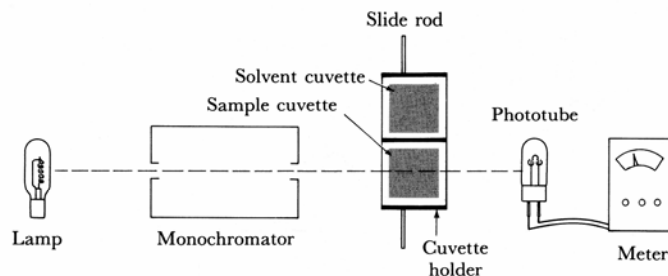
$$A = \epsilon l c \Rightarrow \epsilon = \frac{A}{lc} = \frac{0.53}{1 \text{ cm} \times 4/76 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}} = 1/11 \times 10^7 \text{ cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$$

### ۳-۲. دستگاه اندازه گیری جذب نور مرئی و ماوراء بنفش:

اندازه گیری جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام می شود. هر چند که این دستگاه ها در طراحی شان با یکدیگر متفاوتند ولی همه اسپکتروفوتومترها شامل منبع نورانی برای تولید نور، مونوکروماتور (تک فام ساز) برای انتخاب طول موج، سل یا کووت<sup>۱۶</sup> شفاف جهت نگهداشتن محلول نمونه، آشکارساز نوری برای تبدیل انرژی نورانی به انرژی الکتریکی و ثبت کننده برای ثبت خروجی<sup>۱۷</sup> آشکارساز می باشند. بخش های اصلی یک دستگاه اسپکتروفوتومتر در شکل (۳-۱۰) نشان داده شده است:

<sup>۱۶</sup> Cuvette

<sup>۱۷</sup> Output



شکل (۳-۱۰): یک دستگاه اسپکتروفتومتر تک تابشی. نور تولید شده توسط لامپ از یک تک فام ساز برای انتخاب طول موج عبور داده می شود. نمونه و حلال در دو کووت مجزا در بخش نگهدارنده کووت ها قرار داده می شوند. نگهدارنده کووت ها با جابجا شدن می تواند در هر زمان یکی از کووت ها را در مسیر عبور تابش قرار دهد. نور عبور کرده از کووت ها توسط یک فوتوتیوپ به جریان الکتریکی تبدیل شده و مقدار این جریان الکتریکی توسط یک سنجش گر اندازه گیری می شود.

در هر طول موج، نور عبور کرده از حلال (که ممکن است بافر و یا محلولی از مولکول های کوچک باشد) و نیز نور عبور کرده از محلول حاوی نمونه که در حلال حل شده است، اندازه گیری می شود. سپس مقدار نور عبور کرده از حلال از مقدار نور عبور کرده از محلول کسر می گردد تا میزان جذب حل شونده (کروموفور) بدست آید. در عمل، کسر کردن جذب حلال از جذب نمونه به طریق جبری انجام نمی شود بلکه دستگاه طوری تنظیم می شود که جذب حلال را صفر قرار دهد. به این عمل، صفر کردن می گویند. سپس با صفر کردن جذب حلال، جذب نمونه مستقیماً اندازه گیری می شود. برای بدست آوردن یک طیف جذبی، این عمل در تمامی طول موج های گستره مورد نظر تکرار می شود. در دستگاه های خاصی که اسپکتروفتومترهای اتوماتیک دو تابشی<sup>۱۸</sup> نامیده می شوند، گستره طول موج های مورد نظر اسکن<sup>۱۹</sup> شده و همزمان جذب نمونه و حلال که در کووت های جداگانه قرار دارند، اندازه گیری می شود. سپس به طور الکترونیکی در هر طول موج این دو مقدار (جذب نمونه و حلال) از یکدیگر کسر می گردند. طیف حاصله سپس بر روی یک صفحه نمایشگر نشان داده می شود.

<sup>۱۸</sup> Automatic Double-Beam Spectrophotometers

<sup>۱۹</sup> Scan

## ۳-۳. پارامترهای اندازه‌گیری شده در اسپکتروسکوپی جذبی:

پارامترهای اندازه‌گیری شده معمولا OD و یا  $\varepsilon$  می‌باشند. طول موج مربوط به پیک بیشینه جذب،  $\lambda_{\max}$  نامیده می‌شود و معمولا  $\varepsilon$  را در این طول موج اندازه‌گیری می‌کنند. همان‌طور که در طیف جذبی FMN و فیکوسیانین مشاهده کردید، برخی از بندهای جذبی شامل چندین پیک می‌باشد که در این صورت ماده مربوطه دارای چند  $\lambda_{\max}$  خواهد بود. در جدول (۱-۳)  $\lambda_{\max}$  و  $\varepsilon$  کروموفورهای معمول بیولوژیک آورده شده‌اند:

جدول (۱-۳): جذب بیشینه ( $\lambda_{\max}$ ) و ضریب جذب مولی ( $\varepsilon$ ) برای ترکیبات مختلف بیولوژیک در pH خنثی.

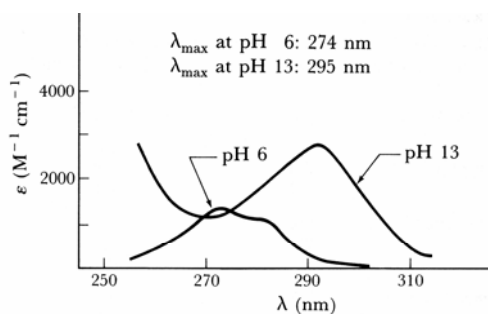
مولکول	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\varepsilon_{\lambda_{\max}}$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) $\times 10^{-3}$
تریپتوفان	۲۸۰	۵/۶
	۲۱۹	۴۷/۰
تایروزین	۲۷۴	۱/۴
	۲۲۲	۸/۰
	۱۹۳	۴۸/۰
فنیل آلانین	۲۵۷	۰/۲
	۲۰۶	۹/۳
	۱۸۸	۶۰/۰
هیستیدین	۲۱۱	۵/۹
سیستئین	۲۵۰	۰/۳
آدنین	۲۶۰/۵	۱۳/۴
آدنوزین	۲۵۹/۵	۱۴/۹
گوانین	۲۷۵	۸/۱
گوانوزین	۲۷۶	۹/۰
سایتوزین	۲۶۷	۶/۱
سایتیدین	۲۷۱	۹/۱
یوراسیل	۲۵۹/۵	۸/۲
یوریدین	۲۶۱/۱	۱۰/۱
تایمین	۲۶۴/۵	۷/۹
تایمیدین	۲۶۷	۹/۷
DNA	۲۵۸	۶/۶
RNA	۲۵۸	۷/۴

### ۴-۳. فاکتورهای تاثیرگذار بر خواص جذبی یک کروموفور:

اگر چه طیف جذبی یک کروموفور اساسا توسط ساختمان شیمیایی آن تعیین می شود، ولی تعداد زیادی از فاکتورهای محیطی وجود دارند که موجب تغییرات محسوسی در  $\lambda_{\max}$  و  $\epsilon$  می شوند. فاکتورهای محیطی شامل pH، قطبیت حلال، قطبیت مولکول‌های همسایه و جهت یابی فضایی نسبی کروموفورهای همسایه است. در واقع این اثرات محیطی هستند که باعث می شوند اسپکتروسکوپی جذبی به عنوان ابزار مناسبی برای شناسایی مولکول‌ها و محیط اطرافشان مورد استفاده قرار گیرد.

#### ۱-۴-۳. اثرات pH:

pH حلال تعیین کننده حالت یونیزاسیون کروموفورهای قابل یونیزاسیون است. در شکل (۱۱-۳) اثرات pH را بر روی طیف جذبی اسید آمینه تایروزین می بینید:



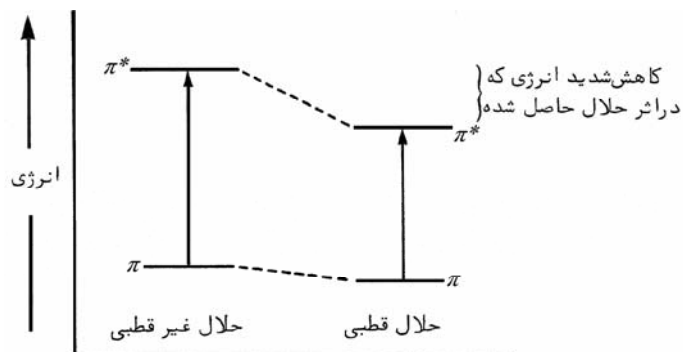
شکل (۱۱-۳): طیف جذبی تایروزین در pH های ۶ و ۱۳.

توجه داشته باشید که  $\epsilon$  و  $\lambda_{\max}$  اسید آمینه تایروزین با تفکیک OH فنولی آن افزایش می یابد.

#### ۲-۴-۳. اثر قطبیت حلال:

تغییر مکان بند جذبی ناشی از اثر حلال به علت اختلاف در قدرت نسبی حلال‌ها در حلال پوشی حالت پایه یک مولکول در مقایسه با توانایی آنان در حلال پوشی حالت برانگیخته همان مولکول می باشد. دو مورد معمول به شرح زیرند:

۱- در بسیاری از انتقال‌های  $\pi \rightarrow \pi^*$ ، حالت پایه مولکول نسبتاً غیرقطبی بوده و حالت برانگیخته اغلب اوقات قطبی‌تر از حالت پایه می‌باشد. در نتیجه وقتی که یک حلال قطبی به کار برده می‌شود، این حلال حالت برانگیخته را به مراتب بیش از حالت پایه پایدار می‌کند و آن انتقال را به سمت طول موج‌های بلندتر (بائوکرومی<sup>۲۰</sup> یا جابجایی قرمز<sup>۲۱</sup>) سوق می‌دهد. در شکل (۳-۱۲) اثر قطبیت حلال بر انرژی لازم برای یک انتقال  $\pi \rightarrow \pi^*$  را مشاهده می‌نمایید:



شکل (۳-۱۲): اثر قطبیت حلال بر یک انتقال  $\pi \rightarrow \pi^*$ . با افزایش قطبیت حلال، انرژی لازم برای این انتقال کاهش می‌یابد.

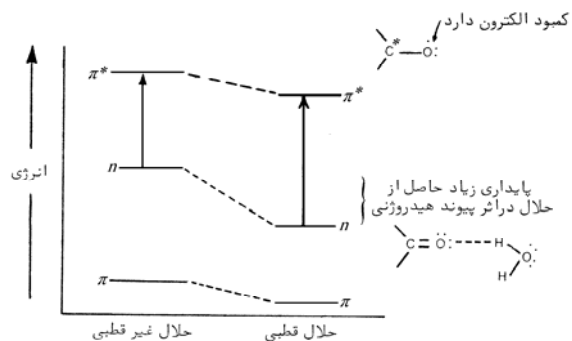
۲- در اکثر مولکول‌هایی که انتقال‌های  $n \rightarrow \pi^*$  روی می‌دهد، حالت پایه قطبی‌تر از حالت برانگیخته است. به ویژه تاثیر حلال‌هایی که توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی با جفت الکترون‌های غیرپیوندی را دارند در حالت پایه مولکول به مراتب بیش از چیزی است که در حالت برانگیخته مولکول اتفاق می‌افتد. در نتیجه، هر قدر توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی (قطبیت) حلال افزایش یابد،  $\lambda_{max}$  یک انتقال  $n \rightarrow \pi^*$  به سمت طول موج کوتاهتر (هایپوکرومی<sup>۲۲</sup> یا جابجایی آبی<sup>۲۳</sup>) سوق داده می‌شود. اثر قطبیت حلال بر انرژی لازم برای یک انتقال  $n \rightarrow \pi^*$  را در شکل (۳-۱۳) مشاهده می‌نمایید:

<sup>۲۰</sup> Bathochromy

<sup>۲۱</sup> Red Shift

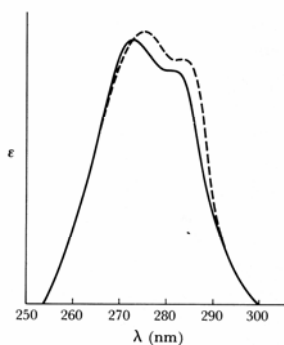
<sup>۲۲</sup> Hypsochromy

<sup>۲۳</sup> Blue Shift



شکل (۳-۱۳): اثر قطبیت یک حلال پروتیک بر یک انتقال  $n \rightarrow \pi^*$ . با افزایش قطبیت حلال، شکاف بین ترازهای  $n$  و  $\pi^*$  بیشتر می‌شود و انرژی لازم برای این انتقال افزایش می‌یابد.

پس برای کروموفورهای قطبی، مقدار  $\lambda_{max}$  برای انتقال‌های  $n \rightarrow \pi^*$  در حلال‌های هیدروکسیلیک قطبی (مثل آب و الکل‌ها) نسبت به حلال‌های غیرقطبی در طول موج‌های کوتاه‌تر واقع می‌شود در حالی که برای انتقال‌های  $\pi \rightarrow \pi^*$ ، جابجایی به سمت طول موج‌های بلندتر می‌باشد. انتقال  $\pi \rightarrow \pi^*$  معمول‌ترین انتقال در مولکول‌های بیولوژیک است. یک استثناء، اسیدهای آمینه است که در آنها انتقال‌های  $n \rightarrow \pi^*$  وجود دارد. شکل (۳-۱۴) اثر قطبیت حلال را بر روی طیف جذبی اسید آمینه تایروزین نشان می‌دهد:

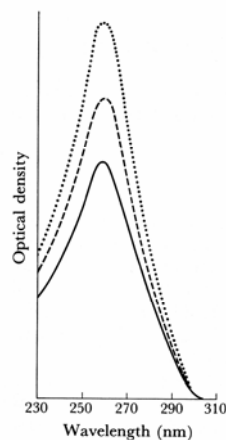


شکل (۳-۱۴): اثر قطبیت حلال بر طیف جذبی تایروزین. خط ممتد، طیف جذبی تایروزین در آب و خط منقطع، طیف جذبی این اسید آمینه را در محلول ۲۰٪ اتیلن گلیکول نشان می‌دهد. توجه داشته باشید  $\lambda_{max}$  در حلال کم‌قطبی افزایش یافته است.



## ۳-۴-۳. اثرات جهت یابی فضایی:

جهت یابی های فضایی غالباً اثرات زیادی بر روی  $\lambda_{max}$  و  $\epsilon$  دارند. شناخته شده ترین مورد، کم رنگی<sup>۲۴</sup> اسیدهای نوکلئیک است. این اثر بدین صورت است که ضریب جذب یک نوکلئوتید وقتی در یک رشته پلی نوکلئوتیدی قرار می گیرد، کاهش می یابد. با تشکیل ساختمان دو رشته ای، ضریب جذب باز هم کاهش می یابد که به علت منظم شدن جفت بازهاست. این اثر را می توان در شکل (۳-۱۵) مشاهده نمود:



شکل (۳-۱۵): طیف جذبی DNA T<sub>v</sub>. خط ممتد طیف جذبی DNA دو رشته ای، خط منقطع طیف جذبی DNA تک رشته ای و خط نقطه چین طیف جذبی نوکلئوتیدهای آزاد پس از هیدرولیز پیوندهای فسفو دی استر موجود در ساختمان DNA نشان می دهد.

بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات فراوان بر روی ماکرومولکول های بیولوژیک، یک دسته قوانین تجربی بدست آمده است که به شرح زیر می باشند:

۱- اگر اسیدهای آمینه تریپتوفان، تایروزین، فنیل آلانین و هیستیدین به حلال و یا محیط کم قطبی تر منتقل شوند،  $\lambda_{max}$  و  $\epsilon$  آنها افزایش می یابد. بنابراین:

الف) اگر طیف یک اسید آمینه در یک پروتئین در یک حلال قطبی نشان داد که  $\lambda_{max}$  و  $\epsilon$  آن بالاتر از  $\lambda_{max}$  و  $\epsilon$  همین اسید آمینه به صورت آزاد در همان حلال است، پس این اسید آمینه باید در یک

<sup>۲۴</sup> Hypochromism

ناحیه درونی پروتئین واقع شده<sup>۲۵</sup> و توسط اسیدهای آمینه با زنجیرهای جانبی غیرقطبی احاطه شده باشد.

ب) اگر طیف یک پروتئین نسبت به تغییرات قطبیت حلال حساس باشد، اسیدهای آمینه‌ای که  $\lambda_{max}$  و  $\epsilon$  آنها با قطبیت حلال تغییر می‌کند باید بر روی سطح پروتئین واقع شده<sup>۲۶</sup> باشند. برای استفاده از این قانون باید خاطر نشان نمود که تغییر قطبیت حلال ناپستی موجب آنچنان تغییر بنای فضایی در ساختمان پروتئین شود که جای یک اسید آمینه درونی و سطحی را با هم تعویض کند.

۲- برای اسیدهای آمینه،  $\epsilon$  و  $\lambda_{max}$  همیشه افزایش می‌یابد اگر یک گروه تیترونی (مثل OH تایروزین، ایمیدازول هیستیدین و یا SH سیستئین) باردار باشد. بنابراین وقتی pH تغییر می‌کند، الف) اگر هیچ تغییری در طیف اسیدهای آمینه تیترونی مشاهده نشود و تغییر pH به اندازه کافی باشد که بتواند موجب تیترونی شدن اسید آمینه آزاد گردد، کروموفور بایستی در یک ناحیه درونی غیرقطبی پروتئین مدفون شده باشد.

ب) اگر تغییر طیف به صورت تابعی از pH نشان داد که گروه یونیزه شونده دارای  $pK$  مشابهی با همان اسید آمینه در حالت آزاد است، پس اسید آمینه بایستی در سطح پروتئین واقع شده باشد.

ج) اگر تغییر طیف به صورت تابعی از pH نشان دهنده وجود اختلاف زیاد در  $pK$  اسید آمینه موجود در ساختمان پروتئین و اسید آمینه آزاد باشد، پس اسید آمینه باید در یک محیط قویا قطبی حضور داشته باشد (مثلا یک باقی‌مانده تایروزین که توسط گروه‌های کربوکسیل احاطه شده است).

۳- در پورین‌ها و پیریمیدین‌ها، هر چه سیستم‌های حلقوی آنها موازی‌تر باشند و به هم نزدیکتر شوند (انباشتگی بازها بیشتر باشد)،  $\epsilon$  بیشتر کاهش می‌یابد. مقدار  $\epsilon$  پورین‌ها و پیریمیدین‌ها، از بالا به پایین، به صورت زیر کاهش می‌یابد:

باز آزاد

باز در یک پلی‌نوکلئوتید تک رشته‌ای انباشته نشده

باز در یک پلی‌نوکلئوتید تک رشته‌ای انباشته شده

باز در یک پلی‌نوکلئوتید دو رشته‌ای

<sup>۲۵</sup> Burried Amino Acid

<sup>۲۶</sup> Exposed Amino Acid

## ۳-۵. کاربردهای طیف سنجی جذبی

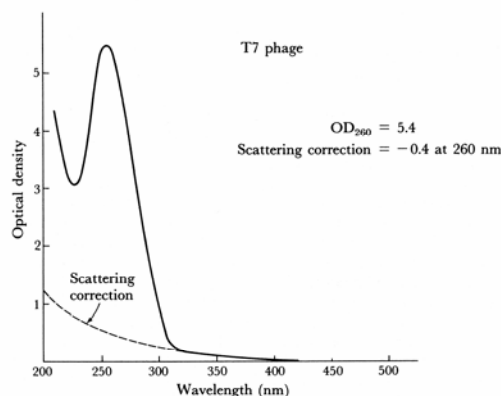
## ۳-۵-۱. اندازه‌گیری غلظت:

مهمترین کاربرد طیف‌سنجی ماوراء بنفش-مرئی (UV-VIS) اندازه‌گیری غلظت است به شرطی که  $\epsilon$  معلوم بوده و قانون بیر-لامبرت نیز صادق باشد. به عنوان مثال، برای یک DNA دو رشته‌ای ( $c = 50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ )،  $\text{OD}_{260} = 1$  است. پس  $\text{OD}_{260} = 0.5$ ، مربوط به غلظت  $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$  و  $\text{OD}_{260} = 0.1$ ، مربوط به DNA با غلظت  $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  است.

فرض کنید مخلوط اسیدهای آمینه را توسط کروماتوگرافی تعویض یونی از هم جدا کرده‌اید. مثلاً غلظت تریپتوفان را می‌توان از میزان نور جذب شده در  $280 \text{ nm}$  با دانستن ضریب جذب آن ( $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) بدست آورد. بنابراین، اگر مقدار جذب محلول تریپتوفان در کووتی با پهنای  $4 \text{ cm}$  برابر با  $0.26$  باشد، غلظت تریپتوفان برابر خواهد بود با:

$$c = \frac{A}{\epsilon l} = \frac{0.26}{5600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1} \times 4 \text{ cm}} = 1.16 \times 10^{-5} \text{ M}$$

در بعضی موارد، ماده مورد اندازه‌گیری حاوی اجزایی است که نور را جذب می‌کنند و این اجزاء نه به صورت محلول بلکه به صورت سوسپانسیون حضور دارند. به عنوان مثال، باکتریوفاژها که جذب‌شان اساساً به واسطه محتوای DNA آنهاست، نه تنها نور را جذب می‌کنند بلکه نور را متفرق نیز می‌سازند و موجب افزایش کاذب جذب می‌شوند. برای رفع این مشکل می‌توان بر روی تفرق تصحیح انجام داد و سهم آن را در جذب حذف نمود. برای این کار، جذب را در یک سری از طول موج‌هایی که از  $\lambda_{\text{max}}$  فاصله زیادی دارند اندازه‌گیری می‌کنند. چون تفرق با  $\lambda^{-4}$  تغییر می‌کند، نمودار جذب اندازه‌گیری شده در مقابل  $\lambda^{-4}$  رسم شده و بخش خطی این منحنی (جایی که تمامی جذب مشاهده شده به واسطه تفرق است)، تا  $\lambda_{\text{max}}$  برون‌یابی می‌شود تا سهم تفرق در جذب اندازه‌گیری شده تصحیح گردد. مثالی از چنین تصحیحی را می‌توان در شکل (۳-۱۶) مشاهده نمود:



شکل (۳-۱۶): طیف جذبی E.Coli فاز T<sub>v</sub> و تصحیح سهم تفرق در آن.

این روش، روش کارآمدی برای تعیین محتوای اسید نوکلئیک باکتریوفاژها و دیگر ویروس‌هاست.

### ۳-۵-۲. سنجش واکنش‌های شیمیایی:

بسیاری از واکنش‌های شیمیایی را می‌توان به وسیله اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار داد اگر، لاقلاً یکی از مواد واکنش‌گر و یا محصولات در حین پیشرفت واکنش مقدار جذبش تغییر کند. دو مثال زیر کاربرد اسپکتروفتومتری را در سنجش‌های شیمیایی (آنزیمی) نشان می‌دهد:

۱- مقدار فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز را می‌توان به روش اسپکتروفتومتری به سادگی اندازه‌گیری نمود. این آنزیم، تبدیل سوبسترای مصنوعی ارتو-نیترو فنیل گالاکتوزید را به ارتو-نیترو بنزن و گالاکتوز کاتالیز می‌کند.  $\lambda_{max}$  محصول ارتو-نیترو بنزن در ۴۲۰ nm واقع شده است. از اینرو می‌توان با تعقیب آهنگ افزایش جذب در ۴۲۰ nm با گذشت زمان، فعالیت این آنزیم را تعیین نمود.

۲- هیدرولیز آنزیمی پلی‌نوکلئوتیدها را نیز می‌توان توسط اسپکتروسکوپی جذبی دنبال کرد. طبق قانون ۳، ضریب جذب باز آزاد بیشتر از ضریب جذب باز موجود در ساختمان پلی‌نوکلئوتیدهاست. بنابراین، اگر یک پلی‌نوکلئوتید هیدرولیز شود و به مونو نوکلئوتیدهای سازنده‌اش تبدیل شود، OD<sub>۲۶۰</sub> آن افزایش خواهد یافت. اگر یک نوکلئاز به یک نمونه پلی‌نوکلئوتید افزوده شود، OD<sub>۲۶۰</sub> افزایش خواهد

یافت و این افزایش نشان دهنده هیدرولیز پیوندهای فسفودی استر موجود در ساختمان پلی نوکلئوتید است.

### ۳-۵-۳. تعیین میزان دوز<sup>۲۷</sup> یک ماشین تولیدکننده اشعه ایکس:

اگر یک محلول  $\text{FeSO}_4$  در  $\text{H}_2\text{SO}_4$  مورد تابش اشعه ایکس قرار گیرد، یونهای  $\text{Fe}^{2+}$  موجود در این محلول به  $\text{Fe}^{3+}$  تبدیل خواهند شد و می توان تغییرات غلظت  $\text{Fe}^{3+}$  را با جذب که در  $305 \text{ nm}$  دارد، مورد مطالعه قرار داد. با استفاده از  $\text{OD}_{305}$ ، کل دوز دریافت شده قابل محاسبه است. این روش، بهترین و دقیق ترین روش کمی مطالعه تابش های یون ساز است که میزان سنجی فرس سولفات<sup>۲۸</sup> نامیده می شود.

### ۳-۶. مطالعات ساختمانی DNA با استفاده از اسپکتروسکوپی جذبی

#### ۳-۶-۱. مطالعه انتقال ماریچ- پیچه در DNA دو رشته ای:

$\text{OD}_{260}$  یک نمونه DNA اگر در یک محدوده دمایی ویژه گرم شود افزایش می یابد. در نتیجه، پرننگی<sup>۲۹</sup> معیاری از غیرطبیعی شدن و یا انتقال ماریچ- پیچه تلقی می شود که ناشی از عدم انباشتگی جفت بازهای DNA است. این سنجش نوری ساده این امکان را فراهم می کند که بتوان پایداری DNA را در ارتباط با دما، pH، قدرت یونی، قطبیت حلال و افزایش مولکول های کوچک اندازه گیری نمود. بسیاری از خواص مهم DNA با استفاده از این روش آشکار شده اند از جمله:

۱- پایداری حرارتی DNA با محتوای GC آن افزایش می یابد. این بدان علت است که جفت های GC محکم تر از جفت های AT به هم متصل شده اند.

۲- اگر دمای یک محلول DNA افزایش یابد (نه تا دمایی که میزان جذب بیشینه می شود) و سپس تا پایین تر از دمایی که هیچ افزایش چگالی نوری مشاهده نشده است خنک شود، چگالی نوری بی درنگ به مقدار اولیه خود باز خواهد گشت. این مشاهده نشان می دهد که اگر جدا شدن دو رشته کامل نشده باشد، ساختمان طبیعی دو رشته ای به راحتی تشکیل می گردد.

<sup>۲۷</sup> Dose Rate

<sup>۲۸</sup> Ferrous Sulfate Dosimetry

<sup>۲۹</sup> Hyperchromicity

۳- جدا شدن دو رشته روی نمی‌دهد مگر این که میزان جذب نور کاملاً از ناحیه انتقالی بیشتر شده باشد.

۴- اگر محلول DNA تا بیش از دمای لازم برای جدایی دو رشته گرم شود و سپس خنک گردد، میزان افزایش در جذب، از ۳۷٪ (مقدار بیشینه افزایش جذب) به ۱۲٪ در قدرت یونی بالا (۰/۱ M) کاهش خواهد یافت زیرا در این شرایط، پیوندهای هیدروژنی (درون و بین رشته‌ای) به طور اتفاقی دوباره تشکیل خواهند شد. از اینرو، در قدرت یونی بالا DNA غیرطبیعی شده مجتمع می‌شود. اگر قدرت یونی پایین باشد (مثلاً ۰/۰۱ M)، چگالی نوری در بیشترین مقدار خود باقی خواهد ماند زیرا نیروی دافعه بین گروه‌های فسفات دو رشته را از یکدیگر جدا نگه خواهد داشت.

۵- اگر یک نمونه DNA که جذبش به میزان ۱۲٪ افزایش یافته، در محیطی با قدرت یونی در محدوده ۰/۵-۱/۰ M و دمای بالاتر از  $T_m$  قرار داده شود و غلظت DNA نیز زیاد باشد، در ظرف چند ساعت جذبش به مقدار اولیه خود باز می‌گردد. این فرآیند، دوباره طبیعی شدن نامیده می‌شود که در طی آن DNA ساختمان طبیعی دو رشته‌ای خود را باز می‌یابد (باز شدن دو رشته DNA به طور کامل همراه با افزایش جذب به میزان ۳۷٪ و نیم‌باز شدن دو رشته همراه با افزایش جذب به میزان ۱۸/۵٪ است).

### ۳-۶-۲. اختلال حلال<sup>۳۰</sup> در اسیدهای نوکلئیک:

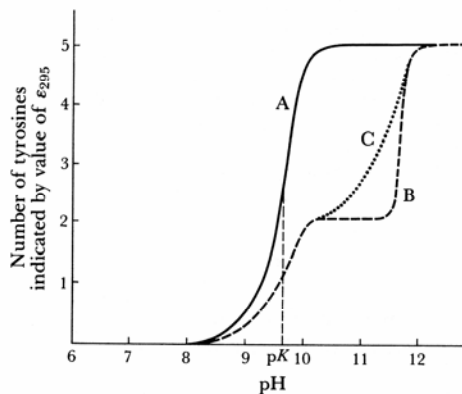
تغییر حلال از آب به محلول ۵۰٪  $D_2O$  موجب تغییرات طیفی مشخصی در مونو نوکلئوتیدها می‌شود ولی هیچ اثری بر طیف جذبی جفت‌بازها ندارد. از اینرو، تغییرات طیفی یک نمونه DNA در محلول ۵۰٪  $D_2O$  می‌تواند برای تعیین کسری از بازها که به صورت جفت‌باز درنیامده‌اند، مورد استفاده قرار گیرد. این روش ارزش زیادی در مطالعه اسیدهای نوکلئیک از جمله tRNA دارد. در مولکول‌های tRNA توالی بازها اجازه نمی‌دهد که تمام بازها در پیوندهای هیدروژنی شرکت کنند (آنهایی که در لووپ‌ها واقع شده‌اند) در نتیجه، بازهای جفت‌نشده در معرض تماس با حلال و تغییر در طیف جذبی می‌باشند.

<sup>۳۰</sup> Solvent Perturbation

## ۷-۳. مطالعه ساختمانی پروتئین‌ها با استفاده از اسپکتروسکوپی جذبی:

## ۱-۷-۳. تیتراسیون اسپکتروفوتومتری پروتئین‌ها:

بسیاری از مطالعات بر روی ساختمان پروتئین‌ها نیازمند تعیین مقادیر  $pK$  تفکیک پروتون از زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه تیتروشونده است زیرا این مقادیر می‌تواند اطلاعاتی راجع به موقعیت اسید آمینه در ساختمان پروتئین بدست دهد. در اغلب موارد می‌توان اینگونه اطلاعات را بدست آورد زیرا تفکیک پروتون اغلب طیف جذبی کروموفورهای قابل یونیزاسیون را تغییر می‌دهد. یک پروتئین فرضی را در نظر بگیرید که دارای پنج اسید آمینه تایروزین است. بر اساس قانون تجربی ۲ (اگر گروه تیتروشونده برآورد شود،  $\lambda_{max}$  و  $\epsilon$  آن افزایش می‌یابد)، می‌توان تعداد تایروزین‌های خارجی (موجود در سطح پروتئین) را تعیین نمود (شکل ۳-۱۷):



شکل (۳-۱۷): منحنی‌های تیتراسیون pH برای تایروزین با استفاده از  $\epsilon_{295}$  آن. در منحنی (A)، پنج تایروزین بیرونی هستند. در منحنی‌های (B) و (C)، دو تایروزین بیرونی و سه تایروزین درونی (ولی با قطبیت محیطی متفاوت) هستند.

اگر تمام تایروزین‌ها بر روی سطح پروتئین واقع شده باشند، تمامی آنها با افزایش pH یونیزه خواهند شد و طیف کلی تایروزین‌ها جابجا خواهد شد و طیف آنها مانند طیف تایروزین آزاد خواهد بود. در این صورت، نمودار  $OD_{295}$  ( $\lambda_{max}$  برای شکل یونیزه تایروزین) در مقابل pH مانند منحنی A خواهد

شد. در عوض، اگر سه تایروزین در درون و دو تایروزین در بیرون باشند، منحنی B حاصل خواهد شد. یعنی فقط دو تایروزین خارجی تیترا می‌شوند و تنها در pH خیلی بالا که ساختمان پروتئین غیرطبیعی می‌شود، سه تایروزین درونی در معرض تماس با حلال قرار گرفته و تیترا خواهند شد. اگر سه تایروزین درونی بر خلاف حالت قبل که در محیط درونی غیرقطبی بودند در یک محیط درونی قطبی باشند، منحنی C حاصل خواهد شد که در اینصورت  $pK$  این سه تایروزین درونی (در محیط قطبی) با  $pK$  دو تایروزین خارجی متفاوت خواهد بود.

### ۳-۷-۲. تعیین برخی جنبه‌های بنای فضایی پروتئین‌ها توسط روش اختلال حلال:

بر اساس قانون تجربی ۱، طیف جذبی کروموفورها بستگی به قطبیت محیط اطرافشان دارد. فرض کنید یک پروتئین در یک حلال قطبی قرار دارد و طیف یک کروموفور درونی آن بدست آمده است. با مقایسه این طیف با طیف معلوم همان کروموفور در یک حلال قطبی و غیرقطبی می‌توان نتیجه گرفت که اگر طیف کروموفور مورد نظر شبیه به طیف همان کروموفور در حلال غیرقطبی بود، پس کروموفور باید در یک ناحیه درونی غیرقطبی واقع شده باشد و بالعکس. مقدار جابجایی در  $\lambda_{max}$  را نیز می‌توان جهت تخمین درجه قطبیت حلال بکار برد. تعیین درونی و یا بیرونی بودن یک اسید آمینه به وسیله اندازه‌گیری طیف پروتئین در حلال قطبی و غیرقطبی، روش اختلال حلال نامیده می‌شود. از آنجایی که عموماً شناخت ساختمان یک پروتئین در محلول آبی نمکی (شبیه به محیطی که پروتئین در سلول زنده در آن قرار دارد) مورد علاقه می‌باشد، ضروری است که خود حلال غیرقطبی موجب القاء تغییرات بنای فضایی در ساختمان پروتئین نشود و عدم اثرگذاری حلال غیرقطبی بر ساختمان پروتئین بایستی توسط روش‌های دیگر تایید گردد. در حقیقت، پروتئین‌ها ندرتاً در حلال‌های کاملاً غیرقطبی مورد مطالعه قرار می‌گیرند زیرا بیشتر پروتئین‌ها در چنین حلال‌هایی یا غیرمحلولند و یا غیرطبیعی می‌شوند. معمولاً در چنین مطالعاتی، از حلالی استفاده می‌شود که شامل ۸۰٪ آب و ۲۰٪ ماده‌ای است که قطبیت آب را پایین می‌آورد. برخی از مخلوط‌های استاندارد که در روش اختلال حلال به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند، در جدول (۳-۲) نشان داده شده‌اند:



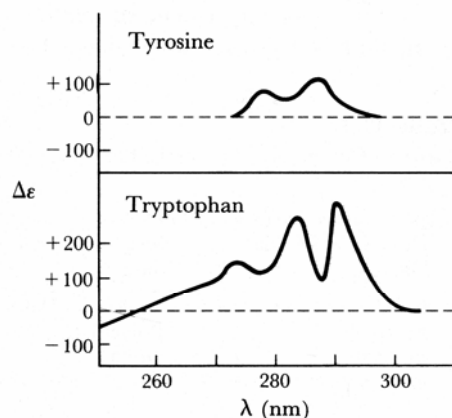
جدول (۳-۲): برخی از حلال های مورد استفاده در روش اختلال حلال.

افزودنی های مایع (محلول ۲۰٪ حجمی/حجمی)	افزودنی های جامد (محلول ۲۰٪ وزنی/وزنی)
دی متیل سولفاکساید	مانیتول
دی اکسان	پلی اتیلن گلیکول
اتیلن گلیکول	سوکروز
گلیسرول	اوره

این حلال ها که قطبیت کاهش یافته ای دارند را حلال های مختل کننده<sup>۳۱</sup> می نامند. مناسب ترین روش استفاده از اختلال حلال، اسپکتروسکوپی افتراقی<sup>۳۲</sup> است که در آن، ضرورت اندازه گیری طیف در دو نوبت وجود ندارد. در روش معمول، بایستی طیف را یکبار در حضور و یکبار در غیاب مختل کننده اندازه گیری نمود. در اسپکتروسکوپی جذبی استاندارد، یک طیف به وسیله اندازه گیری جذب یک محلول و کسر نمودن جذب حلال اندازه گیری می شود. در اسپکتروسکوپی افتراقی، دو محلول نمونه و مرجع دارای اجزاء یکسانی می باشند ولی تنها یکی از محلول ها حاوی مختل کننده است. در این روش، به جای اندازه گیری دو طیف (مربوط به هر محلول) در هر طول موج، جذب یک محلول از جذب محلول دیگر کسر می گردد. یک طیف افتراقی غیر صفر تنها وقتی بوجود می آید که طیف نمونه تحت تاثیر مختل کننده قرار گیرد. پارامترهای بدست آمده از چنین طیفی،  $\lambda_{\max}$  و  $\Delta\epsilon$  در  $\lambda_{\max}$  خواهد بود. شکل (۳-۱۸) طیف افتراقی تریپتوفان و تایروزین را در محلول ۲۰٪ اتیلن گلیکول نشان می دهد:

<sup>۳۱</sup> Perturbing Solvents

<sup>۳۲</sup> Difference Spectroscopy

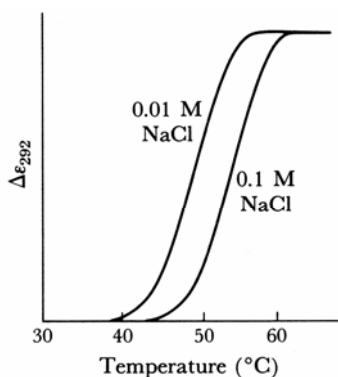


شکل (۳-۱۸): طیف‌های افتراقی تایروزین و تریپتوفان در ۸۰٪ آب و ۲۰٪ اتیلن گلیکول. توجه نمایید که طیف افتراقی می‌تواند دارای مقادیر منفی  $\Delta\epsilon$  نیز باشد.

### ۳-۷-۳. مطالعه انتقال مارپیچ-پیچه در پروتئین‌ها:

چون یک کروموفور مدفون شده در یک پروتئین در حین غیرطبیعی شدن در معرض حلال قرار خواهد گرفت، می‌توان با تعقیب جذب این کروموفورها، انتقال مارپیچ-پیچه را دنبال نمود. به عنوان مثال، اگر یک پروتئین دارای چند تریپتوفان باشد که برخی از آنها درونی باشند، بازشدگی این پروتئین به صورت تابعی از دما می‌تواند با اندازه‌گیری  $\Delta\epsilon_{292}$  مورد مطالعه قرار گیرد. سپس می‌توان اثر عواملی از قبیل قدرت یونی، pH، مواد افزودنی، سوبستراها، مهارکننده‌ها، کوآنزیم‌ها و غیره را بر روی پایداری پروتئین مورد نظر بررسی کرد.

یک نمونه از داده‌های بدست آمده از چنین مطالعاتی در شکل (۳-۱۹) نشان داده شده است. در این مطالعه، انتقال مارپیچ-پیچه در یک پروتئین فرضی توسط اسپکتروسکوپی افتراقی اختلالی در طول موج ۲۹۲ nm در حلال ۲۰٪ اتیلن گلیکول و در دو غلظت متفاوت NaCl مورد سنجش قرار گرفته است. توجه نمایید که پروتئین در غلظت بالاتر NaCl پایدارتر می‌باشد زیرا دمای بیشتری برای بازشدگی آن مورد نیاز است.



شکل (۳-۱۹): مطالعه انتقال ماریچ-پیچه توسط اسپکتروسکوپی افتراقی اختلالی در دو غلظت NaCl در حلال ۸۰٪ آب و ۲۰٪ اتیلن گلیکول. محلول مرجع برای طیف افتراقی، پروتئین در محلول NaCl - اتیلن گلیکول در ۲۰ °C است.

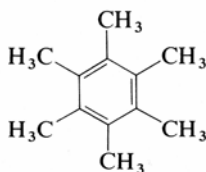
### ۳-۷-۴. تجمعات پروتئین-پروتئین<sup>۳۳</sup>:

تشکیل تجمعات پروتئین-پروتئین همراه با تغییر طیف جذبی آنان می باشد زیرا کروموفورهای موجود در سطح پروتئین که در معرض حلال قرار داشته اند و طیف شان شبیه به طیف کروموفورهای آزاد می باشد، در اثر تجمعات پروتئین-پروتئین در جایگاه های اتصال پروتئین ها به یکدیگر مدفون شده اند و دیگر در دسترس مولکول های حلال نیستند.

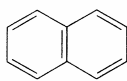
### ۳-۸. جذب نور پلاریزه:

صفحه پلاریزاسیون یک موج الکترومغناطیس به صورت صفحه بردار E تعریف می شود. یک شعاع نور معمولی غیرپلاریزه است زیرا مجموعه امواجی است که صفحات پلاریزاسیون آنها به طور اتفاقی آرایش پیدا کرده است ولی نور پلاریزه صفحه ای تنها دارای یک صفحه پلاریزاسیون می باشد. تمامی کروموفورها حداقل دارای یک محور ترجیح داده شده برای جذب نور پلاریزه هستند. به عنوان مثال، احتمال جذب نور پلاریزه توسط حلقه مسطح و متقارن هگزامتیل بنزن بیشترین خواهد بود اگر بردار E در صفحه حلقه باشد و احتمال جذب صفر خواهد بود اگر بردار E عمود بر این صفحه باشد.

<sup>۳۳</sup> Protein-Protein Aggregation



اگر مولکول کروموفور دارای محورهای تقارن با طول‌های متفاوت باشد، مثل نفتالین که یک مولکول مسطح با دو محور تقارن غیر هم‌اندازه است، جذب تنها وقتی روی می‌دهد که صفحه بردار E در صفحه حلقه نفتالین باشد.



ولی احتمال جذب بستگی به این خواهد داشت که بردار E، موازی محور بزرگ مولکول و یا محور کوچک آن باشد. این اثر، دورنگی<sup>۳۴</sup> نامیده می‌شود و در این حالت باید  $\epsilon$  را در جهات ویژه تعریف نمود. این اثر در مطالعه جهت‌یابی فضایی مولکول‌های بیولوژیک اهمیت زیادی دارد.

<sup>۳۴</sup> Dichroism