

1 глава. Взаимодействие фотонов с биологически - важными соединениями

1.1. Характеристики светового излучения. Электронные переходы в молекулах

Световое излучение, как известно, характеризуется длиной волны λ (нм, мкм, м) электромагнитных колебаний, частотой $\nu = c/\lambda$ и энергией квантов света (фотонов) E (Дж), причем

$$E = h\nu = hc/\lambda,$$

где h - постоянная Планка, c - скорость света. В работах по спектроскопии часто используют так называемое волновое число $1/\lambda$ (см^{-1}), которое пропорционально частоте $2/3 \nu$ электромагнитных колебаний и, следовательно, энергии фотонов. В фотохимических экспериментах, когда количество вещества выражают в молях, а концентрация - в молях на литр, удобно использовать количество энергии, соответствующее не одному фотону, а N_A фотонов, где N_A - число Авогадро (моль^{-1}). Эта величина названа Эйнштейном (Дж/моль). Таким образом, 1 Эйнштейн - это энергия одного моля фотонов, которая равна

$$E_m = EN_A = N_A h\nu = N_A hc/\lambda,$$

Из выражения (1.2) следует, что величина одного Эйнштейна меняется и зависит от длины волны света. Например, для излучения с длиной волны 300 нм 1 Эйнштейн составляет 399 кДж/моль, а для 400 нм - 299 кДж/моль. Если энергию излучения выразить в Эйнштейнах, то численно эта величина равна числу молей фотонов.

Поток излучениям Φ (Вт или Эйнштейн/с) равен энергии, переносимой через некоторую поверхность S за единицу времени t :

$$\Phi = W/t$$

В русской литературе также используют термины **лучистый поток**, мощность излучения, в английской – radiant flux, radiant power; во французской – flux energetique, в немецкой – Strahlungsfluss

Интенсивность света I , кВт/м² или Эйнштейн/(м²·с), выражают в виде плотности потока излучения, т. е. потока, падающего на единицу площади, перпендикулярной к направлению распространения света¹

$$I = \Phi_{\perp}/S$$

Доза излучения D (Дж/м² или Эйнштейн/м²) (энергетическая экспозиция, количество облучения, экспозиционная доза) равна произведению интенсивности на длительность облучения²:

$$D = It$$

¹ * Англ.-fluence rat, нем.-Dosisleistung.

² Англ.-fluence, dose, radiant exposure; франц.-exposition energetique, dose;) нем. Bestrahlung Dosis.

При взаимодействии света с веществом может происходить преломление световых лучей и их рассеяние, либо поглощение фотонов молекулами, либо то и другое вместе. Если произошло поглощение кванта света молекулой, то через $10^{-8} - 10^{-9}$ с может произойти испускание части поглощенной энергии в виде кванта света с большей длиной волны; такое излучение называют **люминесценцией**. Различают два вида люминесценции - **флуоресценцию** и **фосфоресценцию**, отличающихся по времени жизни и энергии излучаемых фотонов. Изучение поглощения фотонов и люминесценции позволяет судить о строении поглощающих свет молекул или участков молекулы (**хромофоров**), а также производить их качественный и количественный анализ, выяснять физико-химические свойства среды, окружающей молекулы или их хромофорные группы.

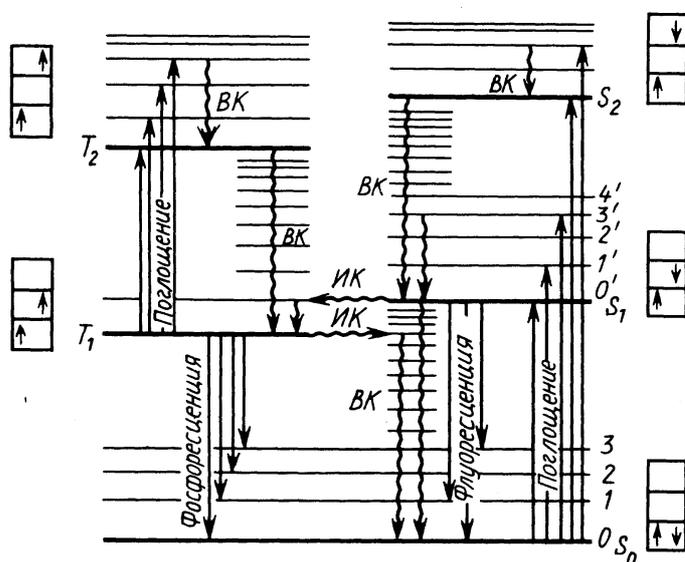


Рис.1 S_0 основное (невозбужденное) состояние. S_1 , S_2 и T_1 , T_2 – возбужденные соответственно синглетные и триплетные состояния; около каждого уровня показано направление спина возбужденного электрона по отношению к спину оставшегося электрона. Жирные горизонтальные линии – чисто электронные уровни энергии, тонкие (0, 1, 2 ... или 0', 1', 2' ...) – колебательные уровни. Прямые стрелки – поглощательные и излучательные переходы. ВК - внутренняя конверсия (переходы электрона без обращения спина); ИК интеркомбинационная конверсия (переходы электрона с обращением спина)

На основании измерения спектров поглощения и люминесценции можно построить схему энергетических уровней данной молекулы (рис. 1.1).

Дело в том, что каждая молекула имеет серию заполненных и свободных электронных орбиталей. Поглощение кванта света приводит к переходу электрона на орбиталь с большей энергией (молекула при этом переходит на более высокий энергетический уровень). Обратный переход может сопровождаться испусканием кванта люминесценции. Энергия поглощенного или испускаемого кванта равна разности энергии между уровнями:

$$E_2 - E_1 = h\nu \quad (1.1)$$

Наряду с электронными переходами в молекуле, сопровождающимися испусканием

фотона (флуоресценцией и фосфоресценцией), после поглощения кванта возможен ряд безызлучательных переходов с более высоких электронных уровней и колебательных подуровней на нижележащие уровни и подуровни. Если между молекулами в системе имеется взаимодействие, то возможен безызлучательный перенос (или **миграция**) энергии от одной молекулы к другой. Все эти процессы перераспределения энергии электронного возбуждения, разыгрывающиеся начиная с поглощения кванта, называют **фотофизическими процессами**.

1.2. Поглощение монохроматического света растворами

Пусть на кювету с раствором исследуемого вещества падает пучок монохроматического света с интенсивностью I_0 (рис. 1.2).

Если в образце происходит поглощение света, то в результате интенсивность света ослабится до величины I . Отношение этих величин называют пропусканием T .

$$T = \frac{I}{I_0}. \quad (1.2)$$

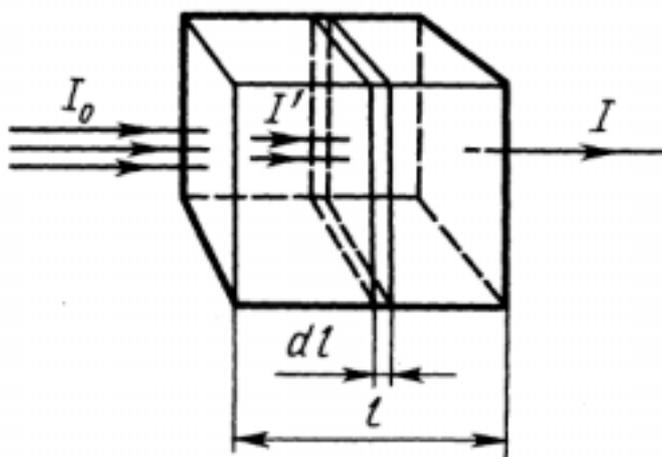


Рис. 1. 2. К выводу закона Ламберта–Бера. Объяснения в тексте.

Иногда вместо T используют коэффициент поглощения $(1 - T)$, равный

$$1 - T = \frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{I_{\text{п}}}{I_0}. \quad (1.3)$$

Где $I_{\text{п}}$ – интенсивность поглощенного света.

Увеличение концентрации поглощающего вещества или толщины кюветы с раствором, очевидно, приведет к увеличению поглощения света, т. е. величины $(1 - T)$, и уменьшению пропускания образца T . Однако

эти величины не пропорциональны ни концентрации раствора, ни толщине кюветы.

Найдем зависимость T от концентрации и толщины раствора. Для этого выделим в объеме образца тонкое сечение dl (рис. 1.2), перпендикулярное направлению I ($\text{Вт}/\text{см}^2$). Пусть концентрация поглощающих свет молекул равна n (см^{-3}). Согласно теории мишеней, каждая молекула характеризуется эффективным сечением S (см^2), называемым **поперечным сечением поглощения**, при попадании в которое происходит поглощение фотона. Суммарная площадь мишеней, приходящаяся на 1 см^2 раствора толщиной dl , будет равна $nsdl$. Ослабление интенсивности света слоем dl равно

$$dI = I \times s \times n \times dl \quad (1.4)$$

Разделим переменные и произведем интегрирование:

$$\frac{dI}{I} = nsdl; \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = ns \int_0^l dl; \ln \frac{I_0}{I} = nsl = A$$

Откуда можем найти пропускание раствора:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-nsl} = e^{-A} \quad (1.5)$$

Перейдя к более распространенным размерностям концентрации c (моль/л) и к десятичному логарифму, получим выражение для оптической) плотности

$$D = -\lg T = c\epsilon l, \quad (1.6) 1$$

Где ϵ - молярный коэффициент поглощения ($\text{л}^{-1}\text{М}^{-1}$), связанный с s соотношением:

$$T = e^{-nsl} = 10^{-c\epsilon l}; \quad \text{откуда } \epsilon = \frac{N_A \lg e}{1000} s = 2,62 \cdot 10^{20} s$$

Обозначение A (от слова absorbance – поглощаемость) чаще используется в английской литературе, D – (оптическая плотность, optical **density**) – в русской.

Уравнения (1.5 и 1.6) являются математическим выражением закона Бугери-Ламберта-Бера, основного закона ослабления света веществом, из которого следует, что T и $(1 - T)$ зависят от концентрации раствора (n или c) и длины оптического пути l экспоненциально. Такая зависимость не удобна для количественных определений концентрации.

В спектрофотометрии непосредственной величиной, измеряемой прибором, оказывается отношение интенсивности света J , прошедшего через кювету с раствором, к интенсивности света J_0 , прошедшего через такую же кювету с растворителем. Обычно в приборе предусмотрено устройство, которое преобразует полученную величину пропускания в оптическую плотность в соответствии с уравнением (1.6). Это преобразование имеет смысл потому, что в отличие от непосредственно измеряемого пропускания T и коэффициента поглощения $(1 - T)$ оптическая плотность D есть величина аддитивная: оптическая плотность смеси двух растворов равна сумме оптических плотностей каждого из них

$$D_{(1+2)} = D_1 + D_2 \quad (1.7)$$

Чтобы убедиться в справедливости уравнения (1.7), найдем величины пропускания T и оптической плотности D двух последовательно расположенных образцов (например, двух светофильтров или двух кювет с растворами), пропускание и оптическая плотность которых равны соответственно T_1 , T_2 , D_1 , и D_2 . Пусть интенсивность света, падающего на первый образец, J_0 , на второй- J_1 , а света, выходящего из второго образца, - J_2 . Тогда пропускание последовательно расположенных первого, второго образцов и системы из двух образцов равно по (1.3):

$$T_1 = \frac{I_1}{I_0}; \quad T_2 = \frac{I_2}{I_1}; \quad T_{(1+2)} = \frac{I_2}{I_0} \quad (1.8)$$

Из уравнений (1.8) следует, что $T_{(1+2)} = T_1 \times T_2$. На основании (1.6), оптические плотности рассматриваемых образцов равны

$$D_1 = -\lg T_1; \quad D_2 = -\lg T_2; \quad D_{(1+2)} = -\lg T_{(1+2)} \quad (1.9)$$

Сложив D_1 и D_2 и используя уравнения (1.8) и (1.9), получаем

$$D_1 + D_2 = -\lg(T_1 \times T_2) = D_{(1+2)} \quad (1.10)$$

Аналогичным путем легко показать, что оптическая плотность последовательно расположенных элементов равна сумме оптических плотностей каждого из них:

$$\Sigma D_i = D_\Sigma \quad (1.11)$$

Поскольку гомогенный раствор смеси нескольких веществ можно представить как чередование бесконечно тонких слоев растворов каждого из этих веществ в отдельности,

уравнения (1.10) и (1.11) применимы не только к последовательно расположенным светофильтрам, но и к растворам смеси веществ: оптическая плотность смеси равна сумме оптических плотностей всех отдельно взятых компонентов.

Прямым следствием аддитивности оптических плотностей является уравнение (1.6), согласно которому D пропорциональна концентрации раствора c и длине кюветы l .

На [рис. 1.3](#) приведена зависимость оптической плотности, пропускания T и коэффициента поглощения раствора ($1 - T$ от концентрации) раствора. Видно, что с увеличением) концентрации раствора c или длины l оптического пути света оптическая плотность растет линейно, тогда как зависимость поглощения ($1 - T$) приближается к линейной только в начале графика, т. е. при малых концентрациях и оптических плотностях. Это обусловлено тем, что передние слои ослабляют свет, доходящий до задних слоев раствора. В тонких слоях раствора или в растворах низкой концентрации этим явлением можно пренебречь и зависимость поглощения от концентрации вещества (или толщины кюветы)* имеет линейный характер. Количественно связь ($1 - T$) и D может быть представлена в виде

$$1 - T = 1 - 10^{-D}.$$

Приближенное значение ($1 - T$) при малых величинах находят как первый член степенного ряда: 1

$$1 - T \approx \ln 10 D \approx 0,4343 D \quad (1.12)$$

Формула (1.12) тем точнее, чем меньше оптическая плотности раствора. При величинах коэффициента поглощения 0,1 и 0,2 (оптических плотностях соответственно 0,045 и 0,097) ошибка в расчете D по уравнению (1.12) составляет 4,5 и 10%. При более высоких значениях коэффициента поглощения света и оптических плотностях линейность между D и ($1 - T$) заметно нарушается (см. [рис. 1.3](#))

Закон Бугера-Ламберта-Бера выполняется не всегда. Наблюдаемые от закона отклонения могут, с одной стороны, служить помехой при количественном анализе, с другой - давать дополнительную информацию о свойствах исследуемые объектов. Перечислим возможные причины появления таких отклонений:

1. Закон выводился в предположении, что молекулы хромофоров распределены в растворе равномерно. Если хромофор распределен неравномерно (например, гемоглобин в суспензии нативных эритроцитов по сравнению с гемоллизатом), то это будет приводить к занижению оптической плотности вследствие *эффекта сита* (см. [разд. 1.8](#)). Занижение тем выше, чем больше оптическая плотность частиц.

2. В формулировке закона ([1.6](#)) подразумевается, что ϵ является константой, не зависящей от концентрации.

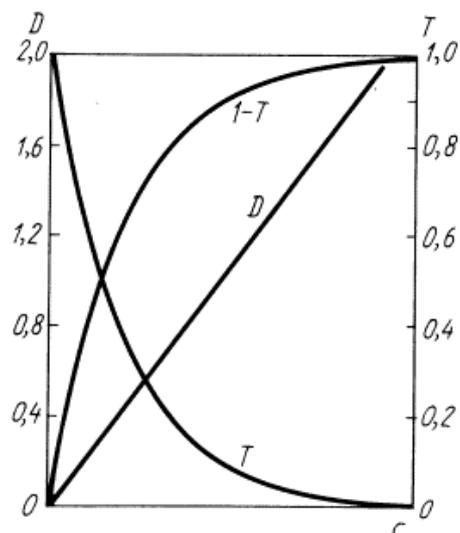


Рис. 1.3. Зависимость пропускания (T), коэффициента поглощения ($1 - T$) и оптической плотности (D) от концентрации (C) хромофора в растворе

Если при повышении концентрации характер взаимодействия между хромофорами меняется (например, происходит агрегация молекул), то фотофизические свойства молекул, в том числе и значение ϵ , будут изменяться.

3. Зависимость D от C может отклоняться от линейной при использовании монохроматического света.

4. В растворе под действием измеряющего света не должны сколько-нибудь заметно протекать фотохимические превращения хромофоров.

5. Интенсивность измеряющего светового пучка должна быть достаточно низка, чтобы в результате поглощения света концентрация невозбужденных молекул практически не уменьшалась в ходе измерения.

6. Если помимо поглощения образец рассеивает свет, то произойдет завышение D .

7. Точному измерению оптической плотности может мешать люминесценция образца. Если фотоны люминесценции будут попадать на фотодетектор, то это приведет к занижению D .

1.3. Спектры пропускания и спектры поглощения

Спектр пропускания называют зависимость пропускания *образца T от длины волны λ . Спектр пропускания обычно *используют для характеристики светофильтров, но не веществ, так как форма этих кривых зависит как от концентрации вещества, так *и от толщины кюветы.

Зависимость оптической плотности D какого-либо объекта, например раствора, от длины волны λ измеряющего света называют спектром поглощения данного объекта. Спектр раствора индивидуального соединения принято нормировать к единице концентрации и

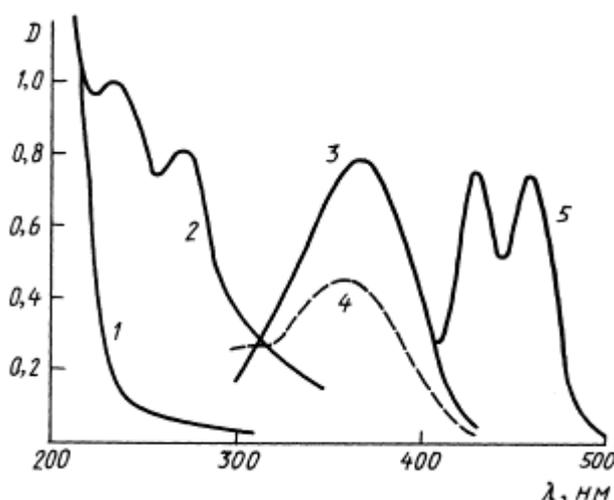


Рис. 1.4. Зависимость положения длинноволнового максимума поглощения от числа сопряженных двойных связей (N) в молекуле.

1 – фосфолипиды, выделенные из мозга ($N = 1$); 2-окисленные фосфолипиды: диеновые конъюгаты $\lambda_{\max} = 233$ нм ($N = 2$), триеновые конъюгаты $\lambda_{\max} = 270-280$ нм ($N = 3$) и, частично, карбонильные соединения; 3 - полностью-*транс*-ретинол ($N = 6$); 5 – каротиноиды ($N = 11$).

длины кюветы; т. е. спектром поглощения индивидуального вещества называют зависимость от длины волны измеряющего света молярного коэффициента [рис_4](#)поглощения ϵ (1.6).

Спектры поглощения биологически важных веществ ([рис_4](#)) представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами. У атомов и простых молекул в газовой фазе спектры поглощения линейчатые.

Почему спектры поглощения растворов – это широкие полосы, а не узкие линии?

В чем причина превращения узких линий атомов и молекул в

газовой фазе в широкие (размытые) спектры поглощения, характерные для растворов

биомолекул? Ведь энергии не только электронных уровней, но и колебательных и вращательных подуровней в молекулах квантованы, и энергии электронных переходов (а значит, и длины волн поглощаемых квантов) должны быть дискретными!

Дело в том, что в растворителе и биологических системах каждая молекула хромофора окружена несколькими полярными молекулами среды, дипольные моменты которых создают локальные электрические поля. Энергия электронных переходов при наличии внешнего электрического поля несколько изменяется, а следовательно, происходит изменение длины волны света, поглощаемого при данном электронном переходе. Эти сдвиги в энергии электронного перехода для каждой молекулы зависят от ориентации молекул среды и расстояния до них в момент поглощения кванта. Величины энергии сдвигов не квантуются, они могут принимать (в определенных пределах) любые значения. Суперпозиция огромного числа смещенных линий поглощения, каждая из которых как бы соответствует индивидуальным молекулам, приводит к появлению плавной кривой поглощения раствора в целом. Максимум на этой кривой (λ_{\max}) соответствует наиболее вероятной, усредненной величине энергии электронного перехода E , которая может быть вычислена по уравнению

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

где λ - положение максимума.

Каждая полоса поглощения в абсорбционном спектре, помимо положения максимума, может быть охарактеризована еще тремя величинами: площадью под кривой поглощения, амплитудой (оптическая плотность в максимуме поглощения) и полушириной полосы поглощения (расстояние между точками на кривой поглощения, соответствующее половине амплитуды, т. е. $\epsilon/2$) (рис. 1.5).

Площадь под кривой поглощения на графике зависимости ϵ от волнового числа $\bar{\nu}$ (рис. 1.5) прямо пропорциональна безразмерной величине, называемой силой осциллятора f , которая характеризует вероятность электронных переходов в результате захвата квантов света данным хромофором:

$$f_{mn} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\bar{\nu}_m}^{\bar{\nu}_n} \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (1.13)$$

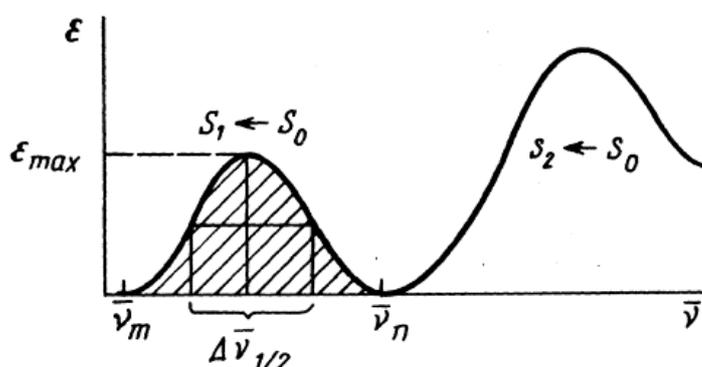


Рис. 1.5. Полосы поглощения, соответствующие различным электронным переходам

Электрон, поглощая фотоны той или иной энергии, может переходить на разные возбужденные электронные уровни (S_0' , S_1' и т. д.) (см. рис. 1.1), при этом в спектре поглощения вещества будет наблюдаться несколько полос (рис. 1.5). Если сложить площади полос поглощения, обусловленных переходами электронов с одной и той же электронной орбитали (одноэлектронный переход), то выполняется правило сумм Куна-

Томаса: $f=1$. Другими словами, если все полосы поглощения обусловлены одноэлектронным переходом, то сила осциллятора по всем этим полосам будет равна 1, при двухэлектронном переходе $f=2$ и т. д.

Для многих сильно окрашенных соединений характерно то, что длинноволновая полоса поглощения обусловлена одним сильным электронным переходом с силой осциллятора, близкой к единице. По этой причине площадь длинноволновой полосы поглощения таких веществ приблизительно одинакова, несмотря на то, что химическая структура веществ может заметно различаться.

[Фрагмент текста главы пособия пропущен, как несущественный].

1.4. Спектры поглощения и химическая структура биологически-важных соединений

Из спектров поглощения некоторые биологически важных) соединений (см. [рис. 1.4](#)) видно, что чем больше в молекуле число сопряженных двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. Молекулы пероксидов жирных кислот содержат две сопряженные двойные связи (диеновые конъюгаты), максимум в спектре поглощения лежит при 233 нм. Продукты пероксидного окисления липидов, содержащие три сопряженные двойные связи (триеновые конъюгаты), имеют максимум поглощения 260-280 нм. Ретиналь, молекулы которого содержат 6 сопряженных двойных связей, характеризуется максимумом поглощения 360 нм.

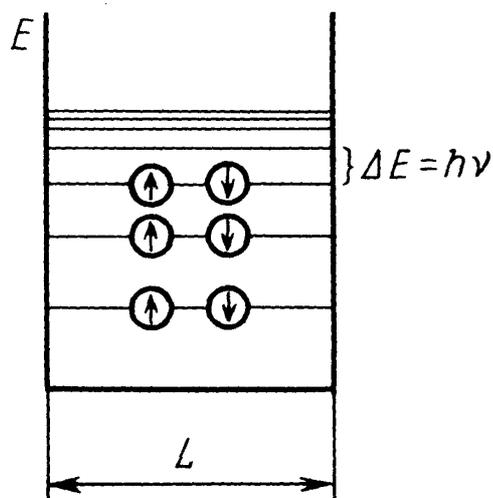


Рис. 1.6. Энергетические уровни π -электронов в потенциальной яме

потенциальной яме с высокими стенками ([рис. 1.6](#)), их средняя скорость перемещения равна v . Согласно соотношению де Бройля в квантовой механике движущемуся электрону соответствует волна, длина которой равна

$$\lambda = h/mv \quad (1.15)$$

где h – постоянная Планка, m – масса электрона.

Электрон (волна) не выходит за пределы потенциальной ямы; минимум энергии в такой системе (т. е. ее устойчивое состояние) соответствует ситуации, когда внутри ямы возникают

стоячие волны с узлами на стенках. В потенциальной яме длиной L должно укладываться целое число n полуволн

$$L = n\lambda / 2, \quad (1.16)$$

где $n = 1, 2, 3, \dots$ и т. д. Подставив λ из (1.16) в уравнение (1.15), находим возможные значения скорости электрона

$$v = h / m\lambda = nh / 2mL,$$

его кинетическая энергия равна

$$E = mv^2 / 2 = n^2 h^2 / 8mL^2.$$

Таким образом, энергия π -электронов в молекуле квантована и может иметь значения $h^2 / 8mL^2, 4h^2 / 8mL^2, 9h^2 / 8mL^2, \dots$, но не промежуточные. Согласно принципу Паули на каждом уровне энергии могут располагаться только два электрона с противоположными спинами. Следовательно, $2N$ π -электронов N -членной цепи занимают N уровней с энергиями от $h^2 / 8mL^2$ до $N^2 h^2 / 8mL^2$.

Вычислим теперь частоту ν наиболее длинноволновой полосы поглощения молекулы, которая соответствует переходу электрона с верхней заполненной молекулярной орбитали на нижнюю свободную

$$h\nu = (E_{N+1} - E_N),$$

откуда

$$\nu = \frac{1}{h} \left\{ \frac{(N+1)^2 h^2}{8mL^2} - \frac{N^2 h^2}{8mL^2} \right\} \quad (1.17)$$

Подставив в (1.17) $L = Nl$, находим

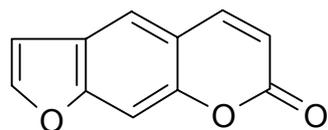
$$\nu = \frac{2N+1}{N^2} \frac{h}{8ml^2} \quad (1.18)$$

При $N \geq 2$ первый множитель в (1.18) можно принять $\approx 2 / N$, тогда $\nu \approx \frac{h}{4ml^2} \frac{1}{N}$, т.е.

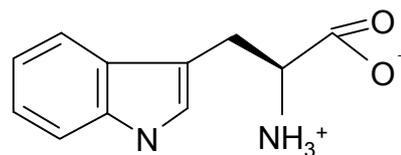
длина волны поглощаемого света пропорциональна N :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \approx \frac{4mlc^2}{h} N \quad (1.19)$$

Вследствие большого числа допущений, сделанных при выводе уравнения (1.19), его нельзя применять с целью количественного расчета положения максимума поглощения того или иного органического соединения с известным числом сопряженных двойных связей. Но качественно оно иллюстрирует известный экспериментальный факт – с увеличением числа сопряженных связей в молекуле максимум в спектре поглощения сдвигается в сторону больших длин волн (см. [рис. 1.4](#)). Молекулы большинства веществ, поглощающих свет в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра, имеют наряду с сопряженными двойными связями гетероатомы (например атомы кислорода в молекуле псоралена или азота в индольном кольце триптофана), входящие в систему сопряженных связей или непосредственно примыкающие к ней:



Псорален



Триптофан

Как показано на [рис. 1.7](#), энергия верхних заполненных электронных уровней у неподеленных электронов таких гетероатомов (n -орбитали) значительно превышает не

только энергию σ -электронов, образующих одинарные связи между атомами (σ -орбитали), но часто превышает и энергию заполнения орбиталей сопряженных двойных связей (π -орбитали).

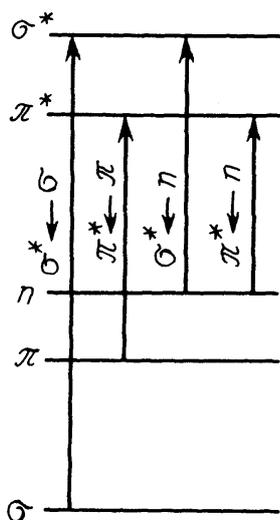


Рис. 1.7. Электронные переходы различных типов

Переход n -электронов при поглощении фотона может происходить на возбужденный уровень π -электронов (π^* -орбиталь). Такой переход называют $n-\pi^*$ -переходом. Соответствующая ему длина волны может быть большей, чем при $\pi-\pi^*$ -переходе в той же молекуле. Переход проявляется чаще в виде длинноволнового плеча на основной полосе поглощения, поскольку молярный коэффициент $n-\pi^*$ -поглощения обычно невелик. Наиболее изучен $n-\pi^*$ -переход в карбонильной группе $>C=O$, входящей в состав ацетона, пептидных связей и т. д. Длина волны максимума полосы поглощения, обусловленного $n-\pi^*$ -переходом в ацетоне, расположена около 280 нм; $\epsilon_{\max} = 17 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{см})$.

1.5. Спектрофотометры

Измерение спектров поглощения растворов, суспензий и даже целых тканей осуществляется с помощью спектрофотометров. При всем разнообразии конструкций эти приборы можно разделить на однолучевые и двухлучевые. Функциональная блок-схема однолучевого спектрофотометра приведена на [рис. 1.8](#), а.

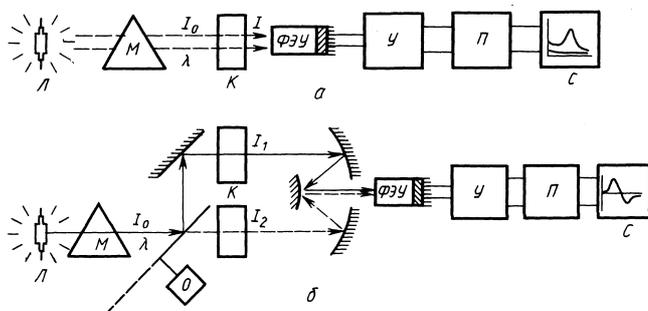


Рис. 1.8. Блок-схемы однолучевого (а) и двухлучевого (б) спектрофотометров

Свет от источника Л (чаще используют ксеноновые лампы, дающие сплошной спектр излучения в видимом и ультрафиолетовой областях) проходит через монохроматор М. Монохроматический пучок света проходит через кювету К, и его интенсивность измеряют приемником света ФЭУ. Фототек подается на вход усилителя, затем сигнал преобразуется в специальном электронном блоке

П и подается на самописец С. В современных однолучевых спектрофотометрах вначале

записывают при всех длинах волн интенсивность света, прошедшего через контрольную кювету, заполненную растворителем $I_0 = f(\lambda)$. В преобразователе, где используется микропроцессор, сигналы I_0 запоминаются, а самописец вычерчивает нулевую линию, показывающую, что оптическая плотность образца принимается за нуль. Затем ставят кювету с испытуемым раствором и измеряют интенсивность проходящего света $I = f(\lambda)$. В преобразующем устройстве происходит расчет либо пропускания $T = I/I_0$, либо оптической плотности по уравнению (1.6). Эти величины при различных длинах волн записывают самописцем.

Однолучевые спектрофотометры уступают двухлучевым по своим характеристикам, на результатах измерения спектров называется нестабильность светового излучения ламп, чувствительности ФЭУ и электронной системы усиления фототека. В двухлучевых спектрофотометрах (рис. 1.8, б) монохроматический пучок света расщепляется на два с помощью вращающегося зеркала с секторными вырезами (обтюратор O). Эти два одинаковых по интенсивности пучка проходят через две кюветы с растворами, один из которых служит в качестве контрольного. Фотоумножитель измеряет сигналы, попеременно поступающие к нему на выходе из кювет. После усиления эти сигналы преобразуются в отношение световых потоков $I/I_0 = \Delta T$ и затем в $\Delta D = -\lg(\Delta T)$ или $\Delta A = -\ln(\Delta T)$. Кривая $\Delta D = f(\lambda)$ записывается самописцем. Таким образом, двухлучевой спектрофотометр специально предназначен записи разностных спектров (см. разд. 1.7). На нем можно записывать и обычные спектры поглощения, если в качестве образца сравнения взять кювету с растворителем. Поскольку обтюратор дает ≈ 50 сигналов для каждого пучка в 1 с, а современные микропроцессоры в состоянии произвести расчеты каждой пары таких сигналов (учитывая также темповой ток ФЭУ), все медленные изменения чувствительности ФЭУ и интенсивности излучения лампы автоматически исключаются, так как отношение I_1/I_2 остается постоянным при одновременном однонаправленном изменении сигналов I_1 и I_2 . В итоге дифференциальные спектрофотометры более чувствительны, чем однолучевые и позволяют измерять разницу в оптической плотности образцов до 10^{-4} при базовой оптической плотности до 2.

Не нужно думать, что монохроматор позволяет получить абсолютно монохроматическое излучение. Ширина щелей на входе и выходе монохроматора не бесконечно мала, в результате чего выделяется не строго монохроматический пучок, а интервал длин волн, называемый спектральной шириной щелей. Выбор спектральной ширины щелей зависит от разрешенности спектра поглощения. Считается, что соотношение между $\Delta\lambda_{\text{щ}}$ и полушириной полос поглощения $\Delta\lambda_{1/2}$ должно удовлетворять уравнению

$$\Delta\lambda_{\text{щ}} \leq \Delta\lambda_{1/2} / 10.$$

Другая причина возможных ошибок при измерении спектра поглощения – присутствие в монохроматическом измеряющем пучке примеси *блуждающего света*: фотонов с другими длина волн, попадающими на выход монохроматора вследствие многократных отражений вошедшего в прибор света на внутренне деталях прибора. Блуждающий свет может занижать или, наоборот, завышать D . Эффект блуждающего света можно резко снизить, если на пути измеряющего светового пучка дополнительно установить светофильтр, пропускающий излучение в исследуемой области спектра и не пропускающий блуждающий свет. При работе в коротковолновом ультрафиолете рекомендуется использовать двойные монохроматоры: свет, вышедший из первого монохроматора, подается на вход второго.

1.6. Качественный и количественный спектрофотометрический анализ

Качественный спектрофотометрический анализ основывается на том, что каждое соединение имеет характерный для него спектр поглощения. Для идентификации вещества наиболее важны следующие параметры:

- 1) число максимумов в спектре поглощения,
- 2) положение (длина волны) каждого максимума;
- 3) значение коэффициентов поглощения в каждом из максимумов (в единицах s или ϵ);
- 4) отношение амплитуд максимумов, т. е. отношение коэффициентов поглощения в максимумах, если их несколько.

Сложность спектра поглощения зависит от того, какому числу электронных переходов между разными уровнями соответствует данный спектр. Считается, что каждый электронный переход дает полосу поглощения, которая на графике представлена кривой, близкой к гауссовой кривой нормального распределения.

Количественный спектрофотометрический анализ основан на применении закона Бугера-Ламберта-Бера (1.5) и (1.6). При количественном анализе можно одновременно определять концентрацию нескольких веществ, если спектры их поглощения различаются по форме. Суммарный спектр поглощения D_{Σ} нескольких веществ есть простая сумма спектров поглощения компонентов, так как при всех длинах волн оптические плотности компонентов суммируются. Например, для двухкомпонентной смеси при любой длине волны $D_{A+B} = D_A + D_B$, где D_A и D_B – оптические плотности компонентов. Исходя из уравнения (1.10) можно записать:

$$D_{A+B} = \epsilon_A c_A l + \epsilon_B c_B l \quad (1.20)$$

Если молярные коэффициенты поглощения для обоих веществ ϵ_A и ϵ_B известны, равно как и толщина кюветы l , то найти неизвестные концентрации c_A и c_B все равно нельзя, если измерения D_{A+B} проводились *при одной* длине волны. Для *двух* разных длин волн составляют систему из двух уравнений с двумя неизвестными, решив которую, находят обе концентрации:

$$D^{\lambda_1} = (\epsilon_A^{\lambda_1}) c_A l + (\epsilon_B^{\lambda_1}) c_B l \quad (1.21)$$

$$D^{\lambda_2} = (\epsilon_A^{\lambda_2}) c_A l + (\epsilon_B^{\lambda_2}) c_B l \quad (1.22)$$

Выбранные две длины волны λ_1 и λ_2 должны быть такими, для которых молярные коэффициенты поглощения компонентов $(\epsilon_A^{\lambda_1})$, $(\epsilon_B^{\lambda_1})$ и $(\epsilon_A^{\lambda_2})$, $(\epsilon_B^{\lambda_2})$ различаются больше всего; это не всегда соответствует максимумам в спектре поглощения веществ (рис. 1.9). Теоретически, если число длин волн, используемых для измерений, равно числу компонентов, можно проанализировать и более сложные

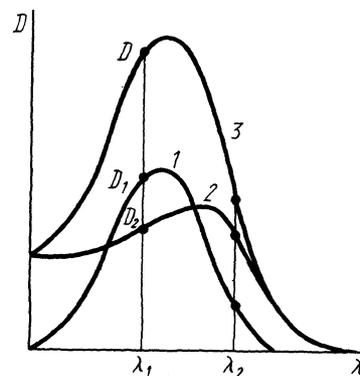


Рис. 1.9. Количественный спектрофотометрический анализ смеси двух веществ: 1, 2-спектры компонентов; 3-спектр смеси.

смеси. На практике же редко удастся осуществить количественный спектрофотометрический анализ более 2-3 соединений в одной смеси. Критерием правильности анализа может служить совпадение сконструированного спектра, рассчитанного после определения концентраций, по уравнению типа приведенного выше, со спектром смеси, измеренным в опыте.

При количественном спектрофотометрическом анализе главная задача исследователя – измерить концентрации, а значит, и оптические плотности растворов с наибольшей возможной точностью. Можно показать, что наименьшая погрешность в определении концентрации получается при оптической плотности раствора от 0,2 до 0,8.

Фрагмент текста из книги опущен, как несущественный

Есть несколько способов, позволяющих добиться максимальной точности спектрофотометрического анализа: а) разбавление слишком концентрированного раствора или б) уменьшение толщины образца; в) подбор длины волны, при которой обеспечивается попадание измеряемых величин оптической плотности в оптимальные пределы.

1.7. Дифференциальная (разностная) спектрофотометрия

При изучении биологических систем часто необходимо измерить небольшие изменения оптической плотности на фоне сильного поглощения и светорассеяния образца. Это можно сделать двумя способами.

1. Последовательно измеряют спектры поглощения опытного образца $D_1 = -\lg(I_1/I_0)$ и образца сравнения $D_2 = -\lg(I_2/I_0)$, затем вычитают из первой величины вторую и получают разностный спектр поглощения, т. е. кривую зависимости $\Delta D = D_2 - D_1$ от длины волны.

2. Непосредственно измеряют разностный (дифференциальный) спектр поглощения без регистрации интенсивности света, прошедшего через пустую кювету (I_0), сравнивают интенсивности света, прошедшего через опытный I_2 и контрольный (I_1) образцы:

$$\Delta D = -\lg(I_2 / I_1). \quad (1.23)$$

Метод разностной спектрофотометрии дает возможность определить величину ΔD с большей точностью, чем при последовательном измерении спектров двух сравниваемых образцов. Выигрыш в точности измерения тем выше, чем больше общая оптическая плотность, т. е. чем меньше отношение $\Delta D/D$.

Фрагмент пропущен

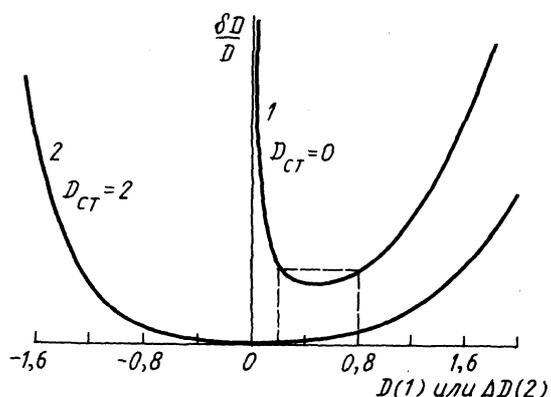


Рис. 1.10. Ошибка определения оптической плотности $\delta D/D$ при обычной (1) и разностной (2) спектрофотометрии

На рис. 1.10 (кривая 2) приведен график зависимости относительной ошибки измерений ($\delta D/D$) от ΔD , из которого видно, что метод разностной спектрофотометрии дает наибольшие

преимущества при высокой оптической плотности образца (кривая дана для $D = 2$) и малых величинах изменения оптической плотности в опытном образце по сравнению с контрольным.

1.8. Искажения спектров в биологических объектах

При измерениях спектров поглощения биологических объектов, таких, как целая ткань или суспензия клеток, могут возникнуть искажения, причиной которых могут быть:

- а) Эффект многократного отражения и рассеяния света на частицах и
- б) Эффект сита (или проскока).

Влияние рассеяния света образцом

В результате светорассеяния происходит отклонение измеряющего светового пучка от первоначального направления, вследствие чего не весь прошедший свет попадает на фотоприемник. Это приводит к завышению измеряемой оптической плотности. Для борьбы с эффектом светорассеяния используют спектрофотометры, снабженные светоизмерительным шаром (интегрирующей сферой Ульбрихта). В этом случае практически весь рассеянный образцом свет попадает на фотоприемник, и измеряемая оптическая плотность обусловлена только истинным поглощением. В некоторых приборах для борьбы с эффектом светорассеяния сразу за кюветами располагают светорассеивающие пластинки, а фотодетектор максимально приближают к кюветам. Фактически рассеивающая пластинка нивелирует разницу между мутными и прозрачными образцами. Дело в том, что большая часть света, рассеянного частицами в суспензии, направлена вперед и попадает на пластинку. Фотодетектор измеряет свет, рассеянный пластинкой, а не образцом. Таким образом, интенсивность регистрируемого света мало зависит от того, рассеивает образец свет или нет.

Однако далеко не все приборы приспособлены для автоматического учета влияния светорассеяния, в таких случаях вводят поправки. Рассмотрим один из таких методов.

Можно считать поглощение и рассеяние света независимыми процессами, т. е. измеряемая оптическая плотность D есть сумма оптической плотности, обусловленной светорассеянием D_s , и оптической плотности, обусловленной истинным поглощением D_a

$$D = D_s + D_a \quad (1.24)$$

Чтобы найти D по уравнению (1.24), нужно знать зависимость D_s от длины волны. Известно, что для суспензии частиц в отсутствие поглощения

$$D_s = a/\lambda^n \quad (1.25)$$

где a и n – константы, причем в зависимости от формы и размеров частиц n может иметь значения от 0 до 4. Прологарифмировав уравнение (1.25), получим

$$\lg D_s = \lg a - n \lg \lambda \quad (1.26)$$

где $\lg D_s$ – линейная функция $\lg \lambda$.

Построив график зависимости $\lg D = f(\lg \lambda)$, можно убедиться, что в длинноволновой области спектра, где поглощение отсутствует и $D = D_s$, получится прямая линия; экстраполировав ее, можно найти величину $\lg D_s$, а следовательно, D_s во всем измерении

спектральном интервале. В заключение рассчитываем $D_a = D - D_s$ и строим истинный спектр поглощения $D_a = f(\lambda)$.

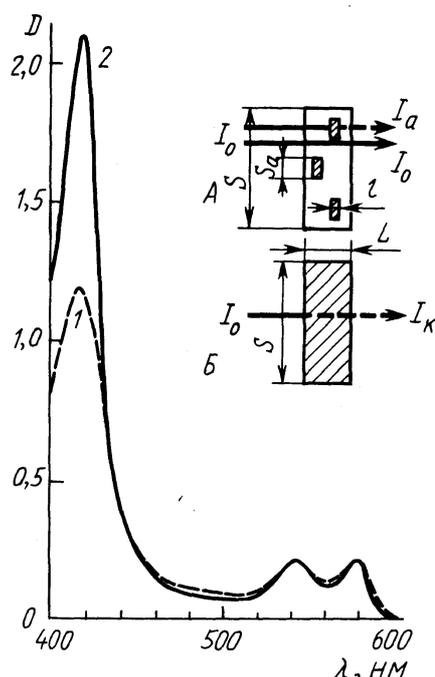


Рис. 1.11. Эффект сита в суспензии эритроцитов

1 - спектр поглощения суспензии эритроцитов;
2 - тот же образец после гемолиза: А - прохождение пучка света через суспензию эритроцитов; Б - через гемолизат

Расчеты показывают, что, в зависимости от ориентации, эритроциты пропускают в максимуме поглощения 418 нм всего 36-77% света, а в максимуме 540 нм – 88-97%. Из этих данных видно, что в синей области спектра (в полосе Соре) эритроцит поглощает значительную долю падающего на него светового потока.

В результате оптическая плотность суспензии оказывается ниже, чем оптическая плотность раствора оксигемоглобина, что имеет место главным образом в области 418 нм, где оптическая плотность этого гемопротеида особенно велика.

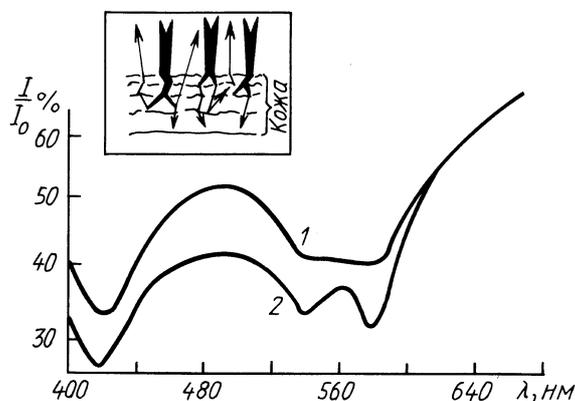


Рис. 1.13. Спектры отражения кожи человека 1 и 2 - участок кожи до и после развития УФ-В эритемы; на вставке показан путь света в коже

Эффект «сита»

Поглощение света суспензией окрашенных частиц (например, эритроцитов) отличается от поглощения света раствором окрашенного вещества (например, раствором гемоглобина, вышедшего из эритроцитов при гемолизе). Это различие в поглощении объясняют эффектом сита, суть которого состоит в том, что при прохождении пучка света интенсивностью I_0 через объект, в котором окрашенное вещество распределено неравномерно, ослабление пучка будет различным в тех местах, где свет проходит через окрашенные частички I_a и I_k , и там, где он их минует (см. рис. 1.11, А и Б.)

Фрагмент пропущен, как несущественный

Эффект сита сказывается тем сильнее, чем больше неравномерность распределения поглощающего вещества и чем выше оптическая плотность частиц.

Какова же реальная оптическая плотность для частиц в суспензии, например, эритроцитов?

Фрагмент пропущен, как несущественный.

Таким образом, эффект сита приводит к сглаживанию спектров поглощения.

Фрагмент пропущен

В некоторых случаях количественную оценку содержания поглощающего свет вещества в образце проводят, регистрируя не спектры поглощения, а спектры отражения. Так, например, оценивают содержание гемоглобина в коже.

Падающий монохроматический свет (I_0), проникая в кожу, ослабляется за счет поглощения. Часть света после многократного рассеяния клетками кожи

выходит обратно – отражается. Отношение интенсивности отраженного света (I) к падающему называется *отражательной способностью*. При эритеме, когда резко усиливается микроциркуляция и повышается содержание гемоглобина в коже, уменьшение отражательной способности в области поглощения гемоглобина (540 и 578 нм) служит количественным критерием эритемы ([рис. 1.13](#)).

Вопросы для самоконтроля и к зачету 2000

1. Уровни энергии в атомах и молекулах. Переходы электронов между уровнями. Энергия перехода.
2. Поглощение света биологическими молекулами. Пропускание, оптическая плотность, поглощающая способность (absorbance).
3. Зависимость поглощения от концентрации вещества. Вывод уравнения Ламберта-Бера.
4. Спектр пропускания и спектр поглощения. Нарисуйте известные вам спектры поглощения биологически важных веществ.
5. Влияние светорассеяния на спектры поглощения. Как (1) устранить или (2) учесть влияние светорассеяния.
6. Поглощение света смесью веществ. Как найти долю света, поглощенного каждым веществом в смеси двух веществ?