

## Глава 4. Первичные стадии фотобиологических процессов

### 4.1 Фотобиологические процессы и их стадии

Изучение биофизических аспектов фотобиологических процессов является центральным разделом квантовой биофизики. К фотобиологическим относят процессы, начинающиеся с поглощения кванта света биологически важной молекулой и заканчивающиеся какой-либо физиологической реакцией (позитивной или негативной) на уровне организма. К таким процессам относятся:

**Фотосинтез** - синтез органических молекул за счет энергии солнечного света;

**Фототаксис** - движение организмов, например бактерий, к свету или от света;

**Фототропизм** - поворот листьев или стеблей растений к свету или от света;

**Зрение** - превращение световой энергии в энергию нервного импульса в сетчатке глаза или в аналогичных фоторецепторах;

**Действие ультрафиолетовых лучей** (бактерицидное или бактериостатическое действие на микроорганизмы, мутагенное действие, канцерогенное действие, образование витамина D из провитаминов, эритемное действие на кожу, образование загара, терапевтические эффекты).

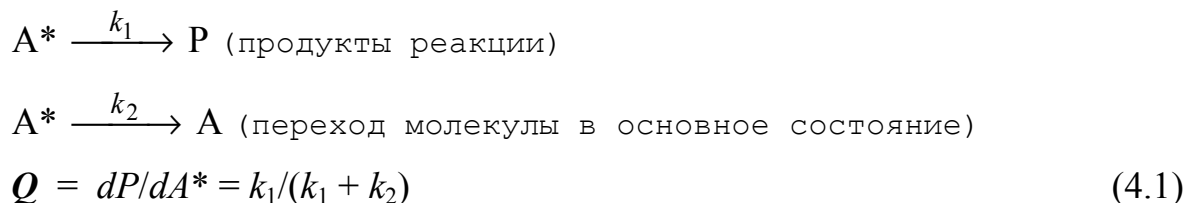
К фотобиологическим процессам также может быть отнесена биохемилюминесценция (сверхслабые свечения, биолюминесценция) (см. гл. 9). (Здесь, наоборот, определенные биохимические реакции сопровождаются появлением электронно-возбужденного продукта с последующим испусканием кванта люминесценции.)

Фотобиологические процессы весьма разнообразны. Каждый из них состоит из многих стадий, начиная с акта поглощения кванта света и кончая физиологическими реакциями на уровне целого организма. Условно всякий фотобиологический процесс можно разбить на несколько стадий: 1) поглощение кванта света, 2) внутримолекулярные процессы размена энергией (фотофизические процессы); 3) межмолекулярные процессы переноса энергии возбужденного состояния; 4) первичный фотохимический акт; 5) темновые реакции, заканчивающиеся образованием стабильных продуктов; 6) биохимические реакции с участием фотопродуктов; 7) общефизиологический ответ на действие света.

В настоящей книге будут рассмотрены преимущественно начальные, физико-химические стадии фотобиологических процессов. Первые три стадии фотохимического процесса одинаковы для процессов фотохимии и люминесценции; поэтому законы фотохимии имеют свои аналоги с законами люминесценции (см. гл. 3). **Первичный фотохимический акт** - это процесс, в который вступает молекула из нижнего синглетного  $S_0$  или триплетного  $T_1$  возбужденного состояния.

Квантовый выход  $Q$  - это отношение числа прореагировавших молекул к числу поглощенных фотонов. В случае первичных стадий

фотохимических реакций квантовый выход равен отношению числа возбужденные молекул вещества, вступающих в фотохимический процесс, к общему числу возбужденных молекул:



В реальных условиях опыта квантовый выход можно определять, измеряя убыль исходного вещества  $\Delta A$  или накопление продукта реакции  $\Delta P$  за конечное время  $t$  под действием облучения объекта монохроматическим светом с интенсивностью  $J$  Эйнштейн/с):

$$\Phi = -\Delta A / [Jt(1 - T)]^* \quad (4.2)$$

где  $(1 - T)$  - коэффициент поглощения;  $Jt$  - доза облучения;  $Jt(1 - T)$  - общее количество поглощенных фотонов (Эйнштейн).

Определяемый в опыте квантовый выход  $Q$  зависит от условий эксперимента. Так, поглощение действующего света продуктами реакции или посторонними веществами будет снижать  $Q$ , а развитие цепных реакций, инициируемых первично образовавшимися радикалами, может привести к высоким квантовым выходам образования продуктов реакции (значительно больше единицы). Для понимания механизма фотохимического процесса особенно важен квантовый выход первичной реакции, определяемый по уравнению 4.1).

#### 4.2. Фотохимический спектр действия

Одна из задач при изучении фотобиологических процессов - определение вещества, которое поглощает действующее излучение и тем самым участвует в первых стадиях процесса. Для этого изучают спектр фотохимического действия и сравнивают его со спектрами поглощения предполагаемых участников реакции. Сущность такого подхода мы поясним на примере фотохимической инактивации ферментов при ультрафиолетовом облучении. Особенность этой реакции состоит в том, что она протекает по **одноударному механизму**: под действием поглощенного кванта молекула либо совсем не изменяется, либо полностью инактивируется; вероятность инактивации и есть квантовый выход инактивации  $Q$ .

Рассмотрим кинетику этого процесса. Пусть в кювете с сечением  $S$  ( $\text{см}^2$ ) и толщиной  $l$  см находится разбавленный раствор фермента в концентрации  $n$  молекул в  $1 \text{ см}^3$  ( $\text{см}^{-3}$ ), всего в кювете находится  $nSl$  молекул. Пусть, далее, на кювету падает поток квантов света  $J_0$  ( $\text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ), который ослабляется на выходе из кюветы до величины  $J$ . Поток квантов света, падающих на раствор, очевидно, равен  $J_0S$ . Каждую секунду раствор будет поглощать  $J_0S - JS = J_0S(1 - T)$  фотонов, где  $T = J/J_0$  - коэффициент пропускания. При этом в растворе ежесекундно инактивируется

$$\frac{d(nSl)}{dt} = QJS(1-T), \text{ откуда } \frac{dn}{dt} = QJ(1-T)/l \quad (4.3)$$

молекул, где  $Q$  – квантовый выход фотохимической реакции. Величины  $J$ ,  $J_0$ ,  $s$  и  $l$  связаны между собой по закону Бугера–Ламберта–Бера

$$T = \frac{J}{J_0}; D = -\lg T; D = cl\varepsilon$$

$$\text{или в другой форме: } A = -\ln T; A = nls \quad (1.5).$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора,  $A$  – absorbency,  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощения,  $s$  – поперечное сечение поглощения молекулы,  $c$  – концентрация в молях/литр,  $n$  – концентрация в числе молекул в  $1 \text{ см}^3$ .

Из уравнений (4.3) и (1.5) находим

$$\frac{dn}{dt} = QJ(1 - e^{-nsl})/l \quad (4.4)$$

В разбавленных растворах, где  $nsl \ll 1$ , выражение в скобках (4.4) приблизительно равно  $nsl$  (погрешность  $< 5\%$  при  $nsl < 0,1$ ).

Тогда можно написать, что  $\frac{dn}{dt} = QJns$  (4.5)

Решение уравнения (4.5) дает  $\frac{dn}{n} = QJsd t$ ;  $\int_{n_0}^n \frac{dn}{n} = QJs \int_0^t dt$ ;

$$\ln \frac{n_0}{n} = QJst \text{ или } \ln \frac{n_0}{n} = \sigma D \quad (4.6)$$

где  $D$  – доза облучения,  $\sigma = Qs$  – **поперечное сечение инактивации фермента**, имеет размерность площади.

Для определения  $\sigma$  строят график зависимости  $\ln n = f(D)$  (рис. 4.1); величина  $\sigma$  определяет наклон прямой. Поскольку при  $n_0/n = e$   $\ln(n_0/n) = 1$ , можно найти  $\sigma$  непосредственно из дозовой кривой инактивации:  $\sigma = 1/D_{37}$ , где  $D_{37}$  – доза облучения, при которой остались неповрежденными 37% молекул.

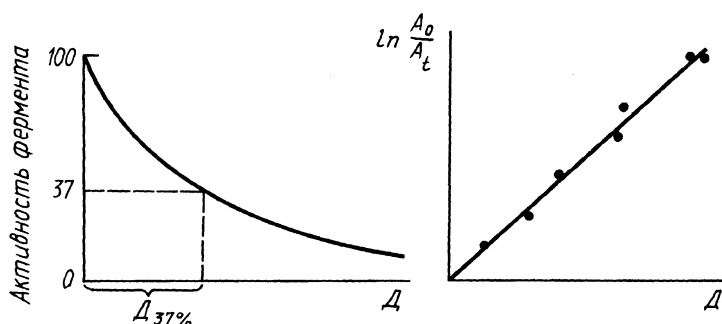


Рис. 4.1. Определение поперечного сечения инактивации фермента:  $A_0$  и  $A_t$ —активности фермента перед облучением и после облучения дозой  $D$ .

в ходе облучения, уравнение (4.3) усложняется и принимает вид [сравни уравнение (2.10)]

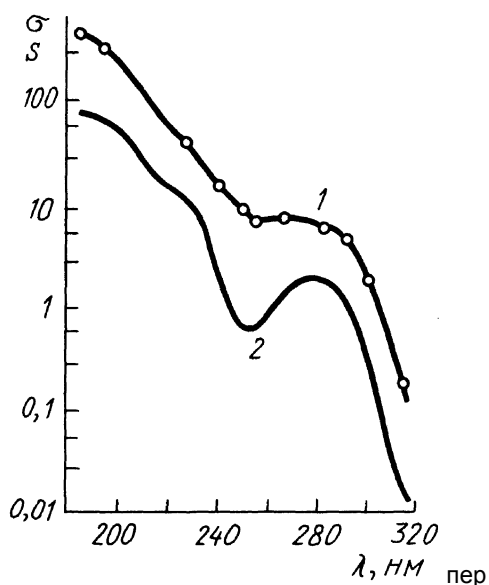
$$\frac{dn}{dt} = QJ \frac{D_A}{D_A + D_B} (1-T)/l \quad (4.7)$$

где  $D_A$  оптическая плотность вещества, участвующего в фотохимической реакции.

Подставим в уравнение (4.7)  $s_A n_A / \ln 10$  вместо  $D_A$ , разделим переменные и проинтегрируем; получаем

$$\ln \frac{n_0}{n} = JtsQ \frac{l(1-T)}{\ln 10 D} = D\sigma K \quad (4.8)$$

где  $K$  — константа, учитывающая экранировку фотолизируемого вещества.



4.2. Спектр действия фото-инактивации (1) и спектр поглощения трипсина (2)

При нужной длине волны следует измерить оптическую плотность  $D$ , рассчитать коэффициент экранировки  $K$  и затем найти  $\sigma$  из уравнения (4.8).

В фотохимии **спектр действия** называют зависимость  $\sigma$  от длины волны действующего света (рис. 4.2).

Как и квантовый выход люминесценции, квантовый выход фотохимических реакций органических молекул в растворах не зависит от длины волны действующего света. Это было экспериментально подтверждено еще в работах О. Варбурга и сотрудников, которые исследовали действие света на белковые системы. Так как  $Q$  от длины волны не зависит, то, поскольку  $\sigma = sQ$ , спектр действия

$\alpha(\lambda)$  для индивидуального вещества по форме соответствует спектру его поглощения  $s(\lambda)$ . Измерив (в разбавленных растворах) по дозовым кривым спектр действия, можно определить спектр поглощения участвующего в процессе вещества, не проводя никаких спектрофотометрических измерений. Именно это и обуславливает интерес к регистрации спектров действия в фотобиологии.

Сравнительно простой случай – определение спектров действия

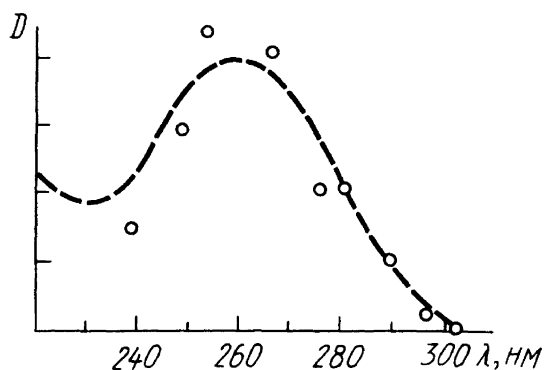


Рис. 4.3. Спектр действия возникновения мутаций у кукурузы:

---- оптическая плотность, (O) эффективность УФ-индукции мутаций

фотоинактивации белков.

На рис. 4.2 представлен спектр действия

фотоинактивации

трипсина. В трипсине

есть три главных

хромофора – остатки

триптофана, тирозина и

цистина, которые и

обуславливают спектр

поглощения. Как видно из

спектра действия, для

инактивации белка

существен фотолиз всех

трех аминокислот, так

как спектр действия

близок суммарному спектру поглощения этих аминокислот.

Точно так же было установлено, что кривая гибели бактерий под действием ультрафиолета имеет максимум в области 265 нм и форма этой кривой напоминает спектр поглощения нуклеиновых кислот

(Ф.Л. Гейтс, 1930). Поэтому был сделан вывод, что гибель бактерий

под действием УФ-излучения связана с повреждением нуклеиновых

кислот. Аналогичное наблюдение было сделано при изучении

мутагенного действия ультрафиолета. Спектр действия (рис. 4.3)

возникновения мутаций у кукурузы оказался идентичным спектру

поглощения нуклеиновых

кислот (Л.Дж. Стадлер,

1942).

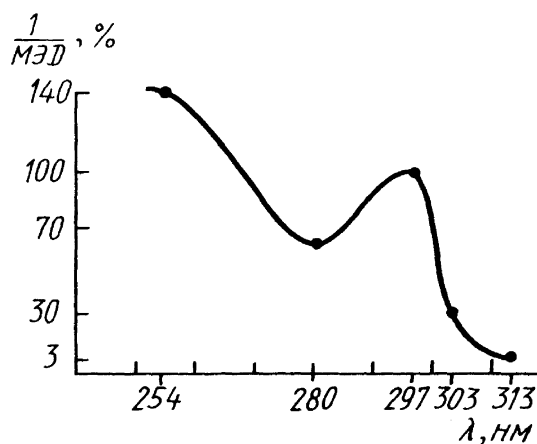


Рис. 4.4. Спектр действия УФ-эритемы кожи человека

В случае сложных

фотобиологических

процессов, когда

конечному эффекту

предшествуют частично

обратимые фотохимические

процессы и темновые

стадии, уравнение (4.6)

может не соблюдаться, и

неясно, как определить

$\sigma$  для построения

спектра действия. Обычно

в этом случае по

ординате откладывают

величину **эффективности**

света  $\mathcal{E}$ , обратную дозе  $D_c$ , вызывающей определенный фотобиологический эффект, одинаковый для всех длин волн:

$$\mathcal{E} = 1/D_c.$$

На рис. 4.4 по оси ординат отложена именно такая величина -  $1/MЭД$ , МЭД - минимальная эритемная доза, т.е. доза облучения, вызывающая минимальную обнаруживаемую эритему. Подобную величину используют при построении спектров действия загара человека, фототропизма и фототаксиса растений, чувствительности глаза и т.д.

При изучении спектров действия в сложных биологических системах может происходить усложнение сравнительно простой ситуации, изложенной выше, за счет эффектов экранировки. Суть экранирующего эффекта заключается в том, что часть падающего на объект света поглощается в верхних слоях этого объекта, и в глубине интенсивность действующего света оказывается ниже по сравнению с интенсивностью падающего света, измеряемой экспериментатором.

Примером могут служить фотобиологические процессы, протекающие в коже человека и животных. До хромофоров в клетках доходит свет,

ослабленный поверхностными слоями кожи (например, роговым слоем), т.е. имеет место оптическое экранирование, которое будет искажать регистрируемый спектр действия эритемы (рис. 4.4).

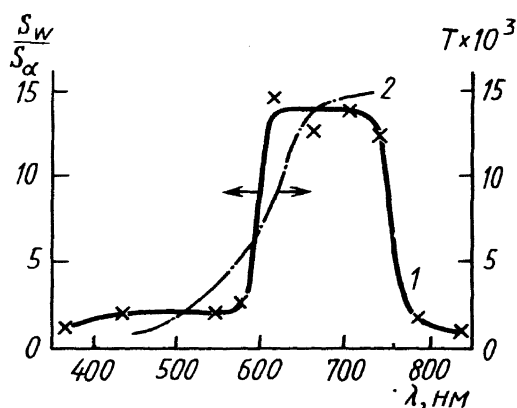


Рис. 4.5. Спектр действия фотопериодической стимуляции полового созревания утят:

$S_w / S_\alpha$  — отношение размеров семенников в конце и начале опыта (1); спектр пропускания (2) тканей головы утят со стороны глазных орбиталей до гипоталамуса (фоторецептора)

экранировка проявляется особенно сильно, так как прежде чем дойти до гипоталамуса, свет должен пройти через ткани головы. Максимум спектра находится в области наилучшего пропускания - в красном свете. Определение спектра действия в данном фотобиологическом процессе позволило дать практические рекомендации по режиму освещения.

### 4.3. Изменение свойств молекул в электронно-возбужденном состоянии

Свойства молекул в возбужденном и основном состояниях отличаются по многим параметрам.

I. У органических молекул с системой сопряженных двойных связей при возбуждении изменяется пространственная структура. В невозбужденном состоянии вращение двух частей молекулы вокруг двойной связи невозможно и такие молекулы имеют

плоскую конфигурацию. Наименьшую энергию молекула имеет при перекрывании  $\pi$ -орбиталей, поэтому  $\pi$ -орбитали называют **связывающими**. Возбужденные состояния в первый момент после поглощения фотона сохраняют плоскую конфигурацию основного состояния (**принцип Франка-Кондона**). Но возбужденные  $\pi$ -орбитали являются разрыхляющими: наименьшую энергию имеет конформация, в которой  $\pi$ -связь разрывается и две части молекулы поворачиваются вокруг  $\sigma$ -связи на  $90^\circ$ . Этот процесс имеет большое значение при фотохимических превращениях зрительного пигмента родопсина (см. гл. 8).

2. Происходит изменение дипольного момента молекул (см. разд. 2.6).

3. Изменение кислотно-основных свойств молекул при возбуждении изучают, используя различные методы титрования. Обычно диссоциированная и недиссоциированная формы молекул обладают различными спектрами поглощения и люминесценции. Измеряя спектры поглощения или люминесценции при различных рН, можно, таким образом, определять кривые диссоциации молекул. Так как поглощает свет молекула в основном состоянии, спектрофотометрически определяют кривую диссоциации невозбужденных молекул.

Высвечивание кванта люминесценции происходит из возбужденного (синглетного или триплетного) состояния, поэтому люминесцентным методом регистрируют кривую диссоциации молекул в возбужденном состоянии. Оказывается, что эти кривые диссоциации отличаются друг от друга (рис. 4.6). Для триптофана в области рН 9-10, т.е. там,

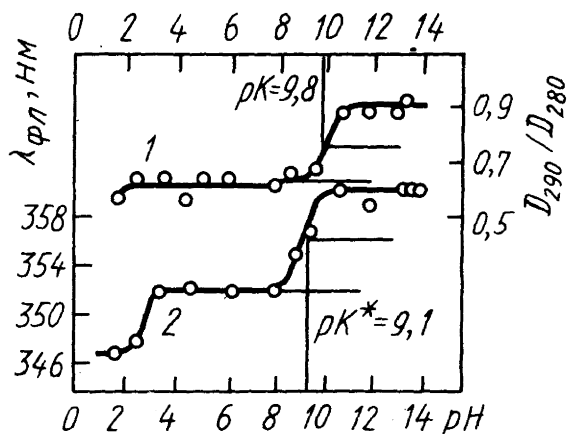


Рис. 4.6. Кривые диссоциации триптофана в основном (1) и синглетном возбужденном (2) состояниях

где диссоциируют аминокислоты, отчетливо видна разница в величинах  $pK$  основного и нижнего синглетного возбужденных состояний. А именно  $pK$ , измеренное по поглощению, равно 9,8, тогда как  $pK^*_{S_1}$ , измеренное по флуоресценции, равно 9,1. Это означает, что аминокислота триптофана в возбужденном состоянии обладает менее выраженными щелочными свойствами, чем в основном.

Как следует из формулы триптофана,

диссоциирующая  $NH_3$ -группа отделена от системы  $\pi$ -электронов, ответственных за поглощение и люминесценцию, двумя одинарными связями. Тем не менее возбуждение триптофана приводит к смещению электронной плотности к индольному кольцу и уменьшению энергии

связывания протона с аминогруппой. Естественно, что более заметные изменения  $pK$  в возбужденном состоянии наблюдаются для групп, непосредственно связанных с ароматическими кольцами. Например, для  $\beta$ -нафтиламина  $pK = 4,1$ ;  $pK^*_{S_1} = -2,0$ . Значения  $pK^*_{T_1}$  триплетного состояния значительно ближе к  $pK$  основного, чем  $pK^*_{S_1}$  возбужденного синглетного состояния. Для  $\beta$ -нафтиламина  $pK^*_{T_1} = 3,3$ . Эти результаты подчеркивают большие различия химической реакционной способности синглетных и триплетных состояний.

4. К фотохимическим превращениям молекулы, поглотившей фотон, приводят резкие изменения ее донорно-акцепторных свойств. В возбужденной молекуле высвобождается электронная вакансия на верхней заполненной орбитали, в результате чего молекула становится акцептором электрона, способным вступать в реакции фотовосстановления с подходящими донорами. Примером такой реакции может служить открытая А.А. Красновским (1948) реакция фотовосстановления хлорофилла. Это открытие имело фундаментальное значение в познании процесса фотосинтеза. Наряду с этим в возбужденной молекуле появляется электрон на сравнительно высоко расположенной нижней свободной орбитали. В результате этого молекула становится донором электрона и легко вступает в реакции фотоокисления. Так, ароматические аминокислоты способны отдавать электрон просто молекулам среды, т.е. при поглощении ими кванта в растворе происходит фотоионизация.

#### 4.4 Комплексы с переносом заряда

Надмолекулярные соединения, которые образуются при переносе электрона от молекулы, служащей донором  $D$  электронов, к молекуле-акцептору  $A$  электронов, называют **комплексами с переносом заряда** (КПЗ).

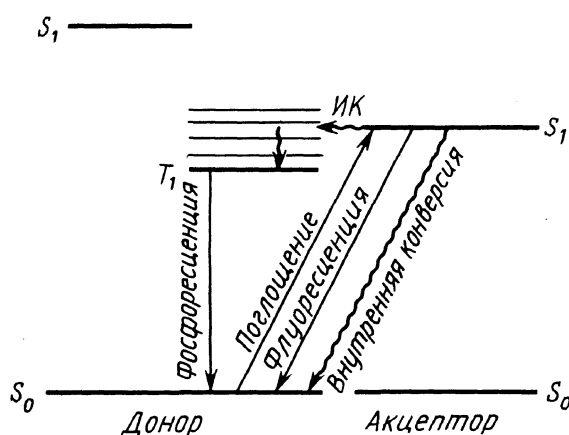
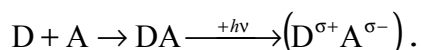


Рис. 4.7. Схема электронных переходов с переносом заряда

Причем эти две молекулы удерживаются вместе за счет электростатического притяжения и более слабых взаимодействий, таких, как ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи и т.д. Как правило, перенос заряда в невозбужденном состоянии комплекса незначителен. Однако при поглощении фотонов таким

донорно-акцепторным комплексом происходит электронный переход из  $S_0$  состояния донора в  $S_1$  состояние акцептора (рис. 4.7), что соответствует частичному или полному переносу электрона от  $D$  к  $A$ :



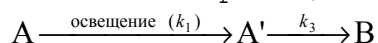


Электронному переходу с переносом заряда принадлежит новая широкая и бесструктурная полоса поглощения, отсутствующая у отдельных компонентов. Образовавшийся при возбуждении комплекс растрчивает свою энергию в нескольких процессах. Возможны: обратный излучательный переход с переносом заряда из  $S_1$  акцептора в  $S_1$  донора (флуоресценция КПЗ), внутренняя конверсия в КПЗ, а также фотохимическое необратимое изменение молекул, входивших в КПЗ. Если триплетный уровень донора имеет меньшую энергию, чем возбужденный синглетный уровень акцептора, то может произойти интеркомбинационная конверсия с последующим излучением фосфоресценции донора (рис. 4.7). Считают, что КПЗ легко образуются между кислородом и различными полимерами (такому КПЗ приписывают полосу поглощения полиэтилена, простирающуюся вплоть до 400 нм), а также кислородом и многими ароматическими соединениями, например бензолом. Электронный переход с переносом заряда с определенной вероятностью заканчивается окислением органических молекул. Типичными акцепторами в КПЗ являются хиноны, полинитроароматические соединения и т.д., типичные доноры – ароматические углеводороды, диеновые структуры и т.д. Предполагается, что фотохимические реакции некоторых сенсibilизаторов протекают с участием КПЗ. Например, М. Кроу и Т.Г. Траскотт (1983) показали, что триплетные возбужденные состояния 8-метоксипсоралена (8-МОП) тушатся 3,4-диоксифенилаланином (ДОФА) по механизму переноса заряда. В результате образуются свободные радикалы 8-МОП и ДОФА. В отсутствие кислорода этот процесс обратим, в присутствии  $O_2$  он завершается окислением ДОФА. Предполагают, что генерация синглетного кислорода (см. гл. 6) триплетными состояниями фотосенсibilизаторов происходит через стадию образования комплекса с переносом заряда. Эти комплексы участвуют в передаче энергии от молекулы сенсibilизаторов на молекулу кислорода.

Донорно-акцепторные комплексы с переносом заряда между возбужденной и невозбужденной молекулами разных веществ называют **эксиплексами**. Образование эксиплексов может проявляться в том, что в спектрах флуоресценции ароматических соединений в присутствии глушителей, доноров или акцепторов электрона появляется новая полоса, смещенная в длинноволновую сторону.

#### 4.5. Методы изучения первичных фотопродуктов

Первичные продукты фотохимических реакций (молекулы в электронно-возбужденных состояниях и свободные радикалы) крайне неустойчивы и быстро переходят либо в исходные вещества, либо в более устойчивые фотопродукты (новые молекулы). Поэтому концентрация первичных фотопродуктов в обычных условиях облучения в жидких растворах бывает настолько низка, что их не удается исследовать обычными физико-химическими методами. Упрощенно фотохимическая реакция может быть представлена схемой



где  $A'$  – первичный лабильный фотопродукт;  $B$  – стабильный фотопродукт;  $k_1$ ,  $k_2$  и  $k_3$  – константы скоростей соответствующих

мономолекулярных реакций. Для таких спечем накопление продукта  $A'$  во времени описывают кинетическим дифференциальным уравнением

$$\frac{d[A']}{dt} = k_1[A] - (k_2 + k_3)[A'].$$

В Стационарных условиях облучения скорость изменения концентрации  $A'$  мала,  $d[A']/dt \approx 0$  откуда

$$\frac{[A']}{[A]} = \frac{k_1}{k_2 + k_3}.$$

В разбавленных растворах скорость световой реакции образования  $A'$  может быть выведена из уравнений (4.5) и (4.6):

$$\left(\frac{d[A']}{dt}\right)_{\text{обр}} = k_1[A] = JQ_s[A] = J\sigma[A],$$

откуда

$$\frac{[A']}{[A]} = \frac{J\sigma}{k_2 + k_3}. \quad (4.9)$$

Из (4.9) очевидно, что увеличить относительную концентрацию неустойчивого фотопродукта  $A'$  можно либо увеличением интенсивности действующего света  $J$ , либо замедлением скорости темновых процессов (снизить  $k_2$  и  $k_3$ ).

Первый способ реализуется в методе **импульсного фотолиза**, разработанном Р.Г.В. Норишем и Г.Б. Портером (1949). Метод основан на освещении образца очень яркой фотолизирующей вспышкой, при которой в возбужденное состояние переходит одновременно значительная доля молекул исследуемого вещества. Как следствие этого сразу после вспышки лабильные фотопродукты образуются в достаточно высоких концентрациях, позволяющих проводить их спектральное определение. Уже через несколько микро- или миллисекунд эти фото продукты вновь исчезают. Обнаружение и идентификация лабильных продуктов основана на измерении спектров

их поглощения (переходных спектров) и определении времени жизни продуктов по кинетике выцветания их переходных спектров поглощения.

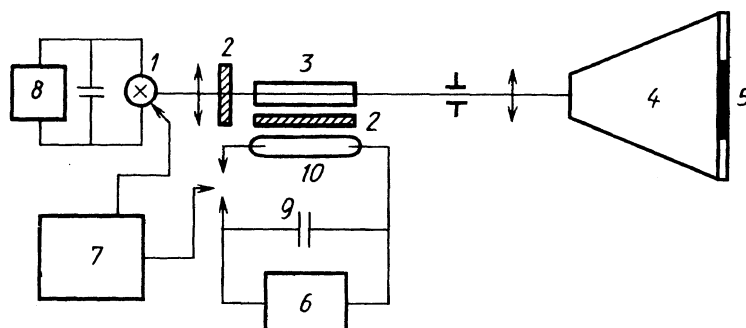


Рис. 4.8. Спектрографическая установка импульсного фотолиза:

1—спектроскопическая лампа; 2—светофильтры; 3—кювета; 4—спектрограф; 5—фотопластинка; 6—зарядное устройство; 7—блок временной задержки; 8—питание импульсной спектроскопической лампы; 9—конденсатор; 10—импульсная лампа.

В настоящее время используют в основном два типа установок импульсного фотолиза – кинетическую (см. рис. 2.23) и спектрографическую (рис. 4.8).

Кинетическая установка

позволяет получить непосредственно кинетическую кривую гибели промежуточного продукта на одной длине волны регистрации. При помощи спектрографической установки регистрируется весь спектр промежуточных продуктов через определенный промежуток времени после фотолитической вспышки. Разрешающее время обычных установок импульсного фотолиза, в которых применяют импульсные лампы,  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  с. С развитием лазерной техники путем использования импульсных лазеров удалось уменьшить это время до  $10^{-12}$  с.

Метод импульсного фотолиза позволяет непосредственно следить за кинетикой гибели триплетных молекул в растворе при обычных температурах. Так как триплет-триплетные переходы не запрещены (нет ограничений по спину), то поглощение при этих переходах характеризуется такими же высокими значениями молярных коэффициентов поглощения, как и при синглет-синглетных переходах. Производят определение коэффициентов поглощения, квантовых выходов интеркомбинационной конверсии и констант скоростей тушения триплетных состояний исследуемого вещества различными тушителями. При исследовании тушения измеряют время жизни триплетов в отсутствие и присутствии тушителей, расчет констант проводят по уравнению Штерна-Фольмера (2.32). Определяют также свободные радикалы и время их жизни в различных условиях.

В некоторых случаях помимо импульсного фотолиза применяют **метод импульсного радиолиза**. Оба метода основаны на принципе импульсного возбуждения: в первом случае образец облучается вспышкой света, во втором – импульсом ионизирующей радиации. Регистрирующие системы в этих двух методах идентичны. При использовании ионизирующей радиации поглощение не зависит от химической структуры исследуемого вещества и приводит к генерации быстрых электронов в среде как целом. В разбавленных растворах почти всё излучение поглощается растворителем. Несмотря на то что на первичной стадии механизм возбуждения сильно различается в фотолизе и радиолизе, непосредственно вслед за возбуждением образуются сходные продукты, т.е. свободные радикалы и синглетные и триплетные возбужденные состояния. Особенность радиолиза заключается в том, что в некоторых случаях триплетные состояния образуются, минуя синглетное возбужденное состояние. Поэтому радиолиз удобен для

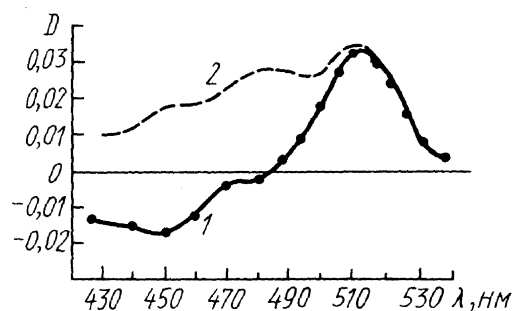


Рис. 4.9. Переходные спектры поглощения  $\beta$ -каротина при импульсном радиолизе в гексане:

1—измеренный спектр; 2—спектр, исправленный с учетом уменьшения поглощения основным состоянием  $\beta$ -каротина.

изучения триплетных состояний веществ, имеющих низкую или равную нулю константу скорости интеркомбинационной конверсии, без использования триплетных фотосенсибилизаторов. Например, в эту категорию веществ попадают каротиноиды, переходные спектры поглощения которых, полученные импульсным радиолизом, приведены на рис. 4.9.

Альтернативным импульсному радиолизу при изучении нестойких промежуточных продуктов фотохимических реакций можно считать метод стабилизации этих продуктов за счет понижения температуры, (замораживания образцов жидким азотом). Глубокое охлаждение не влияет заметно на первичный фотохимический акт и, как правило, образование свободных радикалов, но сказывается на величинах констант скоростей дезактивации возбужденной молекулы и приводит к резкому торможению темновых превращений первичных фотопродуктов, т.е.  $k_2$  и  $k_3$  в уравнении (4.9) резко уменьшаются. Поэтому в охлажденных и замороженных образцах первичные продукты удается накопить в количествах, достаточных для исследования спектрофотометрическими или радиоспектроскопическими методами. Так, при 77 К спектры триплет-триплетного поглощения часто удается измерять непосредственно в процессе облучения обычными (не импульсными) источниками возбуждающего света. Свободные радикалы, замороженные в ледяной матрице, могут долго храниться после выключения возбуждающего света, что позволяет изучать их методами спектрального анализа или ЭПР и др.

Чувствительность метода ЭПР сравнительно велика. В водных растворах при положительных температурах удается обнаруживать  $10^{-8}$  моль·л<sup>-1</sup> свободных радикалов. Однако при обычных условиях фотобиологического эксперимента стационарные концентрации бывают ниже  $10^{-8}$  моль·л<sup>-1</sup>. Поэтому спектры ЭПР регистрируют, как правило, при облучении замороженных растворов (4.9). Интересная особенность низкотемпературной фотохимии заключается в том, что концентрация триплетных возбужденных состояний  $T_1$  повышается настолько, что они успевают поглотить второй фотон света и перейти в более высокое триплетное состояние  $T_2$  (см. рис. 1.1). Из высоких триплетных состояний легко осуществляется фотоионизация ароматических аминокислот, фурукумаринов и др. В жидких растворах при использовании обычных источников света такие двухфотонные процессы невозможны из-за малого времени жизни триплетных состояний и, как следствие, их низкой концентрации. Необходимость изучать свободные радикалы в жидких растворах привела к разработке комбинированных приборов импульсного фотолиза или радиолиза и ЭПР-спектрометров. Спектры ЭПР строят на основании кинетических измерений сигналов ЭПР при нескольких фиксированных значениях напряженности магнитного поля  $H$ . В пионерских работах по импульсному ЭПР удавалось измерять свободные радикалы через ~1 мкс после вспышки света или импульса ионизирующего излучения.

Идентификацию фотопродуктов с их переходными спектрами в импульсном фотолизе и радиолизе часто проводят с помощью ингибиторов. Известно, что молекулярный кислород с диффузионной константой тушит триплетные возбужденные состояния органических молекул. Таким же свойством обладают парамагнитные ионы ( $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  и др.), тогда как непарамагнитные ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  и др.) тушат триплетные состояния гораздо хуже. Эффективным тушителем триплетов является  $\beta$ -каротин.

Были предложены разного рода ловушки первичных свободно-радикальных продуктов. Угнетающее действие ловушек на накопление конечных продуктов фотохимической реакции может служить указанием на то, что свободные радикалы действительно участвуют в процессе. Так, цистеин, цистин,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  имеют высокое сродство к электрону и поэтому эффективно ингибируют реакции с участием сольватированных электронов, захватывая последние. *t*-Бутанол и другие спирты перехватывают  $\text{OH}$ -радикалы.

Ингибиторный анализ бывает полезен при изучении механизма патологических процессов в таких сложных системах, как кожа и другие органы и ткани, в которых прямое обнаружение первичных фотопродуктов физико-химическими методами крайне затруднено. Например, антиоксиданты ионол, витамин Е и другие имеют низкий потенциал ионизации, легко отдают электрон свободным радикалам, тем самым ингибируя свободнорадикальные реакции (см. разд. 7.2 и 7.4).

Новая возможность исследования свободных радикалов при физиологических условиях появилась благодаря разработке **метода спиновых ловушек**. Эти соединения реагируют с короткоживущими свободными радикалами, образуя стабильные (долгоживущие) свободные радикалы (спиновые аддукты), спектры ЭПР которых измеряют в жидких растворах. Примером ловушки может служить *S*-фенил-*N*-третбутилнитрон (ФБН):

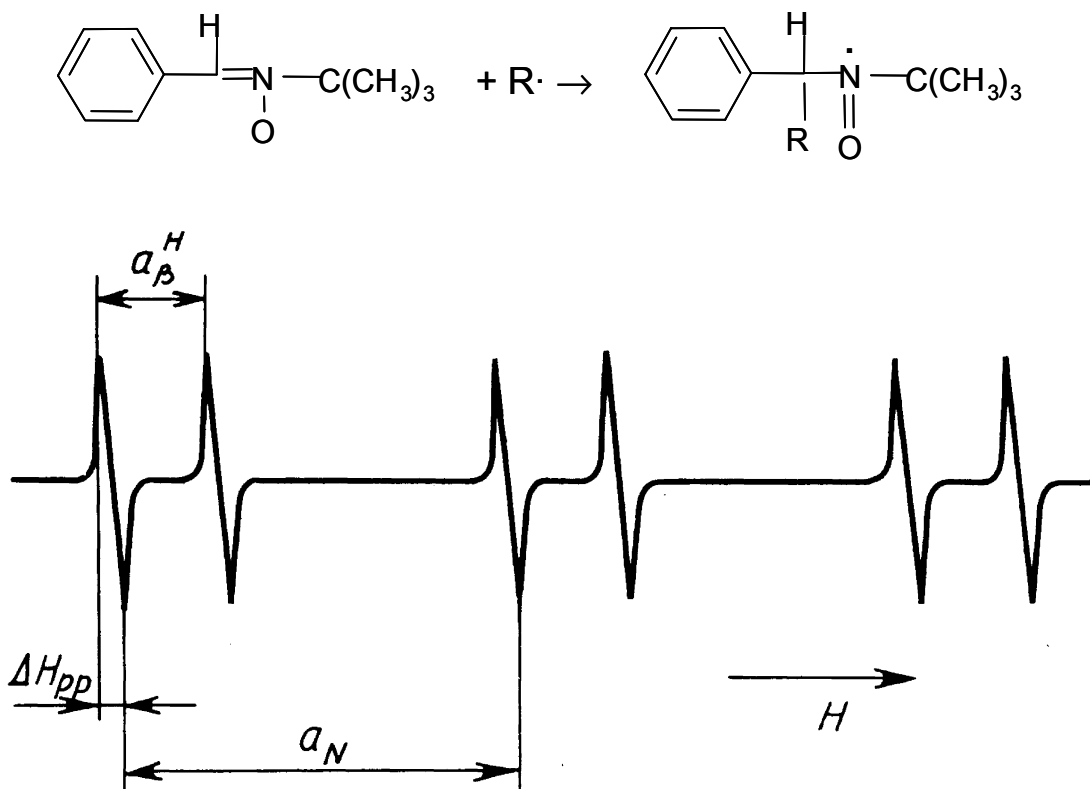


Рис. 4.10. Спектр ЭПР спинового аддукта *S*-фенил-*N*-трет-бутилнитрона

Стабильность нитроксильного радикала ФБН объясняется тем, что атом кислорода, на котором локализован неспаренный электрон, пространственно экранирован тремя метильными группами. Форма

спектров ЭПР спиновых аддуктов ФБН зависит от природы присоединившегося к ФБН свободного радикала (рис. 4.10, табл. 4.1). Таким образом удается проводить исследование свободнорадикальных реакций в биологических объектах методом ЭПР при физиологических температурах.

**Таблица 4.1. Параметры спектров ЭПР спиновых аддуктов ФБН**

Присоединяемый к ФБН радикал	$\alpha_N \cdot 10^4$ , Тл	$\alpha_\beta^H \cdot 10^4$ , Тл	$\Delta H_{pp} \cdot 10^4$ , Тл
$\cdot\text{OH}$	15,5	2,9	0,5
$\text{HO}\cdot$	14,9	2,9	0,3
$\cdot\text{CH}_2\text{OH}$	16,0	3,8	1,1
$\text{CH}_3-\overset{\cdot}{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$	16,0	3,4	1,0
$\text{C}_2\text{H}_5-\overset{\cdot}{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$	16,2	3,6	0,7
$\text{CH}_2\text{OH}-\overset{\cdot}{\text{C}}\text{OH}-\text{CH}_2\text{OH}$	15,9	3,5	1,0