

1 Взаимодействие света с веществом

1.1 Введение

Квантовая биофизика изучает взаимодействие света с живой материей: биологически важными молекулами, клеточными структурами, тканями и органами, а в конечном счете – с организмом в целом. Изучением действия света на живые организмы с позиций различных биологических наук занимаются, как известно, фотобиологи.

По существу, квантовая биофизика – это раздел фотобиологии, в котором изучаются физические и физико-химические стадии фотобиологических процессов.

Хорошо известно, что действие света на живые организмы весьма разнообразно (рис. 1.1). Фотосинтез, фототропизм, фотопериодизм и фототаксиса зрительное восприятие, покраснение кожи при УФ-облучении, образование витамина D, бактерицидное и мутагенное действие УФ-облучения, фотодинамические эффекты: все эти процессы вызываются действием света и изучаются в разных разделах фотобиологии. Изучение начальных стадий фотобиологических процессов, которые заканчиваются образованием первых устойчивых химических соединений, можно считать областью биофизики. Дальнейшие процессы происходят по биохимическим и физиологическим законам.

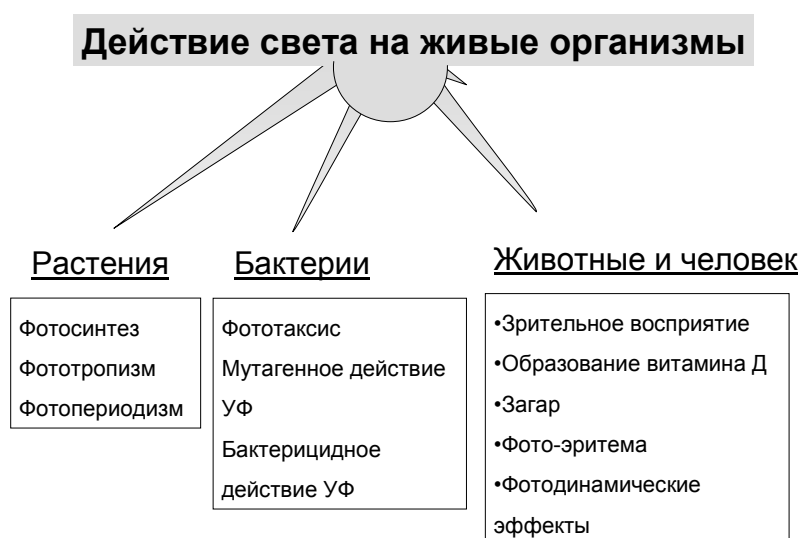


Рис. 1.1. Действие света на живые организмы

Важно, что явления, протекающие на первых, биофизических стадиях: поглощение света; перераспределение энергии в молекуле, находящейся в электронном возбужденном состоянии; межмолекулярный перенос энергии, образование первичных фотопродуктов (обычно свободнорадикальной природы) и превращение их в первые химически устойчивые соединения, – оказываются общими для всех фотобиологических процессов. Именно это позволяет рассматривать первичные стадии фотобиологических процессов с единой точки зрения.

По этой же причине сходны в общих чертах и основные методы исследования разных фотобиологических процессов, коль скоро речь идет об их начальных, биофизических стадиях (рис. 1.2). Спектрофотометрия и люминесцентный анализ; импульсное облучение объектов в сочетании с быстродействующими методами регистрации оптических изменений в этих объектах; использование низких температур для изучения нестабильных промежуточных продуктов, применение вакуумной техники; регистрация свечения, сопровождающего

рекомбинацию первичных, свободнорадикальных продуктов; использование метода электронного парамагнитного резонанса для идентификации этих продуктов – весь этот арсенал средств в равной мере применяется при исследовании первичных стадий как процессов фотосинтеза, так и действия ультрафиолета на белки и нуклеиновые кислоты, а также начальных этапов зрительного процесса.

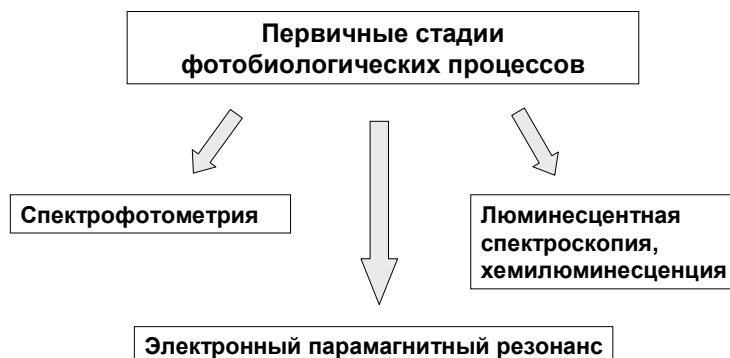


Рис. 1.2. Методы изучения первичных стадий фотобиологических процессов

Таким образом, если фотобиология в целом может рассматриваться как сложный мультидисциплинарный комплекс, то учение о биофизических стадиях фотобиологических процессов является стройной и единой в своей основе научной дисциплиной.

Взаимодействие света и живой материи начинается с акта поглощения фотонов и перехода молекул в возбужденное состояние. Этот процесс регистрируется спектрофотометрически, и поэтому основы биологической спектрофотометрии входят в первый раздел настоящего курса. Размен энергии возбуждения включает высвечивание квантов люминесценции. Изучение люминесценции представляет теоретический интерес и является важным этапом фотобиологического исследования. Во многих случаях может происходить перенос энергии электронного возбуждения на соседние молекулы, интерес к этому явлению, одно время несколько ослабевший, вновь вспыхнул в связи с использованием метода переноса энергии для оценки расстояния между молекулами в биологических системах.

При изучении собственно фотохимических процессов исследователь, прежде всего, сталкивается с необходимостью изучения кинетики и спектров действия фотобиологического явления, затем на повестку дня встает изучение первичных, чаще всего свободнорадикальных стадий фотохимических реакций. Это изучение стало возможным благодаря развитию техники низких температур и быстродействующих методов спектрофотометрии, а также метода электронного парамагнитного резонанса. Заканчивается фотохимическая реакция образованием устойчивых продуктов, что приводит к конечному эффекту – фотобиологическому действию света. Особое место занимает явление хемилюминесценции. Это явление интенсивно изучается и широко используется в аналитических целях. Оно представляет собой не стадию фотобиологического процесса, а как бы фотобиологический процесс «наоборот», поскольку химические реакции не вызываются поглощением, а сопровождаются испусканием кванта света.

Оптическое излучения широко и успешно используется в медицине (рис. 1.3)



Рис. 1.3. Области применения оптического излучения в медицине

1.2 Свойства фотона

Световое излучение – это поток фотонов. Фотон – это частица, обладающая нулевой массой покоя и скоростью света c . Первое из этих свойств означает только то, что фотон в покое не существует. Но «в полете» он обладает массой, которая проявляется в притяжении фотонов другими телами и в искривлении светового луча около тяжелых планет. Эту массу можно найти из уравнения Эйнштейна, если мы знаем энергию фотона E :

$$E = mc^2 \quad (1.1)$$

Одновременно фотон – это электромагнитная волна, обладающая частотой колебаний ν и длиной волны λ . Соотношение между этими величинами описывается уравнением:

$$\nu\lambda = c \quad (1.2)$$

Энергия фотона связана с частотой электромагнитной волны уравнением Планка:

$$E = h\nu \quad (1.3)$$

из которого следует, что энергия фотона обратно пропорциональна длине его волны

$$E = hc / \lambda \quad (1.4)$$

Коэффициент h называется постоянной Планка и равен $6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж·с.

Из уравнений (1.1) и (1.4) следует, что $mc^2 = hc / \lambda$, откуда находим импульс фотона $p = mc$:

$$p = mc = h / \lambda \quad (1.5)$$

Полезно помнить, что *энергия фотона* используется при его поглощении молекулами для осуществления фотохимических реакций, таких как, например, превращение родопсина в сетчатке глаза, которое лежит в основе зрения. *Импульс фотона* проявляется в способности светового потока оказывать давление на отражающую поверхность; на этом основана идея фотонной ракеты.

В таблице 1.1 даны соотношения между длинами волн и энергиями фотонов для видимого и ультрафиолетового излучения.

Таблица 1.1

Длины волн и энергия оптического излучения

Интервал длин волн, нм	Цвет	Энергия середины интервала, эВ
380–490	Фиолетовый	3,03
	Синий	2,68
490–510	Сине-зеленый	2,48

	(голубой)	
510–550	Зеленый	2,34
550–590	Желтый	2,17
590–630	Оранжевый	2,03
630–760	Красный	1,78

1.3 Свойства электрона

В конечном счете, все вещества состоят из атомов, атомы же состоят из электронов и ядер. Взаимодействие видимого или ультрафиолетового света и молекул – это по сути дела взаимодействие фотонов с электронами. Электроны располагаются на определенных *орбиталях* в атомах и молекулах по следующим причинам:

1. Они не разлетаются из-за *электростатического притяжения* электронов (несущих отрицательный заряд) и ядер (заряженных положительно).
2. Они не падают на ядра из-за центробежной силы, обусловленной их *вращением* вокруг ядер.
3. Они находятся на вполне определенных орбиталях из-за своих *волновых свойств*.

Рассмотрим волновые свойства электронов. В 1924 г. Луи де Бройль предположил, что электрон, как и любая другая частица, в частности, фотон, обладает свойствами волны, а лучше сказать, является одновременно *волной и частицей*. Главное же в идее де Бройля заключается в том, что *импульс электрона* (а импульс есть мера инерции тела) – это *импульс волны*, (инерция которой связана с явлением электромагнитной индукции).

Из этих соображений выводится уравнение де Бройля, связывающее длину волны электрона со скоростью его движения. Чтобы вывести это уравнение, нужно приравнять импульс электрона как частицы и его импульс как волны. Импульс электрона как частицы есть произведение массы электрона на скорость его движения.

$$p = mv \quad (1.6)$$

Импульс электрона как электромагнитной волны находим по тому же уравнению (1.5), что и импульс фотона. В силу идентичности этих двух импульсов при сравнении (1.5) и (1.6) получаем *уравнение де Бройля*:

$$\lambda = h / mv \quad (1.7)$$

Уравнение показывает, что тяжелые и быстрые частицы имеют короткую длину волны, а легкие и медленные – большую длину волны. Неподвижная частица имеет бесконечно большую длину волны.

1.3.1 Интерференция электронной волны в атоме

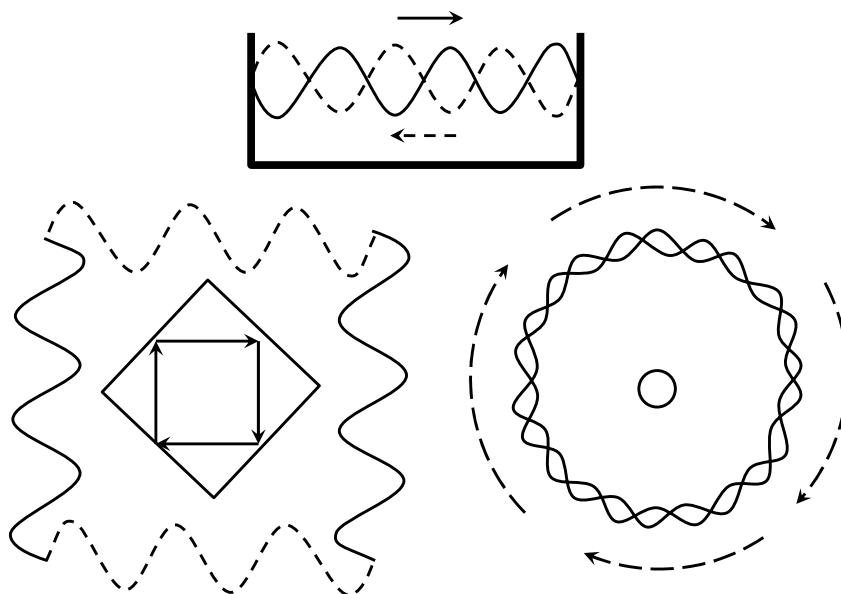


Рис. 1.4. Электронные ящики

Поскольку электроны локализованы около ядер в атомах и молекулах, то очевидно, что волна, которая соответствует каждому из них, будет интерферировать сама с собой. Простейший случай подобного рода интерференции – это интерференция волн при отражении волны от упругой стенки. Как известно, при интерференции двух волн образуется новая волна, амплитуда которой увеличивается, если интерферирующие волны находятся в одной фазе и уменьшается, если они находятся в противофазе (рис. 1.4). Рассмотрим результат интерференции волн отражающихся от стенок гипотетического ящика. Если мы имеем дело с незатухающим колебанием (а в случае элементарных частиц нет причин для затухания колебаний), волна будет отражаться многократно от обеих стенок ящика. В общем случае система будет нестабильной, поскольку при каждом отражении отраженная волна интерферирует с прямой, давая новую, суммарную волну, амплитуда и форма которой зависят от того, в какой фазе колебания волна подошла к стенке. Если, однако, подобрать размеры ящика (или длину волны колебаний) таким образом, что в ящик укладывается целое число полувольт, система приходит в устойчивое (стационарное) состояние, при котором образуется так называемая *стоячая волна* (рис. 1.4).

Стоячая волна не перемещается: ее узлы и пучности остаются все время на одном и том же месте, но каждая частица совершает колебательные движения, амплитуда которых равна нулю в узлах и максимальна в пучностях. В механических (в том числе акустических) моделях стоячих волн размеры ящика заданы, а стационарное состояние достигается изменением длины волны вследствие самопроизвольного изменения скорости при заданной частоте или, наоборот, изменения частоты при заданной скорости распространения волн. Электроны в атомах и молекулах могут одновременно изменять скорость вращения и размеры орбитали, устойчивыми оказываются опять таки те значения этих величин, при которых образуются стоячие волны. Это означает, что только электроны могут долго (бесконечно долго) находиться только на орбиталях определенных размеров, при которых образуются стоячие волны размером в целое число полувольт (рис. 1.5).

Не в каждом ящике может образоваться стоячая волна

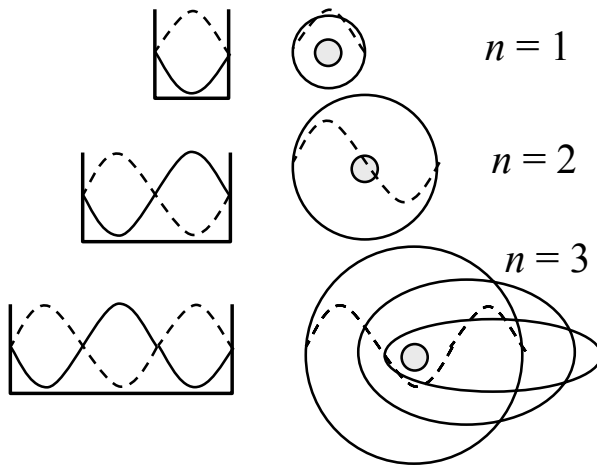


Рис. 1.5.
Образование стоячей
волны в ящиках разного
размера (n - главное
квантовое число)

1.3.2 Уравнение Шредингера

Уравнение Шредингера количественно описывает свойства стоячих электронных волн в потенциальном ящике, в том числе в атомах (рис. 1.6).

$$-\frac{\hbar^2}{2m}\Delta\Psi + U\Psi = i\hbar\frac{d\Psi}{dt} \quad \text{Уравнение Шредингера}$$

$$\Delta\Psi = \frac{\partial^2\Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\Psi}{\partial z^2} \quad \text{Оператор Лапласа}$$

$$\Delta\Psi + \frac{2m}{\hbar^2}(E - U)\Psi = 0 \quad \text{Уравнение Шредингера для стационарных состояний. } \Psi \text{ не зависит от времени}$$

$$\Psi = \psi e^{-i(E/\hbar)t} \quad \begin{array}{l} E - \text{полная энергия частицы} \\ U - \text{потенциальная энергия частицы} \end{array}$$

Рис. 1.6. Уравнение Шредингера

По внешнему виду и по сути уравнение Шредингера для электронных волн похоже на известное из механики уравнение гармонической волны:

$$\frac{\partial^2 w}{\partial t^2} = u^2 \Delta w \quad (1.8)$$

которое рассматривает случай распространения колебательного движения в трехмерном пространстве. В этом уравнении w – возмущение, u – фазовая скорость распространения волны, а Δ – оператор Лапласа, который представляет собой сумму частных вторых производных функции (в данном случае смещения) по трем координатам:

$$\Delta\Psi = \frac{\partial^2\Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2\Psi}{\partial z^2} \quad (1.9)$$

Физический смысл уравнения (1.8) становится особенно понятным для случая колебаний в одном определенном направлении x .

$$-\frac{\partial^2 w}{\partial t^2} + u^2 \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} = 0 \quad (1.10)$$

Первое слагаемое описывает зависимость возмущения от времени, а второе – от координаты. Во второе слагаемое, естественно, входит скорость распространения волны u .

Уравнение Шредингера в общем случае выглядит таким образом:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi + U \Psi = i\hbar \frac{d\Psi}{dt} \quad (1.11)$$

где $\hbar = 2\pi\hbar$, m – масса частицы (в нашем случае – электрона), а Ψ – волновая функция (пси-функция), аналогичная возмущению w в механических колебаниях и описывающая, образно говоря, «электромагнитное возмущение эфира». Как и в случае механических волн, волновая функция изменяется во времени и в пространстве.

Следует подчеркнуть, что уравнение Шредингера, почти очевидное по своему физическому смыслу, тем не менее не было им выведено, а было *постулировано*. Но следствия из него получили многочисленные количественные подтверждения, и поэтому оно может считаться верным.

При интерференции и образовании стоячих волн волновая функция не меняется во времени (*стационарное состояние*), а меняется только в пространстве. (Обозначим волновую функцию для стационарного случая через ψ). При этом правая часть уравнения заменяется постоянной величиной, которая представляет собой, как можно показать, произведение *полной энергии* системы (обозначим ее как E) на волновую функцию ψ , а величина U обретает физический смысл *потенциальной энергии* электрона. В результате уравнение (1.11) приобретает вид:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \psi + U \psi = E \psi \quad (1.12)$$

Это уравнение Шредингера для стационарного состояния чаще всего называют просто уравнением Шредингера. Мы будем его использовать в несколько иной форме, используя постоянную Планка $\hbar = 2\pi\hbar$.

$$\nabla^2 \psi + \frac{8\pi^2 m}{h^2} (E - U) \psi = 0 \quad (1.13)$$

1.3.3 Уровни энергии электрона в потенциальном ящике

Решение дифференциальных уравнений второй степени вообще задача не из легких, и уравнение Шредингера удастся решать только для самых простых систем, вроде атома водорода. И все равно это довольно сложная процедура. В итоге можно найти несколько интересных величин, из которых главные – две. Во-первых, это распределение электронной плотности вокруг ядра, которое рассчитывается как нормированный квадрат амплитуды волновой функции в каждой точке пространства. Во-вторых, – это энергия электрона в атоме. Расчет этих величин для атома водорода мы здесь рассматривать не будем, отсылая заинтересованного читателя к учебникам по квантовой химии. Полезным, однако, представляется расчет распределения электронной плотности и величины энергии электрона в простом модельном случае, так называемом *потенциальном ящике*. Этот воображаемый ящик должен обладать четырьмя свойствами:

- 1) Электронная волна распространяется в нем только вдоль оси x .
- 2) Энергия электрона ни на что не растрчивается при его отражении от стенок.
- 3) Электрическое поле отсутствует, поэтому потенциальная энергия электрона $U = 0$.
- 4) Система рассматривается в установившемся режиме, т. е. значения волновой функции могут меняться вдоль оси x , но не меняются во времени.

Последнее предположение позволяет использовать уравнение Шредингера для стационарного состояния. В сущности, оно молчаливо подразумевает, что в ящике образуются стоячие волны. Но непосредственно мы такого допущения не делаем. Ниже мы увидим, что сделав это допущение, мы можем упростить некоторые расчеты.

С учетом сказанного уравнение (1.13) приобретает вид

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} + \frac{8\pi^2m}{h^2} E\psi = 0 \quad (1.14)$$

Произведем подстановку в это уравнение:

$$\omega^2 = \frac{8\pi^2m}{h^2} E \quad (1.15)$$

Получаем

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} + \omega^2\psi = 0 \quad (1.16)$$

Это уравнение аналогично дифференциальному уравнению гармонических колебаний. Его решение имеет вид:

$$\psi = \psi_0 \cos(\omega x + \varphi_0) \quad (1.17)$$

где ψ_0 – амплитуда волновой функции, а φ_0 – ее начальная фаза.

Чтобы найти эти две постоянные величины рассмотрим значения уравнения (1.17) на границах ящика, т.е. при $x = 0$ и $x = l$, где l – длина ящика.

Предполагается, что в этих точках значение волновой функции равно нулю. В сущности, именно такая ситуация типична для стоячих волн, узлы которых находятся у стенок. Итак, $\psi = 0$ при $x = 0$ и $x = l$. Уравнение (1.17) в этих точках выглядит так:

$$0 = \psi_0 \cos(0 + \varphi_0) = \psi_0 \cos \varphi_0 \quad (1.18)$$

$$0 = \psi_0 \cos(\omega l + \varphi_0) \quad (1.19)$$

Решение этих уравнений дает нам

$\cos \varphi_0 = 0$, откуда

$$\varphi_0 = \frac{\pi}{2} \quad (1.20)$$

и $\psi_0 \cos(\omega l + \frac{\pi}{2}) = 0$, откуда

$$\omega l + \frac{\pi}{2} = (2n + 1) \frac{\pi}{2} \quad (1.21)$$

После небольших преобразований получаем

$$\omega = n \frac{\pi}{l} \quad (1.22)$$

Здесь n – целое число, которое может принимать значения 1, 2, 3 и т.д.

Вернемся теперь к уравнению (1.15). Подставив в него величину из уравнения (1.22), получаем

$$n^2 \frac{\pi^2}{l^2} = \frac{8\pi^2 m}{h^2} E \quad (1.23)$$

откуда находим выражение для энергии системы

$$E = \frac{h^2}{8ml^2} n^2 \quad (1.24)$$

$-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 \Psi + U \Psi = i\hbar \frac{d\Psi}{dt}$	Уравнение Шредингера
$\nabla^2 \psi = \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2}$	Оператор Лапласа
$\nabla^2 \psi + \frac{2m}{\hbar^2} (E - U) \psi = 0$	Уравнение Шредингера для стационарных состояний
ψ не зависит от времени (стационарное состояние)	
$\Psi = \psi e^{-i(E/\hbar)t}$	
E – полная энергия частицы	
U – потенциальная энергия частицы	

Рис. 1.6. Уравнение Шредингера

Видно, что величина энергии электрона в потенциальном ящике может иметь строго дискретные значения, пропорциональные квадрату целых чисел, т. е. 1, 4, 9, 16 и т.д. Число n в квантовой механике и теории атомов называется *главным квантовым числом*.

Найдем теперь величину волновой функции в каждой точке. Подставим величины φ_0 и ω из уравнений (1.20) и (1.22) в уравнение (1.17), получаем:

$$\psi = \psi_0 \cos\left(n \frac{\pi x}{l} + \frac{\pi}{2}\right) \quad (1.25)$$

или

$$\psi = \psi_0 \cos \pi \left(n \frac{x}{l} + \frac{1}{2} \right) \quad (1.26)$$

Квадрат модуля волновой функции говорит о вероятности нахождения электрона в данной точке (точнее в единице объема в районе данной точки). Найдем эту величину

$$|\psi|^2 = \psi_0^2 \cos^2 \pi \left(n \frac{x}{l} + \frac{1}{2} \right) \quad (1.27)$$

Форма кривых распределения электронной плотности в потенциальном ящике для разных n приведена на рис. 1.7.

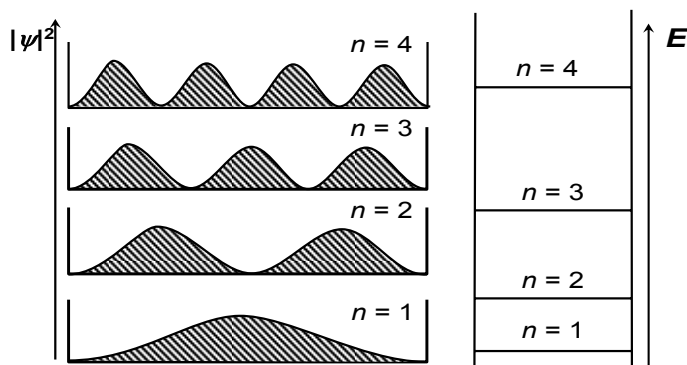


Рис. 1.7. Распределение электронной плотности и энергия электрона в потенциальном ящике

Расчет распределения электронной плотности и энергии электронов на орбиталях даже самого простого атома, атома водорода сложнее приведенного выше, но был осуществлен. Его результаты вошли во все учебники химии и физики. В трехмерном пространстве стоячие волны электрона формируются в трех измерениях и характеризуются, по этой причине не одним, а тремя квантовыми числами.

1.3.4 Электронные орбитали и электронные переходы

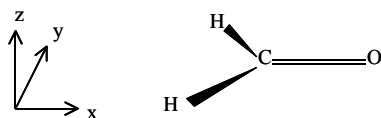
Мы ограничимся здесь беглым рассмотрением результатов расчета распределения электронной плотности в молекуле формальдегида, которая интересна тем, что содержит атомы водорода, углерода и кислорода, т.е. трех самых распространенных атомов в органических соединениях.

Прежде чем рассматривать поглощение света группами, входящими в состав белков и нуклеиновых кислот, рассмотрим свойства более простых молекул. В общем случае для ответа на этот вопрос необходимо решить стационарное уравнение Шредингера для системы из нескольких атомов частиц. Точное решение обычно получить не удастся, но при помощи приближенных методов удалось сделать некоторые полезные выводы. Главное упрощение состоит в том, что не рассматриваются электроны, которые находятся вблизи какого-либо одного ядра, поскольку их орбитали мало отличаются от орбиталей в случае изолированного атома и не принимают участия в образовании химических связей и в электронных переходах при поглощении видимого и ультрафиолетового излучения в оптическом диапазоне, т.е. между 180 и 800 нм. Рассматриваются только те электроны, которые делокализованы по орбиталям, окружают одновременно два или несколько ядер и образуют, таким образом, химические связи. Именно эти электроны участвуют в поглощении света.

Результаты приближенных квантово-механических расчетов, рассмотрим на примере молекулы формальдегида.

1.3.5 Молекулярные орбитали в молекуле формальдегида

Формальдегид HCOH имеет следующую структурную формулу:



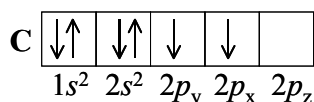
Четыре атома, входящие в состав молекулы формальдегида, содержат в общей сложности 16 электронов.

Рассмотрим вначале распределение электронов по орбиталям в атомах водорода углерода и кислорода, из которых состоит молекула формальдегида.

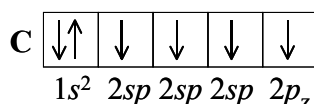
В атоме водорода единственный электрон занимает $1s$ орбиталь



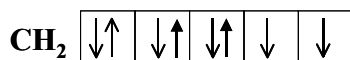
В атоме углерода из 6 электронов 4 должны занимать $1s$ и $2s$ орбитали, а еще два – орбитали $2p_y$ и $2p_x$.



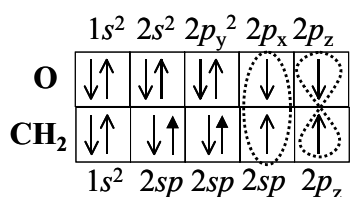
Однако в результате электростатического отталкивания электронных облаков угол между $2p_y$, $2p_x$ и $2p_z$ орбиталями увеличивается с 90° до 120° , происходит *гибридизация* орбиталей $2s^2$, $2p_y$, $2p_x$ с образованием тетраэдрической конфигурации из трех $2sp$ орбиталей и орбитали $2p_z$, направленных из центра тетраэдра к его вершинам.



Объединение $1s$ орбиталей водорода и $2sp$ орбиталей углерода образует группу CH_2 .



Схематическое изображение образования химических связей между группой CH_2 и атомом кислорода, которое приводит к образованию молекулы формальдегида, приведено ниже. В верхней части схемы показано размещение электронов на орбиталях атома кислорода. В нижней части повторена электронная структура группы CH_2 . Пунктиром обведены пары электронов, образующие химические связи между углеродом и кислородом. Пунктирный овал – σ -связь, пунктирная «восьмерка» – π -связь.



Первая из этих связей, σ -связь, образуется объединением орбиталей углерода и кислорода, причем образующееся электронное облако обладает осевой симметрией и не имеет узлов, т.е. участков с нулевой электронной плотностью (рис. 1.8).

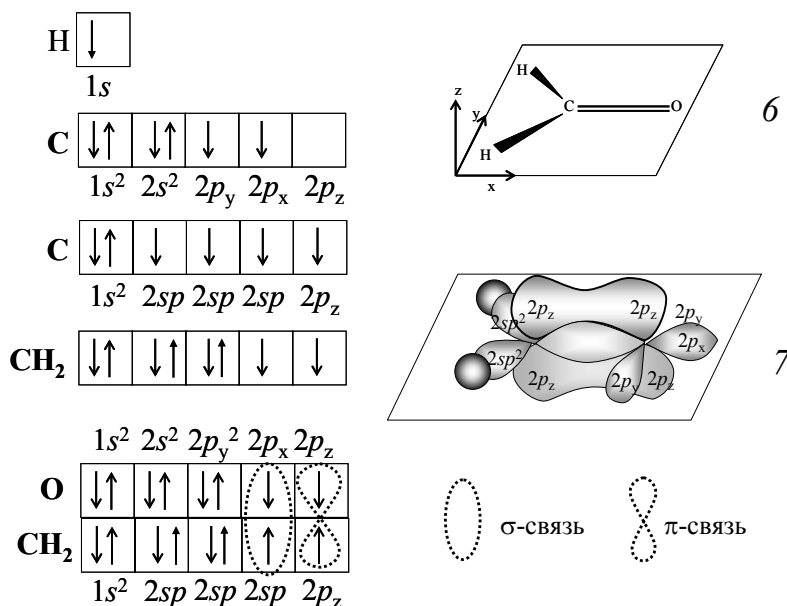


Рис. 1.8. Образование молекулы формальдегида

Расчеты энергии молекулярных орбиталей (проведенные например методом МО ЛКАО – «Молекулярные Орбитали есть Линейная Комбинация Атомных Орбиталей», см. следующий раздел), показывают, что наивысшими заполненными молекулярными орбиталями оказываются *связывающая* π -орбиталь и *несвязывающая* $2p_y$ орбиталь кислорода. Последняя получила название *n*-орбитали (от слова *nonbonding*, несвязывающая) (рис. 1.9).

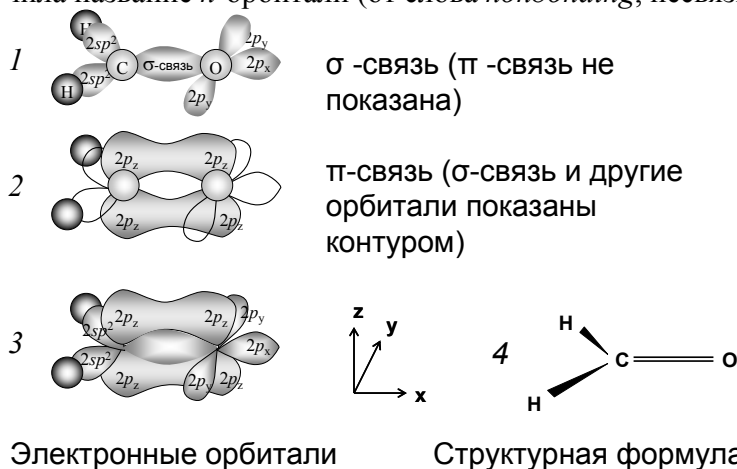


Рис. 1.9. Образование σ - и π -связей в молекуле формальдегида

1.3.6 Электронные переходы в молекулах, метод ЛКАО–МО

В молекулах органических веществ в электронных переходах могут участвовать электроны трех типов:

- s -электроны (для возбуждения таких переходов требуется относительно большая энергия, эти переходы формируют оптические спектры в далекой УФ области);
- n -электроны, не участвующие в образовании связей;
- p -электроны, участвующие в образовании двойных и тройных связей.

Математическое описание образующихся связей дает нам решение уравнения Шредингера. Вследствие сложности задачи, точное этого уравнения можно получить лишь для атома водорода и ионов, изоэлектронных водороду (He^+ , Li^{2+} , Be^{3+}). Поэтому вводят некоторые допущения, самым простым из которых является возможность образования молекулярных орбиталей из атомных (метод МО–ЛКАО). Кратко идею этого подхода можно

выразить следующим образом. Электроны, образующие химическую связь, находятся в молекуле на молекулярных орбиталях (как в атоме – на атомных). По аналогии с атомными орбиталями их называют σ -, π -, δ -... орбиталями. Принцип Паули и правило Хунда полагаются справедливыми и для молекул. Предполагается, что молекулярные орбитали являются линейной комбинацией атомных орбиталей:

$$\psi = \psi_A + \psi_B$$

связывающая орбиталь

$$\psi^* = \psi_A - \psi_B$$

разрыхляющая орбиталь

Таким образом, две атомные орбитали при взаимодействии образуют две молекулярные орбитали – *связывающую* и *разрыхляющую*.

Для простейшей частицы H_2^+ контурные диаграммы электронной плотности связывающей (слева) и разрыхляющей (справа) орбиталей в этом случае будут иметь вид, показанный на рис. 1.10.

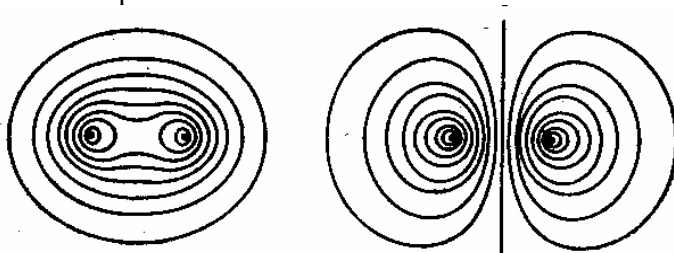


Рис. 1.10. Контурные диаграммы электронной плотности для связывающей (слева) и разрыхляющей (справа) орбиталей частицы H_2^+ .

Контуром электронной плотности называется линия, соединяющая точки с одинаковой электронной плотностью

Образование связывающих орбиталей является энергетически выгодным, поскольку энергия при этом уменьшается (относительно свободных атомов). Образование разрыхляющей орбитали связано с повышением энергии. Самой низкой по энергии является связывающая σ -орбиталь, далее следует связывающая π -орбиталь. Самой высокой по энергии является разрыхляющая σ -орбиталь (рис. 1.11).

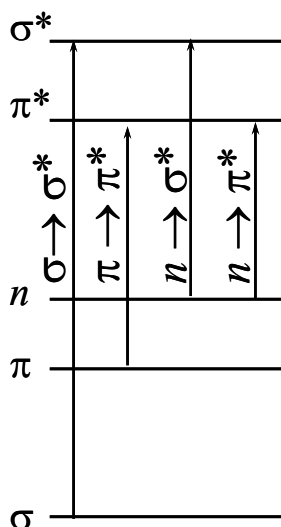


Рис. 1.11. Уровни энергии молекулы (горизонтальные линии) и электронные переходы при поглощении энергии (вертикальные стрелки).

Для рассмотренной выше молекулы формальдегида схема энергетических уровней n , π и π^* орбиталей дана ниже (рис. 1.14).

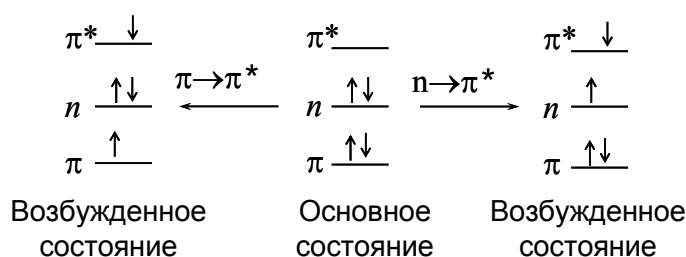


Рис. 1.12. Электронные уровни и переходы в молекуле формальдегида

В молекулах могут происходить разные электронные переходы (см. рис. 1.11). Хотя $n \rightarrow \sigma^*$ и $\sigma \rightarrow \sigma^*$ переходы в принципе реализуются, они требуют большой энергии и наблюдаются в далекой УФ области, поэтому в нашем случае значения не имеют. Наибольшее значение имеют $n \rightarrow \pi^*$ и $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы (рис. 1.12), поскольку их энергия соответствует видимой или ближней ультрафиолетовой области, а вероятность $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов достаточно велика и поэтому соответствующие полосы поглощения обладают достаточной интенсивностью.

1.4 Спектры поглощения некоторых биологически важных соединений

Из спектров поглощения некоторые биологически важных соединений (см. рис. 1.13) видно, что чем больше в молекуле число сопряженных двойных связей, тем больше длина волны максимума поглощения данного вещества. В этом случае реализуются $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы, причем сопряжение двойных связей вызывает сдвиг энергии перехода в длинноволновую область.

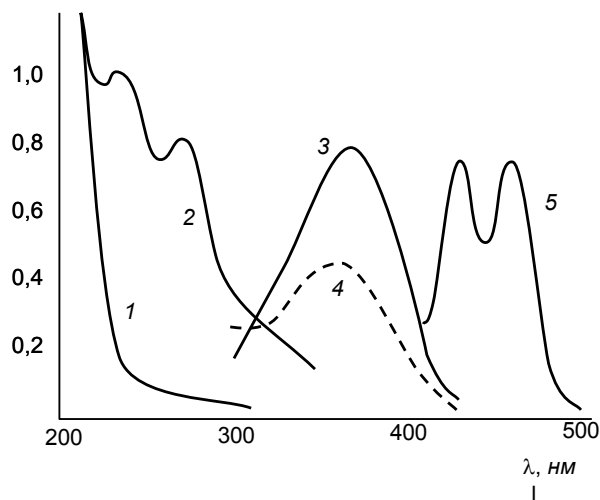


Рис. 1.13. Зависимость положения длинноволнового максимума поглощения от числа сопряженных двойных связей (N) в молекуле: 1 — фосфолипиды, выделенные из мозга ($N=1$); 2 — окисленные фосфолипиды: диеновые конъюгаты $\lambda_{\max} = 233$ нм ($N=2$), триеновые конъюгаты $\lambda_{\max} = 270\text{--}280$ нм ($N=3$) и, частично, карбонильные соединения; 3 — полностью транс-ретиаль $\lambda_{\max} = 360$ нм ($N=6$); 5 — каротиноиды ($N=11$).

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. Ретиаль, молекулы которого содержат 6 сопряженных двойных связей, характеризуется максимумом поглощения 360 нм.

Для того, чтобы проиллюстрировать это явление, сравним для начала диаграмму молекулярных орбиталей этилена, содержащего одну двойную связь ($\lambda_{\text{max}} = 180 \text{ нм}$) и бутадиена, содержащего две (сопряженные) двойные связи ($\lambda_{\text{max}} = 217 \text{ нм}$). Формулы этих соединений даны на рис. 1.14.

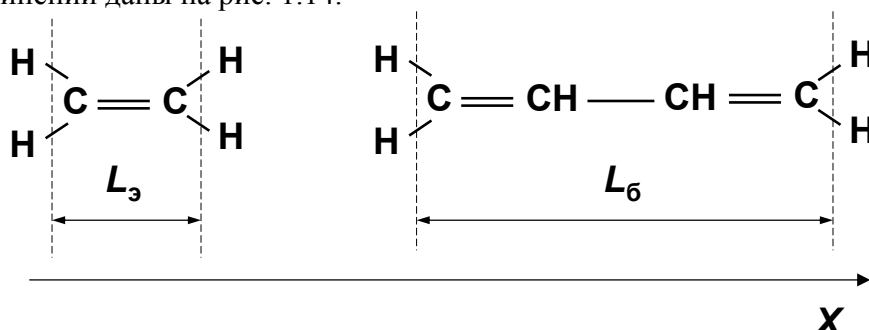


Рис. 1.14. Размер электронных ящиков и структурные формулы этилена и бутадиена-1,3

На рис. 1.17 приведены результаты квантово-механических расчетов энергетических уровней молекул этих веществ.

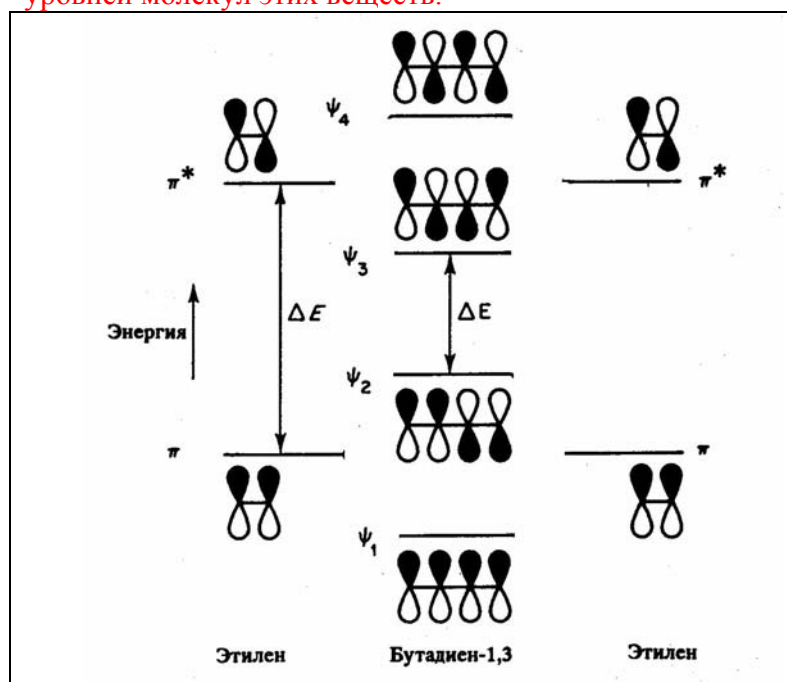


Рис. 1.17. Схема образования молекулярных орбиталей этилена и бутадиена-1,3

Видно, что ΔE между π -орбиталями этилена больше (а длина волны, следовательно, меньше), чем соответствующая величина, полученная при сопряжении двойных связей в бутадиене-1,3.

Рассмотрим систему сопряженных двойных связей как электронный «ящик». Рассуждая максимально упрощенно, представим, что длины соответствующих ящиков равны длинам цепей молекул, в которых каждое звено имеет длину удвоенного ковалентного радиуса атома углерода. Длина бутадиенового ящика (L_6) приблизительно равна удвоенной длине этиленового ящика (L_3), соответственно, длина волны электрона, помещающаяся в таком ящике будет больше.

Приведем более строгие рассуждения. В сопряженной системе связей) π -электроны делокализованы, т. е. могут двигаться по цепочке сопряженных связей свободно, подобно электронам проводимости в металле. Предположим, сопряженная цепь состоит из N звеньев,

включающих по одной двойной и одной одинарной связи. Тогда общая длина цепи равна $L = Nl$, где l – длина одного звена. Можно считать, что π -электроны внутри системы сопряженных связей находятся в прямоугольной потенциальной яме с высокими стенками (рис. 1.18), их средняя скорость перемещения равна v . Согласно соотношению де Бройля в квантовой механике движущемуся электрону соответствует волна, длина которой равна

$$\lambda = h / mv \quad (1.28)$$

где h – постоянная Планка, m – масса электрона.

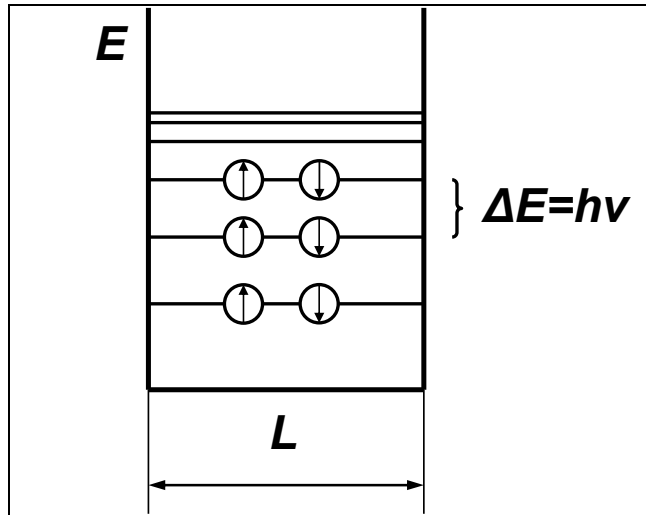


Рис. 1.18. Энергетические уровни p -электронов в потенциальной яме

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 полувольт

$$L = n\lambda / 2 \quad (1.29)$$

где $n = 1, 2, 3, \dots$ и т. д. Подставив λ из (1.29) в уравнение (1.28), находим возможные значения скорости электрона

$$v = h / m\lambda = nh / 2mL \quad (1.30)$$

его кинетическая энергия равна

$$E = mv^2 / 2 = n^2 h^2 / 8mL^2 \quad (1.31)$$

Таким образом, энергия π -электронов в молекуле квантована и при величинах $n = 1, 2, 3$ и т.д. будет иметь значения $h^2/8mL^2$, $4h^2/8mL^2$, $9h^2/8mL^2$, ..., 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 молекулы, которая соответствует переходу электрона с верхней заполненной молекулярной орбитали на нижнюю свободную

$$h\nu = (E_{N+1} - E_N) \quad (1.32)$$

откуда

$$\nu = \frac{1}{h} \left\{ \frac{(N+1)^2 h^2}{8mL^2} - \frac{N^2 h^2}{8mL^2} \right\} \quad (1.33)$$

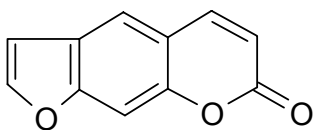
Подставив $L = Nl$, находим

$$\nu = \frac{2N+1}{N^2} \frac{h}{8ml^2} \quad (1.34)$$

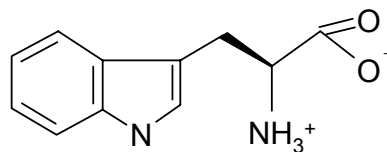
При $N \geq 2$ первый сомножитель в (1.34) можно принять $\approx 2/N$, тогда $\nu \approx \frac{h}{4ml^2} \frac{1}{N}$, т.е. длина волны поглощаемого света пропорциональна N :

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \approx \frac{4ml^2 c}{h} N \quad (1.35)$$

Вследствие большого числа допущений, сделанных при выводе уравнения (1.35), 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. 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

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). Переход n -электронов при поглощении фотона может происходить на возбужденный уровень π -электронов (π^* -орбиталь) ($n-\pi^*$ -переход). 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 Характеристики светового излучения

Световое излучение, как известно, характеризуется длиной волны λ (нм, мкм, м, табл. 1.3.1) электромагнитных колебаний, частотой $\nu = c / \lambda$ (Гц) и энергией квантов света (фотонов) E (Дж, эВ¹), причем

$$E = h\nu = hc / \lambda \quad (1.36)$$

где h – постоянная Планка, c – скорость света. В работах по спектроскопии часто используют так называемое волновое число $\tilde{\nu} = 1 / \lambda$ (см⁻¹), которое пропорционально частоте ν электромагнитных колебаний и, следовательно, энергии фотонов. В различных спектральных областях, как правило, для измерения длин волн используют кратные единицы (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Единицы измерения длин волн

Диапазон	Единицы измерения	
Рентгеновский	Ангстрем	$1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$
Видимый и УФ	Нанометр	$1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$
ИК, микроволновый	Микрометр	$1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м}$
Радиочастотный	Сантиметр, метр	$1 \text{ см} = 10^{-2} \text{ м}$

В фотохимических экспериментах, когда количество вещества выражают в молях, а концентрацию – 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

$$E_m = EN_A = N_A h\nu = N_A hc / \lambda \quad (1.37)$$

Из выражения (1.37) 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 выражать в Эйнштейнах, то численно эта величина равна числу молей фотонов.

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

$$\Phi = W / t \quad (1.38)$$

В русской литературе также используют термины *лучистый поток*, *мощность излучения*, в английской – *radiant flux*, *radiant power*.

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 света

¹ Электронвольт (эВ)— внесистемная единица измерения энергии, энергия, которую приобретает электрон при прохождении разности потенциала 1 В; 1 эВ = 1,60219·10⁻¹⁹ Дж.

$$I = \Phi / S_{\perp} \quad (1.39)$$

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

$$D = I \cdot t \quad (1.40)$$

1.6 Теория молекулярных спектров

Все современное учение о спектрах электромагнитного излучения базируется на квантовой теории, основные положения которой были сформулированы Нильсом Бором. Бор сформулировал два постулата. Их можно рассматривать как основные квантовые законы, которым подчиняются любые атомные системы.

Согласно первому постулату, атомная система является устойчивой лишь в определенных, *стационарных* состояниях, соответствующих определенной энергии системы. В соответствии с законом сохранения энергии, переходы системы из одного стационарного состояния в другое связаны с получением или отдачей энергии системой. Согласно второму постулату, электромагнитное излучение, связанное с переходом системы с уровня E_i на уровень E_j является монохроматическим и его частота определяется соотношением:

$$E_j - E_i = h\nu \quad (1.41)$$

где h постоянная Планка.

Электромагнитное излучение при этом поглощается (если $E_j > E_i$) или испускается (если $E_j < E_i$).

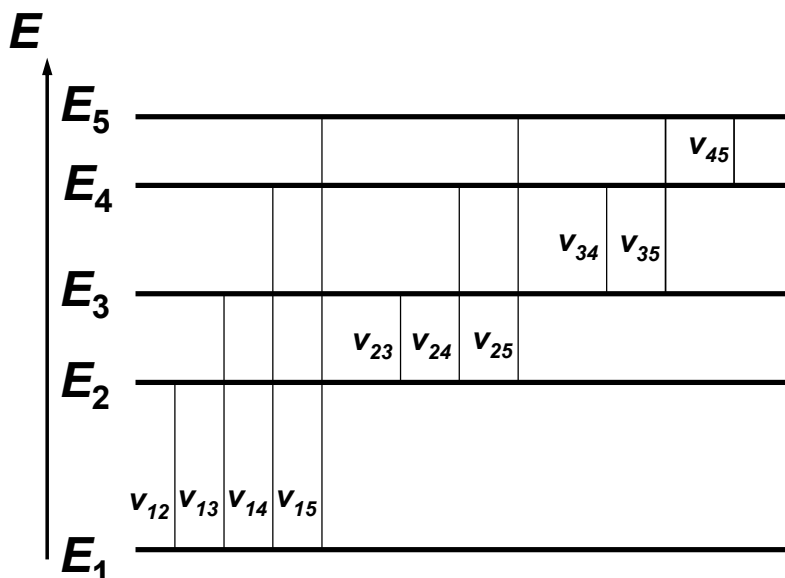


Рис. 1.19. Диаграмма уровней энергии

На рис. 1.19 изображена простейшая диаграмма *уровней энергии*. Горизонтальные линии обозначают стационарные состояния системы. Наиболее глубокий уровень, соответствующий минимальному значению энергии системы, называется *основным*, уровни с более высокой энергией называются *возбужденными*. Расстояния между уровнями пропорциональны разностям энергий соответствующих состояний. Слева дана шкала энергий, начало отсчета

является произвольным. Переходы между уровнями показаны вертикальными линиями. Каждому возможному переходу соответствует *спектральная линия*, характеризующаяся значением частоты или длины волны. Совокупность всех переходов (спектральных линий) составляет *спектр* вещества.

Число стационарных состояний в общем случае довольно велико. Однако, в реальности не все переходы могут происходить. Вероятность перехода определяется *правилами отбора*, и в спектрах проявляются в основном *разрешенные переходы*, т.е. переходы с большой вероятностью. *Запрещенные переходы* характеризуются малой вероятностью.

Для атомов и простейших молекул характерно небольшое число энергетических переходов и спектры, состоящие из небольшого числа линий – *линейчатые* спектры. Для более сложных молекул число спектральных линий велико, они сливаются, образуя отдельные полосы (*полосатые* спектры), в более сложных случаях полосы в спектре очень широкие (*сплошные* спектры). В чем причина превращения узких линий атомов и молекул в газовой фазе в широкие (размытые) спектры поглощения, характерные для растворов биомолекул? 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.

Теперь учтем направления энергетических переходов. Переход с нижнего уровня на верхний соответствует увеличению энергии системы, т.е. поглощению внешнего фотона. Совокупность таких переходов дает *спектр поглощения*. Переход с некоторого верхнего уровня на нижний соответствует уменьшению энергии системы, т.е. испусканию фотона. Совокупность таких переходов образует *спектр испускания*.

Кроме поглощения и излучения, существует явление *рассеяния света* в веществе. Рассеяние – это изменение направления, частоты и поляризации оптического излучения при взаимодействии с веществом. Различают рассеяние, при котором частота падающего излучения не меняется (*рэлеевское рассеяние*, зависящее от неравномерного распределения молекул в среде, и рассеяние света в мутной среде, например, в суспензии клеток или митохондриях – *эффект Тиндаля*) и рассеяние, при котором частота падающего излучения изменяется (*комбинационное рассеяние* или *эффект Рамана*).

Кроме частоты, каждая линия в спектре характеризуется *интенсивностью*, которая зависит от вероятности электронного перехода и от *заселенности уровней*. Спектр является индивидуальной характеристикой вещества. Положение линий в спектре является основой качественного анализа, по интенсивности линий можно проводить количественный анализ содержания вещества с той или иной степенью точности.

Рассмотрим подробнее различные типы уровней энергии атомов и молекул (при этом внутриядерная энергия нас интересовать в данном случае не будет). Уровни энергии, связанные с расстоянием электронных орбиталей от ядер, называют *электронными уровнями* энергии. Энергии переходов между уровнями для электронов внутренних оболочек лежат в диапазоне от десятков эВ до десятков кэВ (рентгеновский диапазон), переходы валентных (внешних) электронов соответствуют энергии оптического диапазона (единицы эВ).

Колебательные уровни молекул соответствуют энергии колебательных движений ядер и молекул около некоторых равновесных положений. Энергия зависит от частоты колебаний, которая в свою очередь определяется длиной и прочностью химических связей. Переход от колебания с одной частотой на колебания с другой сопровождается выделением или поглощением энергии, которую называют энергией *колебательных переходов*. Для органических молекул она лежит в пределах от 0,025 до 0,5 эВ, что соответствует поглощению квантов излучения в *инфракрасной области* спектра.

Вращательные уровни молекул связаны с вращательным движением молекулы как целого. Энергии таких переходов невелики – от сотых до сотых долей эВ. Такие переходы соответствуют далекой инфракрасной и микроволновой области (табл. 1.3). дискретность энергий колебательных и вращательных переходов определяется тем, что сами энергии колебательных и вращательных уровней квантуются, т.е. могут принимать лишь определенные значения, соответствующие условиям формирования стоячих волн движущимися заряженными частицами.

Таблица 1.3

Спектральные диапазоны

Частота, Гц	Длина волны, м	Диапазон	Энергия, Дж	Энергия, эВ
10^3	$3 \cdot 10^5$	Радио- и сверхвысоко-частотный (СВЧ)	$6,62 \cdot 10^{-31}$	$4,1 \cdot 10^{-12}$
10^{12}	$3 \cdot 10^{-4}$		$6,62 \cdot 10^{-22}$	$4,1 \cdot 10^{-3}$
$3,75 \cdot 10^{14}$	$8 \cdot 10^{-7}$	Инфракрасный (ИК)	$2,48 \cdot 10^{-19}$	1,55
$7,5 \cdot 10^{14}$	$4 \cdot 10^{-7}$	Видимый	$4,97 \cdot 10^{-19}$	3,1
$3 \cdot 10^{17}$	10^{-9}	Ультрафиолетовый (УФ)	$1,99 \cdot 10^{-16}$	$1,24 \cdot 10^3$
$3 \cdot 10^{20}$	10^{-12}	Рентгеновский	$1,99 \cdot 10^{-13}$	$1,24 \cdot 10^6$
10^{23}	$3 \cdot 10^{-15}$	Гамма-излучение	$6,62 \cdot 10^{-11}$	$4,13 \cdot 10^8$

Таким образом, общая энергия молекулы может быть представлена условно как сумма трех составляющих – электронной, колебательной и вращательной. Еще раз повторим, что электронная энергия имеет порядок нескольких эВ, колебательная – десятых и сотых долей эВ, вращательная – тысячных и десятитысячных долей эВ. Именно это различие приводит к тому, что электронные, колебательные и вращательные спектры сами по себе лежат в разных спектральных диапазонах.

Вместе с тем, при электронных переходах имеет место суммирование энергий чисто электронных переходов и энергий колебательных и вращательных. В результате такого суммирования (с положительным или отрицательным знаком) каждому электронному уровню соответствует целый набор близко расположенных к нему колебательных подуровней, а каждому колебательному подуровню – набор еще более тесно сгрудившихся вращательных подуровней. Поскольку число всех уровней подуровней весьма велико, то в молекулярных спектрах в газах наблюдается не одна или несколько, а множество отдельных линий. В растворах, как уже говорилось, энергии электронных переходов изменяется под влиянием электростатического воздействия молекул растворителя, энергия которого не квантуется, благодаря чему спектры в растворах всегда представлены сплошными полосами.

1.7 Электронные переходы в молекулах при поглощении и испускании фотонов

На рисунке 1.16 дана схема электронных уровней (с колебательными подуровнями) некой молекулы, способной поглощать видимое излучение (и называемой *хромофором*, т.е. несущая окраску).

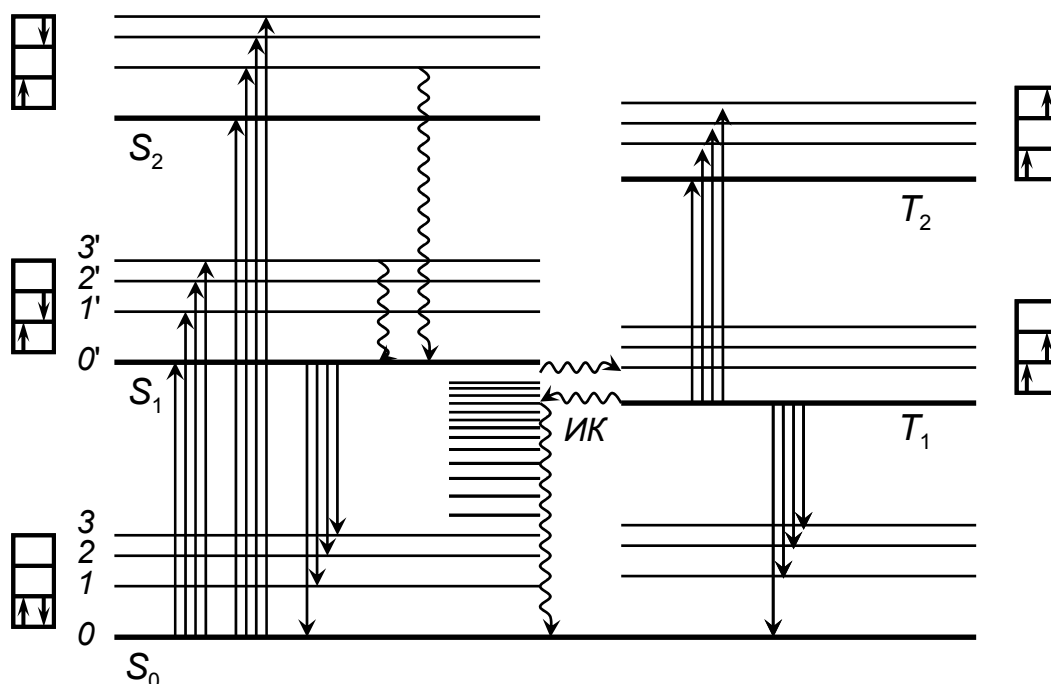


Рис.1.16. Схема электронных переходов в молекуле, около каждого уровня показано направление спина возбужденного электрона по отношению к спину оставшегося электрона. ВК — внутренняя конверсия, ИК — интеркомбинационная конверсия.

В основном состоянии все электроны занимают самые низшие электронные уровни и расположены на орбиталях попарно, при чем их спины имеют противоположное направление (*антипараллельны*). Такое состояние молекулы называют синглетным невозбужденным (основным) состоянием и обозначают как S_0 . Так же обозначают энергетический уровень невозбужденной молекулы. При поглощении света происходит переход одного из электронов на вышележащую орбиталь, но его спин не меняется. Такое состояние молекулы и ее энергетический уровень обозначают как S_1 или S_2 , в зависимости от того, на какой уровень перешел электрон. Это синглетное возбужденное состояние иногда обозначают как S^* . Через 10^{-8} – 10^{-9} с может произойти испускание основной части поглощенной энергии в виде кванта света с большей длиной волны (с меньшей энергией); такое излучение, обусловленное переходом $S_1 \rightarrow S_0$, называют *флуоресценцией*. При определенных условиях может произойти обращение спина электрона, находящегося на верхней орбитали возбужденной молекулы, при этом часть его энергии теряется. Состояние молекулы, содержащей два электрона с *параллельными* спинами, называется *триплетным состоянием*, а энергетический уровень электрона с обращенным спином называют *триплетным уровнем*. Как этот уровень, так и молекула в триплетном состоянии обозначается обычно символом T_1 . Прямой переход электрона с триплетного уровня T_1 на основной уровень S_0 невозможен, т.к. в этом случае на одной и той же орбитали оказались бы два электрона с параллельными спинами, что противоречит квантовомеханическому принципу Паули. Приходится довольно долго ждать, пока не сложится благоприятная конфигурация молекулы и окружения, чтобы электрон мог спуститься вниз с одновременным обращением спина. При таком нескором переходе тоже может высветиться фотон с меньшей энергией и, следовательно, большей длиной волны, чем в случае флуоресценции. Это замедленное и более длинноволновое излучение называется *фосфоресценцией*. Время жизни молекулы в триплетном возбужденном состоянии (от 10^{-4} с до нескольких секунд) много выше, чем в синглетном. Вместе флуоресценцию и фосфоресценцию называют *фотолюминесценцией* (или просто *люминесценцией*, если

очевидно, что электронно-возбужденные молекулы образовались под действием света, а не ионизирующей радиации или в результате химических реакций).

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 двумя или несколькими молекулами в системе имеется взаимодействие, то возможен безызлучательный перенос (или *миграция*) энергии электронного возбуждения от одной молекулы к другой. При этом, если безызлучательный переход не сопровождается изменением спина, его называют *внутренней конверсией*, тогда как переходы электрона с обращением спина называются *интеркомбинационной конверсией*. Все эти процессы перераспределения энергии электронного возбуждения, разыгрывающиеся после поглощения кванта, называют *фотофизическими процессами*. Обычно они предшествуют химическим изменениям возбужденных молекул, которые называют *фотохимическими реакциями*. Зная структуру энергетических уровней, нетрудно определить спектральные свойства молекулы, область ее поглощения, флуоресценции и фосфоресценции. И наоборот, на основании измерения спектров поглощения и люминесценции можно построить схему энергетических уровней данной молекулы (рис. 1.20). Подробнее теорию люминесценции мы рассмотрим далее в соответствующем разделе.

Измерение поглощения фотонов и люминесценции представляет интерес не только для фотохимии и фотобиологии, но и как метод изучения строения поглощающих свет молекул и определения их содержания и состояния в химических растворах и биологических системах. Заметим, что способностью поглощать свет в видимой и ультрафиолетовой области спектра обладают белки и нуклеиновые кислоты, большинство коферментов, цитохромы, гемоглобин и множество других биологически-важных соединений.

1.8 Количественные законы поглощения монохроматического света растворами

Пусть на кювету с раствором исследуемого вещества падает пучок монохроматического света с интенсивностью I_0 (рис. 1.21). Если в образце происходит поглощение света, то в результате интенсивность света уменьшится до величины I . Отношение этих величин называют пропусканием T .

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1.42)$$

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

$$1 - T = \frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{I_n}{I_0} \quad (1.43)$$

Где I_n – количество света, поглощаемого в единицу времени.

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 неудобны для количественного описания поглощения растворов, т.к. они не пропорциональны ни концентрации раствора, ни толщине кюветы.

Найдем зависимость T от концентрации и толщины раствора. Для этого выделим в объеме образца тонкий слой dl (рис. 1.17), перпендикулярный направлению I .

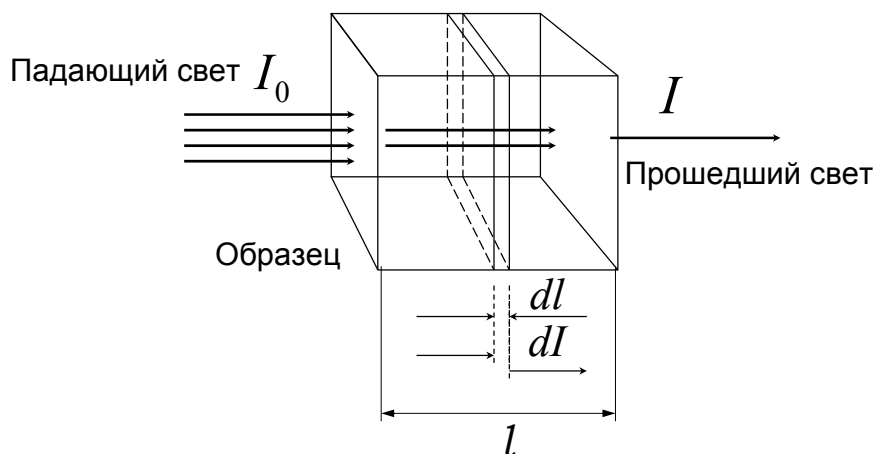


Рис. 1.17. К выводу закона Бугера–Ламберта–Бера

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 (рис. 1.18).

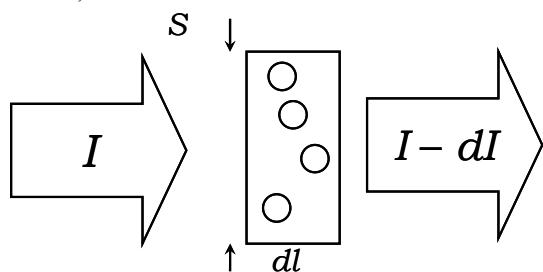


Рис. 1.18. Поглощение фотонов согласно теории мишеней

Суммарная площадь мишеней, приходящаяся на 1 см^2 раствора толщиной dl , будет равна $nsdl$.

Ослабление интенсивности света слоем dl равно

$$dI = I ns dl \quad (1.44)$$

Разделим переменные и произведем интегрирование:

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

Откуда можем найти пропускание раствора:

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-ns l} \quad (1.45)$$

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

$$A = -\lg T = \varepsilon l c \quad (1.46)$$

Где ε – молярный коэффициент поглощения ($\text{л}^1 \text{моль}^{-1} \text{см}^{-1}$), равный оптической плотности 1 М раствора, измеренной при $l = 1$ см.

Коэффициент молярного поглощения связан с ε соотношением:

$$T = e^{-\varepsilon l c} = 10^{-c \varepsilon l} \quad (1.47)$$

откуда

$$\varepsilon = \frac{N_A \lg e}{1000} \varepsilon = 2,62 \cdot 10^{20} \text{ с} \quad (1.48)$$

Уравнения (1.45) и (1.46) являются математическим выражением закона Бугера–Ламберта–Бера, основного закона поглощения света веществом, из которого следует, что T и $(1 - T)$ зависят от концентрации раствора (n или c) и длины оптического пути l экспоненциально. Впервые закон пропорциональности степени ослабления света толщине слоя и количеству вещества, через которое проходит свет, был сформулирован Бугером еще в 1729 году. В 1760 году Ламберт выразил зависимость интенсивности прошедшего света от толщины слоя математической формулой. Впоследствии, по ряду обстоятельств зависимость светопоглощения раствора от его концентрации получила название «закона Бера». В теперешнем названии этого закона присутствуют все три имени, хотя все принципы в основном были заложены Бугером.

В спектрофотометрии непосредственной величиной, измеряемой прибором, оказывается отношение интенсивности света I прошедшего через кювету с раствором, к интенсивности света I_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 (1.46). Это преобразование имеет смысл потому, что в отличие от непосредственно измеряемого пропускания T и коэффициента поглощения $(1 - T)$ оптическая плотность A есть величина аддитивная: оптическая плотность смеси двух растворов равна сумме оптических плотностей каждого из них, поскольку каждый вид частиц поглощает в растворе независимо от других (в отсутствие химических реакций):

$$A_{(1+2)} = A_1 + A_2 \quad (1.49)$$

Чтобы убедиться в справедливости уравнения (1.49), найдем величины пропускания T и оптической плотности A двух последовательно расположенных образцов (например, двух светофильтров), пропускание и оптическая плотность которых равны соответственно T_1 , T_2 , A_1 , и A_2 . Пусть интенсивность света, падающего на первый образец, I_0 , на второй I_1 , а света, выходящего из второго образца I_2 . Тогда пропускание последовательно расположенных первого, второго образцов и системы из двух образцов равно:

$$T_1 = \frac{I_1}{I_0}; \quad T_2 = \frac{I_2}{I_1}; \quad T_{(1+2)} = \frac{I_2}{I_0} \quad (1.50)$$

Из уравнений (1.50) следует, что $T_{(1+2)} = T_1 \cdot T_2$. На основании (1.46), оптические плотности рассматриваемых образцов равны

$$A_1 = -\lg T_1; \quad A_2 = -\lg T_2; \quad A_{(1+2)} = -\lg T_{(1+2)}; \quad (1.51)$$

Сложив A_1 и A_2 , получаем

$$A_1 + A_2 = -\lg(T_1 \cdot T_2) = A_{(1+2)} \quad (1.52)$$

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

$$A_{\text{общ}} = \sum_i A_i \quad (1.53)$$

Поскольку гомогенный раствор смеси нескольких веществ можно представить как чередование бесконечно тонких слоев растворов каждого из этих веществ в отдельности, уравнение (1.53) применимо не только к последовательно расположенным светофильтрам, но и к растворам смеси веществ: оптическая плотность смеси равна сумме оптических плотностей всех отдельно взятых компонентов (рис. 1.23).

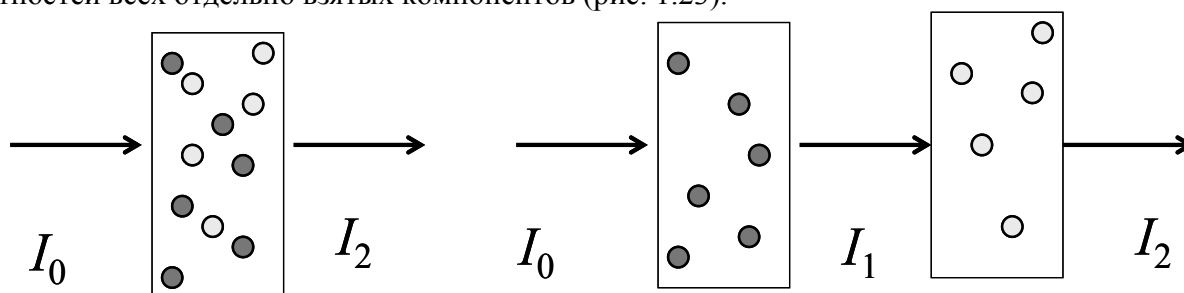


Рис. 1.19. Поглощение смеси растворов можно представить как сумму поглощений отдельных составляющих

На рис. 1.19 приведена схематично зависимость оптической плотности A , 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 A может быть представлена в виде

$$1 - T = 1 - 10^{-A} \quad (1.54)$$

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

$$1 - T \approx \ln 10 A \approx 0,4343 A \quad (1.55)$$

Формула (1.55) 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 A по уравнению (1.55) составляет 4,5 и 10%. При более высоких значениях коэффициента поглощения света и оптических плотностях линейность между A и $(1 - T)$ заметно нарушается (см. рис. 1.20).

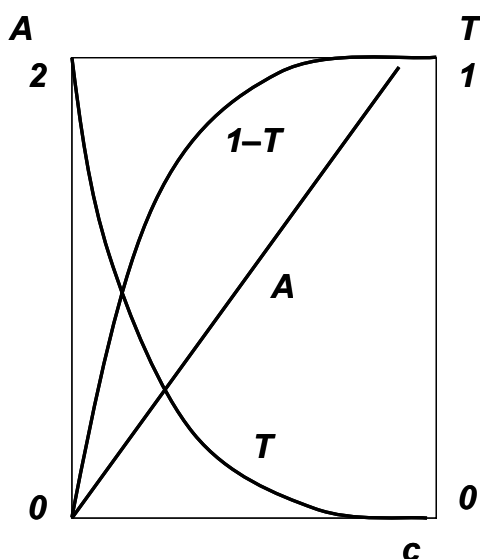


Рис. 1.20. Зависимость пропускания (T), коэффициента поглощения ($1 - T$) и оптической плотности (A) от концентрации (c) хромофора в растворе.

Рис. 1.24. Зависимость пропускания (T), коэффициента поглощения ($1 - T$) и оптической плотности (A) от концентрации (c) хромофора в растворе.

Закон Бугера–Ламберта–Бера выполняется не всегда. Строго говоря, он справедлив лишь для плоскопараллельного пучка монохроматического света, проходящего через гомогенную изотропную среду при незначительной заселенности возбужденного энергетического уровня. Нарушения этих условий приводят к кажущимся отклонениям от закона Бугера–Ламберта–Бера. Другими словами, коэффициент ϵ перестает быть постоянным, а увеличивается с ростом концентрации (тогда говорят о положительных отклонениях) или уменьшается (отрицательные отклонения). Наблюдаемые от закона отклонения могут, с одной стороны, служить помехой при количественном анализе, с другой – давать дополнительную информацию о свойствах исследуемых объектов. Наиболее часто встречающиеся причины можно разделить на физико-химические (связанные со свойствами вещества или раствора), инструментальные (связанные с особенностями данного спектрофотометра) и связанные с анизотропией изучаемого объекта. Перечислим наиболее часто встречающиеся 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 гемолизатом), то это будет приводить к занижению оптической плотности вследствие *эффекта сита* (см. ниже). Занижение тем выше, чем больше оптическая плотность раствора.
2. В формулировке основного закона светопоглощения подразумевается, что ϵ является константой, не зависящей от концентрации. 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 A от c может отклоняться от линейной при использовании немонахроматического света.
4. В растворе под действием измеряющего света протекают фотохимические превращения хромофоров. Это будет приводить к изменению оптической плотности прямо «под лучом». При обычных интенсивностях света в современных спектрофотометрах этого не бывает, но помнить о такой возможности все же нужно.
5. При очень высоких интенсивностях измеряющего светового пучка, когда не один, а несколько фотонов будут попадать на молекулу за время жизни ее возбужденного состояния,

в результате поглощения света концентрация невозбужденных молекул может снизиться. Это приведет к видимому уменьшению оптической плотности раствора. Однако такая интенсивность достигается только при облучении растворов светом достаточно мощных лазеров.

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

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

1.9 Спектры пропускания и спектры поглощения

Спектром 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 A какого-либо объекта, например раствора, от длины волны λ света называют спектром поглощения данного объекта. Спектр раствора индивидуального соединения принято нормировать к единице концентрации и длины кюветы; т. е. спектром поглощения индивидуального вещества называют зависимость от длины волны измеряющего света молярного коэффициента поглощения ε .

Спектры поглощения биологически важных веществ (рис. 1.15) представляют собой сравнительно плавные кривые с одним или несколькими максимумами. Максимум на этой кривой ($\lambda_{\max}$) соответствует наиболее вероятной, усредненной величине энергии электронного перехода E , которая может быть вычислена по уравнению

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

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. $\varepsilon/2$) (рис. 1.21).

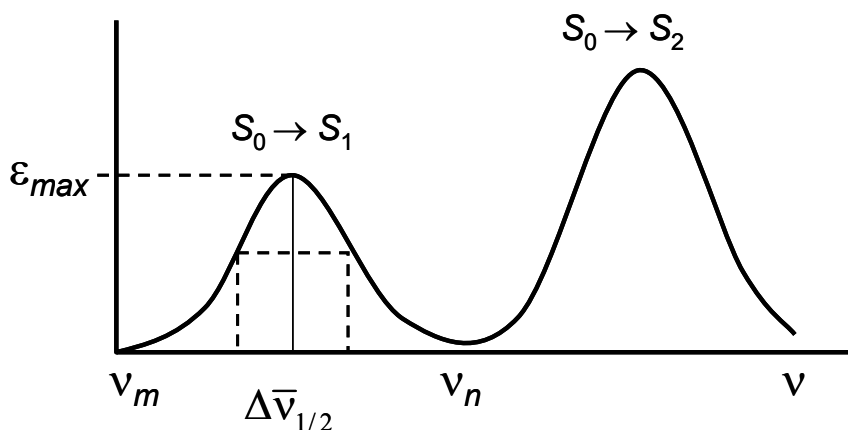


Рис. 1.21. Характеристики полосы поглощения

Площадь под кривой поглощения на графике зависимости ε от волнового числа $\tilde{\nu}$ (рис. 1.25) прямо пропорциональна безразмерной величине, называемой силой осциллятора f , которая характеризует вероятность электронных переходов в результате захвата квантов света данным хромофором:

$$f_{mn} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\tilde{\nu}_m}^{\tilde{\nu}_n} \varepsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (1.56)$$

Электрон, поглощая фотоны той или иной энергии, может переходить на разные возбужденные электронные уровни, при этом в спектре поглощения вещества будет наблюдаться несколько полос. 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.

1.10 Изменение спектров поглощения: 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. 1.22.

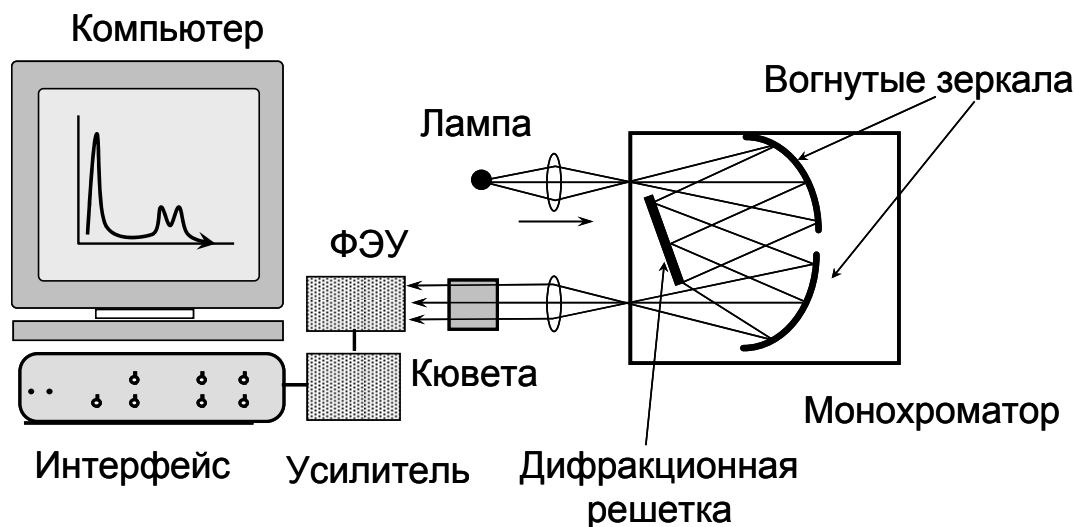


Рис. 1.22. Блок-схема однолучевого спектрофотометра.

Свет от источника (чаще используются ксеноновые лампы, дающие сплошной спектр излучения в видимом и ультрафиолетовой областях) проходит через монохроматор (устройство для выделения определенного диапазона длин волн). Монохроматический пучок света проходит через кювету, и его интенсивность измеряют детектором света – фотоэлектронным умножителем (ФЭУ). Фототок подается на вход усилителя, затем сигнал преобразуется в специальном электронном блоке и подается на компьютер. 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. 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 фототока. В двухлучевых спектрофотометрах монохроматический пучок света расщепляется на два, например, с помощью вращающегося зеркала с секторными вырезами (обтюратора). Эти два одинаковые 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 $\Delta A = -\lg(\Delta T)$. Кривая $\Delta A = f(\lambda)$ записывается самописцем. Таким образом, двухлучевой спектрофотометр специально предназначен записи разностных спектров (см. далее). На нем можно записывать и обычные спектры поглощения, если в качестве образца сравнения взять кювету с растворителем. Поскольку обтюратор дает около 50 сигналов для каждого пучка в 1 с, а современные микропроцессоры в состоянии произвести расчеты каждой пары таких сигналов (учитывая также темновой ток ФЭУ), все медленные изменения чувствительности ФЭУ и интенсивности излучения лампы автоматически исключаются, так как отношение I_1/I_2 остается постоянным при одновременном одинаправленном 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.

В простых фотометрах для выделения нужного спектрального участка используют светофильтры. В спектрофотометрах для разложения света источника в спектр применяют дифракционные решетки, обладающие достаточно высокой разрешающей способностью. Однако не нужно думать, что монохроматор, входящий в качестве основного элемента в состав спектрофотометра, 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 ширины полос в спектре поглощения. Считается, что соотношение между $\Delta\lambda_{щ}$ и полушириной полос поглощения $\Delta\lambda_{1/2}$ должно удовлетворять уравнению

$$\Delta\lambda_{щ} \leq \Delta\lambda_{1/2} / 10 \quad (1.57)$$

Другая причина возможных ошибок при измерении спектра поглощения – присутствие в монохроматическом измеряющем пучке примеси *блуждающего света*, т.е. излучения с другими длинами волн, которое попадает на выход монохроматора, минуя дифракционную решетку, вследствие многократных отражений вошедшего в прибор света на внутренние деталях прибора. Блуждающий свет может занижать или, наоборот, завышать оптическую плотность. 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. Во многих случаях рекомендуется использовать двойные монохроматоры: свет, вышедший из первого монохроматора, подается на вход второго.

В современных вариантах спектрофотометрии используют оптоволоконные системы передачи света, в частности, лазерного излучения (рис. 1.23). Это дает возможность проводить анализ тех образцов, которые невозможно поместить в кювету, например, микрообъемов жидкостей или участков тканей *in vivo*.

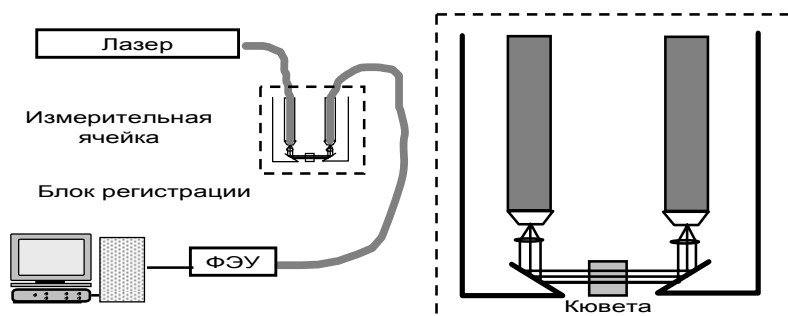


Рис. 1.27. Измерение поглощения в малых объемах с помощью волоконной оптики

1.11 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:

- число максимумов в спектре поглощения,
- положение (длина волны) каждого максимума;
- значение коэффициентов поглощения в каждом из максимумов (в единицах s или ϵ);
- 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 (1.46). При количественном анализе можно одновременно определять концентрацию нескольких веществ, если спектры их поглощения различаются по форме. Суммарный спектр поглощения A_{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 $A_{A+B} = A_A + A_B$, где A_A и A_B – оптические плотности компонентов.

$$A_{A+B} = \epsilon_A l c_A + \epsilon_B l c_B \quad (1.58)$$

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 A_{A+B} проводились при *одной* длине волны. Для двух разных длин волн случают систему из двух уравнений с двумя неизвестными, решив которую, находят обе концентрации.

$$\begin{aligned} A_{(A+B)}^{\lambda_1} &= \epsilon_A^{\lambda_1} l c_A + \epsilon_B^{\lambda_1} l c_B \\ A_{(A+B)}^{\lambda_2} &= \epsilon_A^{\lambda_2} l c_A + \epsilon_B^{\lambda_2} l c_B \end{aligned} \quad (1.59)$$

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. Теоретически, если

число длин волн, используемых для измерений, равно числу компонентов, можно проанализировать и более сложные смеси. На практике же редко удастся осуществить количественный спектрофотометрический анализ более двух–трех соединений в одной смеси. Критерием правильности анализа может служить совпадение сконструированного спектра, рассчитанного после определения концентраций, как показано 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, а точнее, при $A = \lg e = 0,4343$ (рис. 1.24).

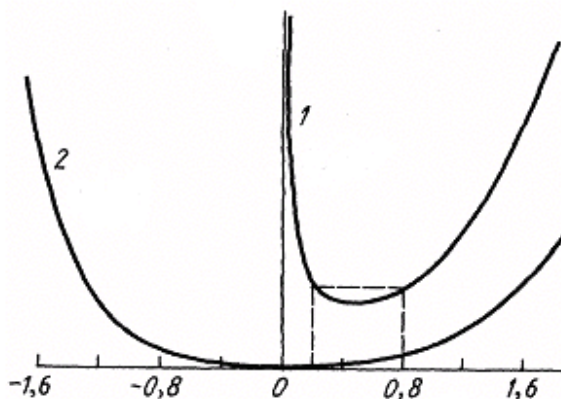


Рис. 1.24. Ошибка определения оптической плотности $\Delta A/A$ при обычной (1) и разностной (2) спектрофотометрии

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.

1.11.1 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 A_1 и образца сравнения A_2 , затем вычитают из первой величины вторую и получают разностный спектр поглощения, т. е. кривую зависимости $\Delta A = A_2 - A_1$ 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:

$$\Delta A = -\lg(I_2 / I_1) \quad (1.60)$$

Метод дифференциальной спектрофотометрии дает возможность определить величину ΔA с бóльшей 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 $\Delta A/A$. На рис. 1.28 показана ошибка определения оптической плотности $\Delta A/A$ при обычной (1) и дифференциальной (2) спектрофотометрии. Видно, что метод дифференциальной 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.

1.12 Погрешности измерений 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,
- б) Эффект сита (или проскока).

1.12.1 Влияние рассеяния света образцом

В результате светорассеяния происходит отклонение падающего 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 A есть сумма оптической плотности, обусловленной светорассеянием A_s , и оптической плотности, обусловленной истинным поглощением A_a

$$A = A_s + A_a \quad (1.61)$$

Чтобы найти A по уравнению (1.61), нужно знать зависимость A_s от длины волны. Известно, что для суспензии частиц в отсутствие поглощения

$$A_s = a / \lambda^n \quad (1.62)$$

где a и n – константы, причем в зависимости от формы и размеров частиц n может иметь значения от 0 до 4. Прологарифмировав уравнение (1.62), получим

$$\lg A_s = \lg a - n \lg \lambda \quad (1.63)$$

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

Построив график зависимости $\lg A = f(\lg \lambda)$, можно убедиться, что в длинноволновой области спектра, где поглощение отсутствует и $A = A_s$, получится прямая линия; экстраполировав ее, можно найти величину $\lg A_s$, а следовательно, A_s во всем измеренном спектральном интервале. В заключение рассчитываем $A_a = A - A_s$ и строим истинный спектр поглощения $A_a = f(\lambda)$.

1.12.2 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, и там, где он их минует (рис. 1.25).

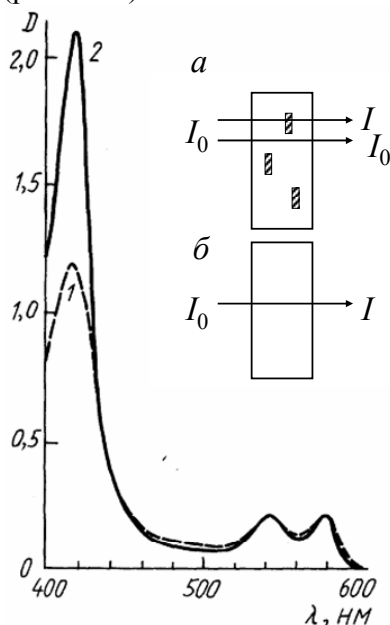


Рис. 1.25. Эффект сита в суспензии эритроцитов, 1 — спектр поглощения суспензии эритроцитов; 2 — тот же образец после гемолиза, а — прохождение пучка света через суспензию эритроцитов; б — через гемолизат.

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?

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 гемопротейда особенно велика. Таким образом, эффект сита приводит к сглаживанию спектров поглощения.

1.13 Спектры отражения

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. 1.26).

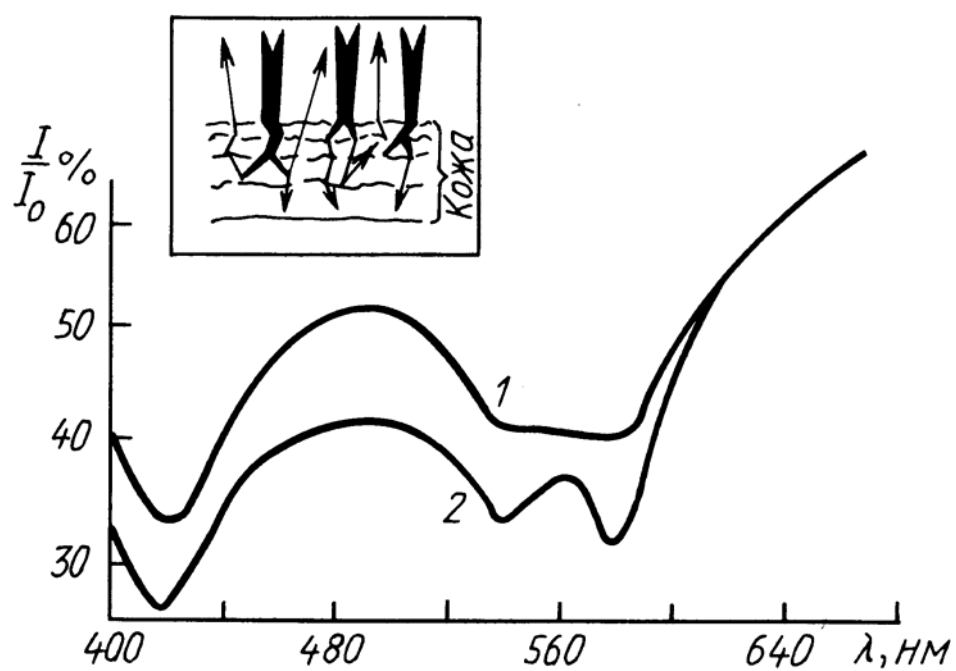


Рис. 1.26. Спектры отражения кожи человека: 1 и 2 — участок кожи до и после развития УФ-эритемы; на вставке показан путь света в коже. Остальные пояснения в тексте.