

1. Monochromatinės šviesos sugertis. Lamberto-Bugerio-Bero dėsnis

Vienas iš pirmųjų bioobjekto ir šviesos sąveikos aktų yra šviesos sugertis. Sugerties pasėkoje biomolekulė įgauna perteklinės energijos, kuri gali būti panaudojama tolesnių fotofizikinių, fotocheminių ir fotobiologinių vyksmų inicijavimui ir vykdymui. Šios perteklinės energijos migracijos ir relaksacijos kelių tyrimai optiniais ar kitais metodais suteikia informacijos apie biomolekulių ir biosistemų struktūrą bei juose vykstančius procesus.

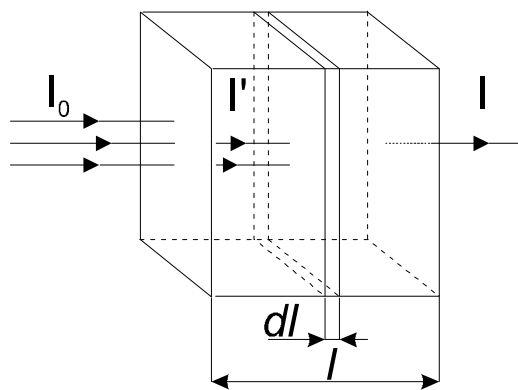
Šviesos sugertį aprašančius dėsnius aptarsime pasinaudodami bandinio sugerties matavimo eksperimentu. Tegu kiuvetė su tiriamuoju tirpalu apšviečiama intensyvumo I_0 monochromatine šviesa (1.13 pav.). Jeigu tirpalas sugeria šviesą, tai pro tirpalą praėjusios šviesos intensyvumas I bus mažesnis. Krentančios ir praėjusios šviesos intensyvumų santykis vadinamas tirpalo pralaidumu T :

$$T = I / I_0 \quad (1.5.1)$$

Tirpalo sugerčiai apibūdinti galima naudoti ir kitą parametą, – sugerties koeficientą A . Neatsižvelgiant į sklaidą,

$$A = 1 - T = (I_0 - I) / I_0 = I_s / I_0 \quad (1.5.2)$$

kur I_s – bandinio sugertos šviesos intensyvumas.



Natūralu, kad tiek tirpalo koncentracija, tiek šviesos nueitas kelias keičia pro tirpalą praėjusios šviesos intensyvumą. Pabandykime rasti priklausomybę tarp šių dydžių. Tam tikslui bandinyje išskiriame ploną sluoksnėlį dl (1.13 pav.).

Tegu bandinio molekulių, sugeriančių šviesą, koncentracija lygi n [cm^{-3}]. Taikinio teorijos rėmuose kiekviena molekulė apibūdinama efektyviu šviesos pagavos skerspjūviu (pagavos skerspjūviu) S [cm^2].

1.13 pav. Schema Bugerio-Lamberto-Bero dėsnio išvedimui

Bendra pagavos skerspjūvių suma išskirtame sluoksnyje, skaičiuojama 1 cm^2 plotui ir storiui dl , lygi $S \cdot n \cdot dl$. Taigi, sklindančios šviesos intensyvumo I_0 pokytis sluoksnyje dl lygus:

$$dI = -I_0 \cdot S \cdot n \cdot dl \quad (1.5.3)$$

Minusas žymi tai, kad intensyvumas sumažėjo. Tuomet, sugertos ir kritusios šviesos intensyvumų santykis:

$$dI / I_0 = -S \cdot n \cdot dl \quad (1.5.4)$$

Po integravimo visu bandinio pločiu gauname:

$$\ln(I / I_0) = -S \cdot n \cdot l \text{ arba } I / I_0 = T = e^{-S \cdot n \cdot l}. \quad (1.5.5)$$

Vienalytėse sistemose šviesos sugertį aprašo Bugerio (Bouguer) dėsnis:

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot l}; \quad (1.5.6)$$

čia I_0 yra kritusios, o I – praėjusios šviesos intensyvumas, l – optinio kelio ilgis (bandinio ar kiuvetės storis). Dydis k yra vadinamas sugerties koeficientu. Aprašant šviesos sugerties molekulinėse sistemose vyksmą, yra įvedama molekulių, patalpintų šviesos sraute, sugerties akto statistinės tikimybės sąvoka, t.y., molekulių sugerties skerspjūvis σ . Sugerties akto tikimybė, perskaičiuota vienai molekulei, yra vadinama sugerties skerspjūviu:

$$\sigma = k / n; \quad (1.5.7)$$

Šviesos sugertį silpnai sugeriančiuose pigmentų tirpaluose aprašo Bugerio ir Bero (Beer) dėsnis (dar vadinamas Bugerio-Lamberto-Bero dėsniumi):

$$I = I_0 \cdot e^{-\sigma \cdot n \cdot l}; \quad (1.5.8)$$

Skaičiavimuose patogiau naudoti dešimtainius logaritmus, todėl (1.5.8) dėsnį galima parašyti kitaip:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (1.5.9)$$

Šioje formulėje ε vadinamas ekstinkcijos koeficientu arba tiesiog ekstinkcija. Medžiagos tirpalo koncentracija c išreiškiama $[\text{mol/l}] = [\text{M}]$, optinio kelio ilgis l – $[\text{cm}]$, todėl ekstinkcijos koeficiento dimensija yra $[\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$. Išlogaritnavus (1.5.9) formulę:

$$\lg(I_0 / I) = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1.5.10)$$

Kadangi dydis $T = I / I_0$ vadinamas bandinio pralaidumu, o $D = \varepsilon \cdot c \cdot l$ – bandinio optiniu tankiu (Bero dėsnis), (1.5.10) formulę galima perrašyti taip:

$$\begin{aligned} \lg(I / T) &= \varepsilon \cdot c \cdot l = D \text{ arba} \\ T &= 10^{-D} \end{aligned} \quad (1.5.11)$$

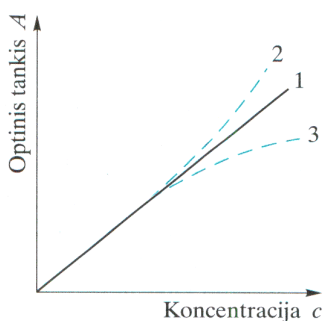
Ekstinkcijos koeficiento sąryšis su pagavos skerspjūviu nusakomas formule:

$$\varepsilon = (N_A \cdot \lg e / 1000) \cdot \sigma = 2,62 \cdot 10^{20} \cdot \sigma. \quad (1.5.12)$$

2. Spektrofotometrinė analizė.

Sugerties spektrų analizė suteikia informacijos ne tik apie molekulių struktūrą, tačiau dažnai naudojama molekulių kiekiui bandinyje ar biologiniame objekte nustatyti. Kiekybinės analizės metodai, pagrįsti nustatomosios medžiagos (vieno mišinio sando ar visų sandų) savybe sugerti optinio ruožo elektromagnetinę spinduliuotę, vadinami spektrofotometrinės analizės metodais, jeigu junginių analizė atliekama, panaudojant monochromatinės spinduliuotės atrankiąją sugertį regimajame, ultravioletiniame ir infraraudonajame spektre. Tai paaiškinama tuo, kad daugelis biologiškai aktyvių molekulių pasižymi specifine sugertimi šiame bangų ruože. Šiandien tam naudojama palyginti nesudėtinga ir nebrangi aparatūra, spektrofotometriniai metodai daug tikslesni už fotometrinius, be to galima spręsti daugiau uždavinių. Pavyzdžiui galima nustatyti daugelio elementų ir molekulių kiekį plačiame bangų ilgio ruože; atlikti daugiasandės audinio struktūros ar bet kokio biologinio objekto kiekybinę analizę (iš karto nustatyti keletą sandų bandinyje); nustatyti šviesą sugeriančių molekulių mišinio sudėtį ir jų patvarumo konstantas bei biologiškai aktyvių molekulių disociacijos konstantas; tirti cheminę ir fiziologinę pusiausvyrą biologiniuose objektuose. Labiausiai taikomi spektrofotometriniai metodai, kurie remiasi šviesos sugertimi artimojo ultravioletinio, regimojo ir artimojo infraraudonojo spektro ruože (200-1100nm.).

Kiekybinės analizės pagrindą sudaro Bugerio, Lamberto ir Bero dėsnis (1.5.9). Jei elektromagnetinė spinduliuotė sugerama pagal šį dėsnį, tai optinis tankis tiesiogiai proporcingas šviesą sugeriančių molekulių koncentracijai bandinyje. Šiuo atveju koordinatėse atidėjus optinio tankio priklausomybę nuo koncentracijos, turėtume gauti tiesią liniją, kertančią koordinatinių pradžių (1.24 pav.).



1.24 pav. Optinio tankio priklausomybė nuo koncentracijos. 1 – normali, 2,3 – nukrypimai

Tiesės polinkio kampas priklauso nuo molinio sugerties koeficiento ϵ_{λ} vertės. Jei bandinys neatitinka pagrindinio spektrofotometrijos dėsnio, tai vietoj tiesių linijų būna kreivės (1.24 pav. kreivės 2, 3). Tokiais atvejais spektrofotometriniai metodai gali būti taikomi bandinių kiekybinei analizei, tačiau reikia pasirinkti tokių koncentracijų ar bandinio storio diapazoną, kuriame kaip galima mažiau nukrypstama nuo tiesės. Nuo pagrindinio spektrofotometrijos dėsnio nukrypstama, kai šviesos srautas yra nepakankamai monochromatiškas (prietaiso paklaida), be to, tam turi įtakos ir medžiagos būseną tirpale. Nuo pagrindinio spektrofotometrijos dėsnio gali būti nukrypstama dėl įvairiausių cheminių priežasčių: solvatacijos (hidratacijos),

hidrolizės, kompleksinių junginių susidarymo, tarpinių produktų bei koloidinių tirpalų susidarymo, tautomerinių pokyčių, polimerizacijos, kondensacijos ir kt. Plačiau apie nukrypimus nuo Bugero Lamberto ir Bero dėsnio aptarsime vėlesniuose skyriuose. Vadinasi, spektrofotometrinius matavimus reikia atlikti griežtai nustatytais sąlygomis. Spektrofotometrinė analizė pakankamai sparti ir pasižymi dideliu atrankumu. Metodas sėkmingai taikomas biocheminiuose tyrimuose, taip pat biocheminių reakcijų kinetikai tirti. Be to spektrofotometrinė analizė dažnai naudojama cheminės fiziologinės pusiausvyros tirpaluose charakteristikoms nustatyti, nes matuojant elektromagnetinės spinduliuotės sugertį nepažeidžiama pusiausvyroji būseną.

Spektrofotometrijos pagrindas yra molekulių sugerties spektro matavimas. Sugerties spektras – tai kokio nors objekto optinio tankio priklausomybė nuo tiriančios šviesos bangos ilgio λ . Tirpalų optinis tankis priklauso nuo tiriamos medžiagos koncentracijos, bandinio storio (optinio kelio ilgio) ir ekstinkcijos koeficiento (1.5.11). Todėl sugerties spektrą įprasta normuoti, t.y., atskirų medžiagų sugerties spektru vadinama molinio koeficiento ε priklausomybė nuo sugeriamos šviesos bangos ilgio. Kadangi ε charakterizuoja medžiagą, tai šitaip sunormuotas sugerties spektras bus individualus kiekvienai medžiagai. Senoju fotokalorimetrijos metodu molekulių koncentracijos buvo nustatomos labai įvairiais metodais: sugeriančio sluoksnio storio keitimo, gradavimo grafiko, lyginamuoju, priedo ir diferenciniu (plačiau skaityti¹). Šiandien spektrofotometrijoje išmatuojama bandinio sugertis žinomo pločio kiuvetėje ties bangos ilgiu, kuriam yra žinomas molekulės ekstinkcijos koeficientas, ir pasinaudojant Bugero, Lamberto ir Bero dėsniais apskaičiuojama tiriamų molekulių koncentracija.

Medžiagų tyrimams naudojama kokybinė ir kiekybinė spektrofotometrinė analizė. Kokybinė analizė paremta tuo, kad kiekviena molekulė turi charakteringą sugerties spektrą (maksimumų skaičius spektre, jų bangos ilgiai, juostos plotis ir pan.). Kiekybinė analizė paremta tiesine molekulių sugerties priklausomybe nuo koncentracijos ir sugerties adityvumu.

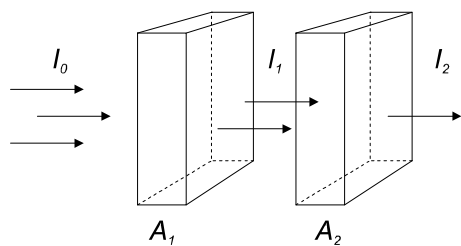
¹ D.Mickevičius, Cheminės analizės metodai, I dalis, Vilnius., Žiburio leidykla, p.408.

3. Adityvumo principas sugerties spektroskopijoje

Adityvumo principas kaip tik ir skelbia, kad nereaguojančių medžiagų mišinio optinis tankis, esant tam tikram bangos ilgiui, lygus sumai jo komponentų optinių tankių:

$$D_{1+2} = D_1 + D_2; \quad (1.7.11)$$

Tai adityvumo principo matematinė išraiška, kuri nusako, kad atskirų medžiagų sugerties koeficientų suma yra lygi šių medžiagų mišinio sugerties koeficientui. Pabandykime išsiaiškinti, ar šis teiginys teisingas. Apskaičiuokime pralaidumą ir sugertį T_{1+2} ir D_{1+2} dviems lygiagrečiai vienas po kito išdėstytiems bandiniams, kurių optinis tankis ir pralaidumas yra lygūs D_1 ir D_2 , bei D_1 ir D_2 atitinkamai.



Tegu į pirmą pavyzdį krenta I_0 intensyvumo šviesa. Į antrą - I_1 intensyvumo šviesa, kuri lygi šviesos intensyvumui praėjus pirmą pavyzdį. Šviesos, išeinančios iš antro pavyzdžio intensyvumas lygus I_2 . Pasinaudodami pralaidumo apibrėžimu (1.5.1), užrašome:

1.25 pav. Adityvumo principo įrodymo schema. $T_1 = I_1 / I_0; T_2 = I_2 / I_1$ ir $T_{1+2} = I_2 / I_0; \quad (1.7.12)$

Iš sąryšių seka:

$$T_{1+2} = T_1 \cdot T_2. \quad (1.7.13)$$

nes $(I_1 / I_0) \cdot (I_2 / I_1) = I_2 / I_0.$

Pasiremdami (1.5.10) sąryšiu, galime užrašyti:

$$D_1 = -\lg T_1; D_2 = -\lg T_2 \text{ ir } D_{1+2} = -\lg T_{1+2}; \quad (1.7.14)$$

Sudėję D_1 ir D_2 , gauname:

$$D_1 + D_2 = -\lg (T_1 \cdot T_2) = D_{1+2}. \quad (1.7.15)$$

Tokiu būdu, bendras tirpale esančių medžiagų optinis tankis yra lygus tirpale esančių medžiagų optinių tankių sumai:

$$\Sigma D_i = D_{\Sigma} \quad (1.7.16)$$

Jei tiriamajame objekte yra dvi ar daugiau tarp savęs nereaguojančių medžiagų, kurių sugerties spektrai ir moliniai sugerties koeficientai žinomi ar išmatuoti, esant tam tikriems bangos ilgiams, tai jų koncentraciją galima nustatyti išmatavus šiuos bangos ilgius atitinkančių optinį tankį. Dažniausiai susiduriama su dvisandės medžiagų sistemos analize. Šių sandų šviesos sugerties juostos spektre gali būti įvairiai išsidėsčiusios viena kitos atžvilgiu.

Vienu atveju abiejų sandų šviesos sugerties juostos neužkloja viena kitos. Tada spektrofotometrinės analizės metu išmatuojami optiniai tankiai D_{λ_1} ir D_{λ_2} , esant bangos ilgiams λ_1 ir λ_2 , kurie atitinka spektro sritis, kuriose pasireiškia tik vienos iš medžiagų sugertis, ir apskaičiuojamos abiejų sandų koncentracijos:

$$c_1 = D_{\lambda_1}/\varepsilon_{1\lambda_1}l \text{ ir } c_2 = D_{\lambda_2}/\varepsilon_{2\lambda_2}l;$$

Čia $\varepsilon_{1\lambda_1}$ ir $\varepsilon_{2\lambda_2}l$ – pirmojo ir antrojo komponento moliniai sugerties koeficientai, išmatuoti ties bangos ilgiais λ_1 ir λ_2 , o l – šviesos kelio ilgis per bandinį.

Matuojant mišinių, kurių sugerties spektrai visiškai užkloja vienas kitą visame spektro ruože (1.26 pav.), sugertį, taip pat galime išmatuoti mišinį sudarančių komponentų koncentracijas pasinaudoję sugerties adityvumo principu (žr. (1.7.11)). Tam tikslui parenkami du bangos ilgiai $\lambda_1=534$ nm ir $\lambda_2=576$ nm, ties kuriais yra didžiausias mišinį sudarančių sandų sugerties skirtumas, ir išmatuojami šiuos bangos ilgius atitinkantys optiniai tankiai D_1 ir D_2 . Kaip minėta anksčiau, molekulių tirpalo optinis tankis yra proporcingas molekulių koncentracijai, bandinio storiui ir molekulės ekstinkcijos koeficientui, tad

$$D_{\lambda_1} = \varepsilon_{1\lambda_1} \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_{2\lambda_1} \cdot c_2 \cdot l$$

ir

$$D_{\lambda_2} = \varepsilon_{1\lambda_2} \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_{2\lambda_2} \cdot c_2 \cdot l$$

Dviejų sandų mišinio ties bet kuriuo bangos ilgiu išmatuota sugertis (optinis tankis), remiantis sugerties adityvumo principu, lygi:

$$D = D_1 + D_2 ,$$

kur D_1, D_2 – sandų optiniai tankiai.

Matuodami bandinio sugertį ties dviem skirtingais bangų ilgiais, turėsime lygčių sistemą,

$$D(\lambda_1) = \varepsilon_1(\lambda_1) \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_2(\lambda_1) \cdot c_2 \cdot l ,$$

$$D(\lambda_2) = \varepsilon_1(\lambda_2) \cdot c_1 \cdot l + \varepsilon_2(\lambda_2) \cdot c_2 \cdot l .$$

kurioje išreikštos mus dominančios molekulių tirpalo charakteristikos, t.y., tirpalą sudarančių molekulių koncentracijos. Jeigu mes žinome tirpale esančių molekulių molinius ekstinkcijos koeficientus ties bangos ilgiais λ_1 ir λ_2 , tai, žinodami bandinio storį, išsprendę šią lygčių sistemą, nesunkiai apskaičiuosime bandinį sudarančių sandų koncentracijas.

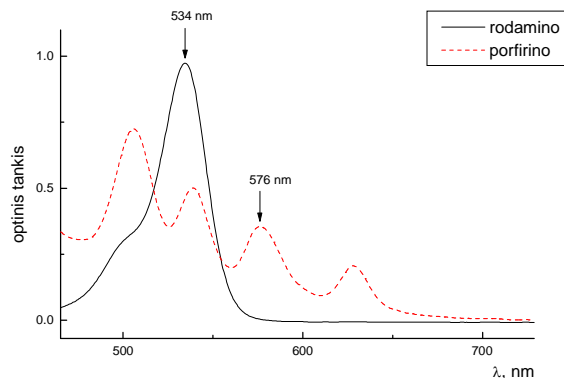
$$c_1 = \frac{D(\lambda_1) - \varepsilon_2(\lambda_1) \cdot c_2 \cdot l}{\varepsilon_1(\lambda_1) \cdot l}$$

$$c_2 = \frac{D(\lambda_1) \cdot \frac{\varepsilon_1(\lambda_2)}{\varepsilon_1(\lambda_1)} - D(\lambda_2)}{\frac{\varepsilon_1(\lambda_2) \cdot \varepsilon_2(\lambda_1)}{\varepsilon_1(\lambda_1)} \cdot l - \varepsilon_2(\lambda_2) \cdot l}$$

Kiekybiniams tyrimams bangos ilgiai parenkami tokie, kad sandų moliniai ekstinkcijos koeficientai skirtųsi labiausiai. Konkrečiam pavyzdžiui,

rodamino ir porfirino mišiniui (1.26 pav.) tai galėtų būti $\lambda_1=534$ nm ir $\lambda_2=576$ nm.

Teoriškai būtų galima išanalizuoti ir sudėtingesnius mišinius. Kadangi molekulių spektrai yra platūs, būtų galima išmatuoti bandinio sugertį ties įvairiais bangos ilgiais. Tačiau praktikoje retai pavyksta atlikti kiekybinę spektrofotometrinę analizę daugiau kaip 2-3 sandams viename mišinyje.



1.26 pav. Rodamino ir porfirino sugerties spektrai.