

5. PIRMINIAI FOTOCHEMINIŲ VYKSMŲ DĒSNINGUMAI IR TYRIMO METODAI

5.1. Fotobiologinių vyksmų stadijos

Fotobiologiniai vyksmai prasideda kvanto sugertimi biomolekulėje, o baigiasi kokiu nors fiziologiniu organizmo atsaku (reakcija į šviesą). Fotobiologinių vyksmų pavyzdžiais galėtų būti šie gyvuose organizmuose stebimi vyksmai:

Fotosintezė – organinių molekulių sintezė panaudojant (saulės) šviesos energiją;

Fototaksis – organizmų (pvz. bakterijų) judėjimas link šviesos arba nuo šviesos;

Fototropizmas – lapų arba šakų pasisukimas į saulę arba nuo saulės;

Rega – šviesos energijos pavertimas nerviniais impulsais fotoreceptoriuose.

Akivaizdu, kad fotobiologiniai vyksmai pasižymi didele raiškos įvairove, tačiau daugeliu atveju juos būtų galima išskaidyti į kelias bendras stadijas:

- 1) šviesos sugertis specialioje molekulėje, kuri vadinama fotoreceptorine molekule, arba fotoreceptoriumi;
- 2) vidinė energijos pernaša molekulėje;
- 3) tarpmolekulinė energijos pernaša;
- 4) pirminis fotocheminis vyksmas, vykstantis perteklinės energijos dėka;
- 5) tamsinės reakcijos, sąlygojančios stabilių produktų susidarymą;
- 6) biocheminės reakcijos, vykstančios dalyvaujant fotoproduktams;
- 7) bendro fiziologinio organizmo atsako į šviesos poveikį formavimasis.

Pirminių fotobiologinių vyksmų stadijų aprašymas dažniausiai apsiriboja 1 – 4 punktais. Pirminis fotocheminis aktas – tai procesas, kuriame dalyvauja molekulė iš žemiausio sužadinto singuletinio lygmens S_1 ar žemiausio sužadinto tripletinio lygmens.

Pirminio fotocheminio akto kvantinis našumas – tai sureagavusių molekulių skaičiaus santykis su sugertų kvantų skaičiumi. Sužadinta molekulė gali suformuoti pirminį fotoproduktą P arba nurelaksuoti į pagrindinę būseną. Įsivedus šių procesų spartos koeficientus:



reakcijos kvantinis našumas apskaičiuojamas taip:

$$\Phi = \frac{dP}{dA^*} = \frac{k_R}{k_R + k} \quad (5.1.3)$$

Realiose sąlygose pirminių fotoprocesų kvantinį našumą galime nustatyti iš pradinės medžiagos mažėjimo ΔA ir reakcijos fotoprodukto atsiradimo ΔP per laiko trukmę t šviečiant bandinį monochromatine šviesa:

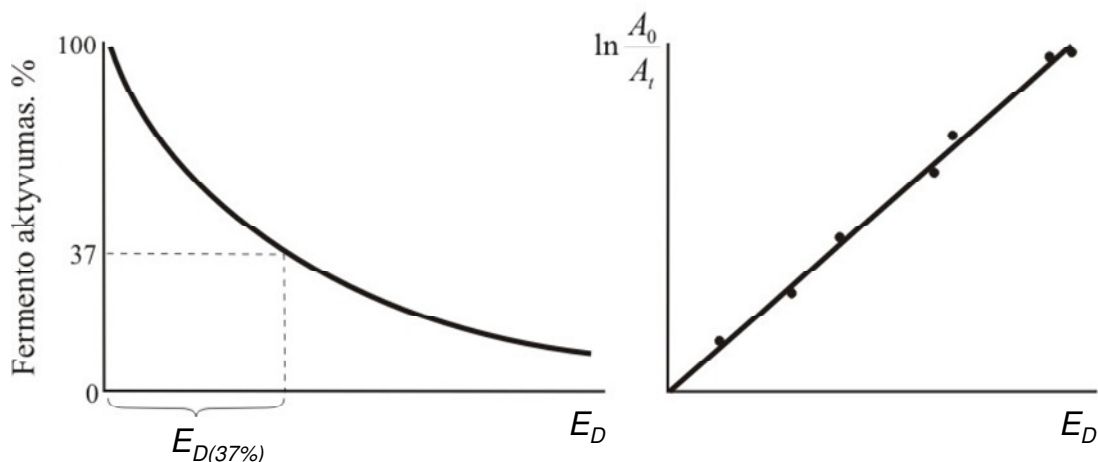
$$\Phi = -\frac{\Delta A}{I \cdot t(1-T)} \quad (5.1.4)$$

čia, $I \cdot t$ – švitinimo dozė, $1-T$ – sugerties koeficientas.

Skaičiuojant fotoproceso kvantinį našumą pagal šią formulę reikia nepamiršti, kad, jei fotoprodukto sugerties spektras persikloja su pirminės medžiagos sugerties spektru, tai fotoproduktas sugers dalį šviesos kvantų ir tai mažins fotoproceso kvantinį našumą Φ , o grandinių reakcijų atsiradimas (pvz. pirminiuose fotoprocusuose susidarančių radikalų inicijuojamos reakcijos) gali fotoproceso kvantinį našumą Φ padidinti. Todėl patikrinimui pageidautina visada atsižvelgti į pradinę pirminio fotocheminio proceso išraišką (5.1.3).

5.2. Fotocheminio veikimo spektras

Viena iš užduočių, tiriant pirminius fotocheminius procesus – nustatyti, medžiagą ar medžiagas, kurioms sugėrus šviesos kvantą, prasideda fotocheminės reakcijos. Tokia paieška



5.1 pav. Fermento inaktyvacijos nustatymas: A_0 ir A_t – fermento aktyvumai atitinkamai prieš ir po apšvietimo doze E_D .

imo spektrą ir lyginant jį su medžiagų, kurioms sugėrus šviesos kvantą gali prasidėti reakcijos, sugerties spektru. Tai iliustruoti galima nagrinėjant fotocheminės fermentų inaktyvacijos reakciją bandinyje, šviečiant ultravioletine šviesa.

Ši reakcija ypatinga tuo, kad ji vyksta vienpakopiu mechanizmu: šviesos kvanto veikiama molekulė arba visiškai inaktyvuojasi arba nesikeičia, t.y. nėra jokių papildomų ar tarpinių procesų. Šio proceso kinetikos nagrinėjimui galima pasitelkti modelinį eksperimentą.

Tegu kiuvetėje, kurios storis $l = 1$ cm yra fermento molekulių tirpalas, kurių skaičius 1 cm^3 tirpalo lygus n ; $\sigma [\text{cm}^2]$ – fermento molekulės sugerties skerspjūvis fermento molekulėje (žr. (1.5.7) išraišką). I_0 ir $I [\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}]$ – krentančios ir praėjusios kiuvetę šviesos intensyvumai, išreikšti kvantų, krintančių į 1 cm^2 per 1 s, skaičiumi. Kiekvieną sekundę tirpalas sugers ($I_0 - I$) $[\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}]$ kvantų. Taigi per 1 sekundę 1 cm^3 inaktyvuojamų fermento molekulių skaičių galima apskaičiuoti pagal formulę :

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi(I_0 - I), \quad (5.2.1)$$

kur Φ – reakcijos kvantinis našumas. Ryšį tarp dydžių I , I_0 ir σ , l nusako Bugerio ir Bero dėsnis (1.5.8), taigi:

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi \cdot I_0 (1 - e^{-\sigma nl}) \quad (5.2.2)$$

Stipriai praskiestuose tirpaluose, kur $\sigma nl < 0,1$, išraiška skliaustuose apytiksliai lygi σnl (paklaida $< 5\%$), tada, atsižvelgus, kad $l = 1$:

$$-\frac{dn}{dt} = \Phi \cdot I_0 \sigma n \quad (5.2.3)$$

Integruojant šią išraišką švitinimo trukmės intervale, gauname:

$$\int -\frac{dn}{n} = \int_0^t \Phi I_0 \sigma dt \quad (5.2.4)$$

$$\ln \frac{n_0}{n_t} = I_0 t \sigma \Phi = E_D \sigma_R, \quad (5.2.5)$$

čia $E_D = I_0 t$ – švitinimo dozė, $\sigma_R = \sigma \cdot \Phi$ – fermento inaktyvacijos pagavos skerspjūvis.

Norint nustatyti σ_R , braižomas grafikas $\ln \frac{n_0}{n_t} = f(E_D)$.

Dydis σ_R nustatomas iš tiesės polinkio. Jį galima nustatyti ir iš inaktyvacijos priklausomybės nuo švitinimo dozės E_D (5.1 pav.). Kadangi, kai:

$$\frac{n_0}{n_t} = e, \text{ tai } \ln \left(\frac{n_0}{n_t} \right) = 1 \quad (5.2.6)$$

Ir tuomet σ_R nustatomas iš fermento inaktyvacijos kreivės pagal formulę:

$$\sigma_R = \frac{1}{E_{D(37\%)}} \quad (5.2.7)$$

kur $E_{D(37\%)}$ – švitinimo dozė, kuria apšvitinus tirpalą, jame liko 37% aktyvių (neinaktyvuotų) molekulių (kitai tariant, aktyvių molekulių koncentracija tirpale sumažėjo e kartų).

Kai tirpalo optinis tankis yra didelis, tirpalas heterogeninis ir tirpalo optinis tankis švitinant nesikeičia – lygtis (5.2.3) tampa sudėtingesnė:

$$-\frac{dn}{dt} = I_0 \Phi (1-T) \frac{A_A}{A}, \quad (5.2.8)$$

kur A_A – medžiagos, dalyvaujančios fotocheminėje reakcijoje, optinis tankis.

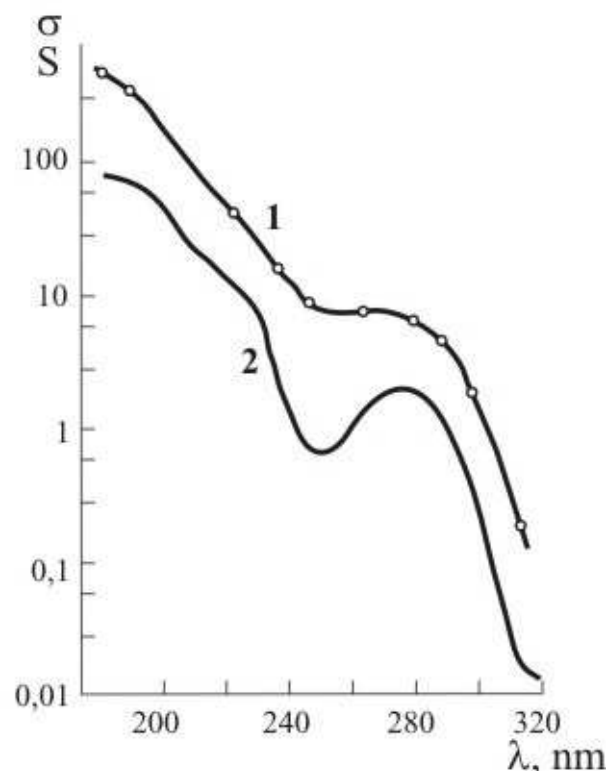
Vietoj A_A į lygtį įstačius $\frac{\sigma_A n_A l}{\ln 10}$ (žr. (1.5.8) išraišką), atskyrus kintamuosius ir suintegravus, gaunamas sąryšis:

$$\ln \frac{n_0}{n} = I_0 t \sigma_A \Phi \frac{l(1-T)}{\ln 10 \cdot A} = E_D \sigma_R k_e, \quad (5.2.9)$$

kur k_e – dydis, įskaitantis fotolizuojamos medžiagos ekranavimą.

Išmatavę tirpalo optinį tankį A ties tam tikru bangos ilgiu, apskaičiuojame ekranavimo konstantą k_e , ir pagal (5.2.9) sąryšį apskaičiuojame σ_R .

Fotochemijoje *veikimo spektru* vadinama σ_R priklausomybė nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio (5.2 pav.). Fotocheminės reakcijos kvantinis našumas Φ , kaip ir

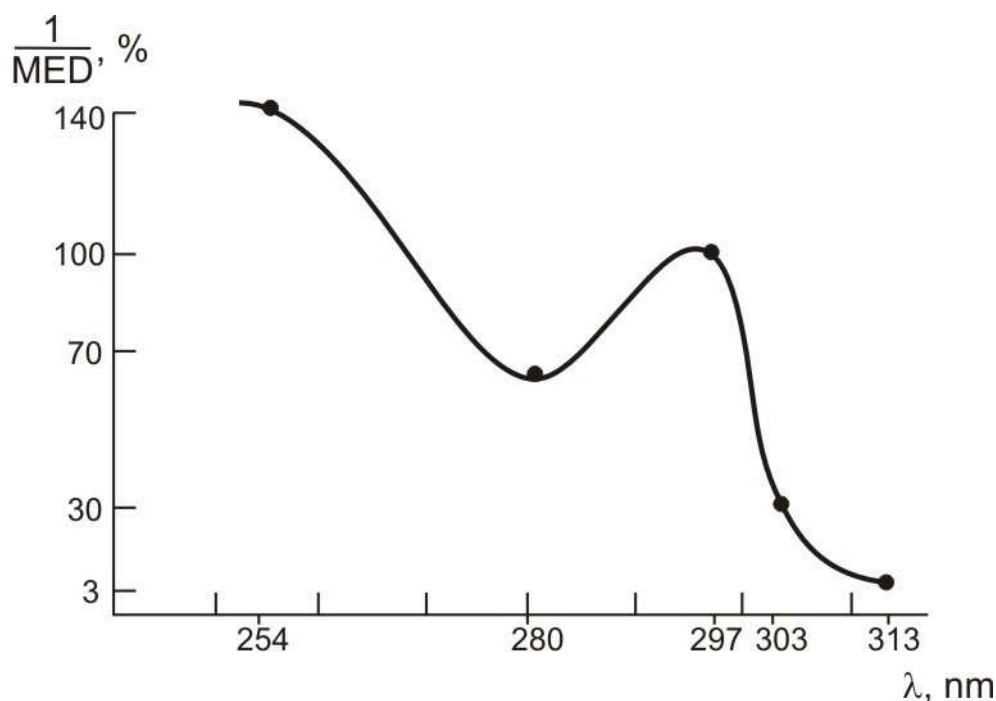


5.2 pav. Fermento tripsino inaktyvacijos veikimo spektras (1) ir tripsino sugerties spektras (2).

liuminescencijos kvantinis našumas, nepriklauso nuo sugėtų fotonų energijos (žadinančios šviesos bangos ilgio), (žr. (5.1.3) išraišką), o $\sigma_R = \sigma_A \cdot \Phi$, tad išmatuoto fotocheminės reakcijos

veikimo spektro $\sigma_R(\lambda)$ forma atitinka tos pačios medžiagos sugerties spektrą $\sigma_A(\lambda)$. Taigi, tokiu būdu galima nustatyti fotoprocese dalyvaujančios medžiagos sugerties spektrą.

Taikomuoju pavyzdžiu galėtų būti paprastas atvejis – baltymų fotoinaktyvacijos spektrų nustatymas. Eksperimentiškai nustatyta, kad tripsino fotoinaktyvacijos spektras atitinka jo sugerties spektrą (5.2 pav.). Tripsine yra trys pagrindiniai chromoforai – triptofano, tirozino ir cistino liekanos, kurios ir nulemia tripsino sugerties spektrą. Kaip matyti iš fotocheminio veikimo spektro, baltymo inaktyvacijos vyksmui daro įtaką visų trijų amino rūgščių liekanų sugertis, be to, eksperimentinis fotocheminio veikimo spektras savo forma panašus į modelinį spektrą, gaunamą sudėjus šių trijų amino rūgščių spektrus.



5.3 pav. Žmogaus odos eritemos veikimo spektras.

Eksperimentiškai nustatyta, kad bakterijų žuvimui būdingas veikimo spektras taip pat yra šioje srityje (sugerties maksimumas ties 260 nm). Šio spektro forma panaši į nukleorūgščių sugerties spektro formą. Tai rodo, kad bakterijų žuvinimas, jas apšvietus ultravioletine (UV) šviesa, yra susijęs su nukleorūgščių pažaidomis.

Sudėtingų fotobiologinių procesų atveju, kai galutinį atsaką formuoja turi ne tik fotocheminiai procesai, bet ir tamsinės reakcijos, lygtis (5.2.5) gali negalėti, todėl pagal ją nustatyti fotocheminio veikimo spektro negalima. Tokiu atveju ant Y ašies dažniausiai yra atidedamas šviesos efektyvumas Σ (dydis, atvirkščias dozei E_{Def} , sukeliančiai tokio paties stiprio fotobiologinį atsaką, šviečiant skirtingo bangos ilgio šviesa).

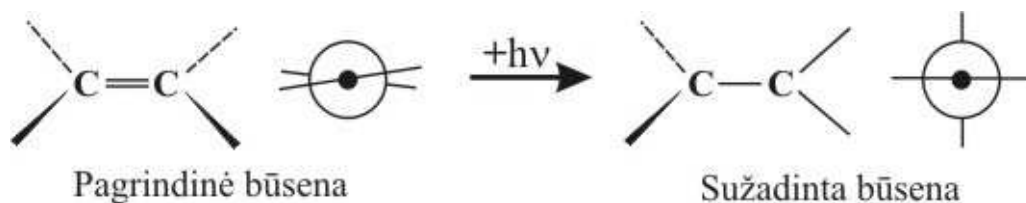
$$\Sigma = \frac{1}{E_{Def}} \quad (5.2.10)$$

Kaip tik toks atvejis yra pavaizduotas 5.3 paveiksle. Ant Y ašies atidėtas santykinis dydis $1/MED$. MED – minimali eritemos dozė, t.y. tokia spinduliavimo dozė, kurios poveikyje atsiranda eritema (odos paraudimas). Panašūs dydžiai yra naudojami žmogaus odos įdegio, fototropizmo, augalų fototaksio, akies jautrumo ir kt. fotocheminio veikimo spektrams nustatyti.

5.3. Sužadintos būsenos molekulių savybių pokyčiai

Molekulių, esančių pagrindinėje būsenoje, ir sužadintų molekulių savybės skiriasi daugeliu parametru:

1) Daugelio organinių molekulių sugerties spektrai yra sąlygoti jų erdvinės struktūros. Molekulių erdvinė struktūra sužadintoje būsenoje gali keistis. Nesužadintoje būsenoje atskirų molekulių dalių sukimasis apie dvigubą jungtį negalimas, todėl nesužadintos būsenos molekulės išlaiko plokščią struktūrą (pvz. etenas, 5.4 pav). Tokia molekulė yra plokščia, jos būseną pasižymi energijos minimumu, susidarančiu persiklojant π - π orbitalėms, todėl π - π orbitalės vadinamos rišančiomis.



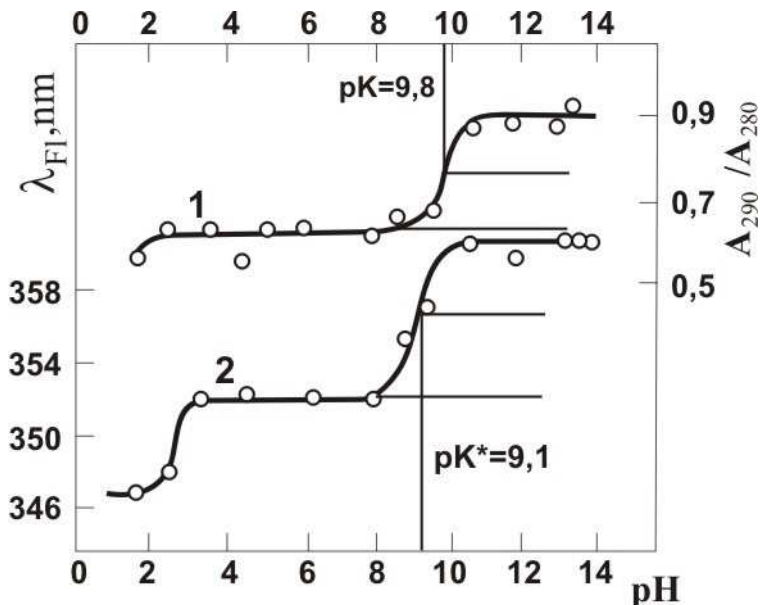
5.4 pav. Eteno molekulės erdvinė struktūra pagrindinėje ir sužadintoje būsenoje.

Molekulei sugeriant šviesos kvantą, remiantis Franko-Kondono principu, ji savo konformacijos pakeisti nespėja, tačiau sužadintos būsenos π^* - π^* orbitalė, kurioje atsiduria elektronas, yra ardančioji, ir jos energijos minimumas atitinka konformaciją, kurioje molekulės galai pasisukę 90° kampu apie σ ryšį (5.4 pav.). Toks molekulės konformacijos pokytis gali būti itin svarbus fotoatsako biologinėje sistemoje susidarymui, pvz., rodopsino ir regos jutimo atveju.

2) Sužadintoje būsenoje keičiasi molekulės dipolinis momentas.

3) Sužadintoje būsenoje keičiasi molekulės oksidacijos – redukcijos potencialas. Disocijavusių ir nedisocijavusių molekulių sugerties ir liuminescencijos spektrai dažniausiai

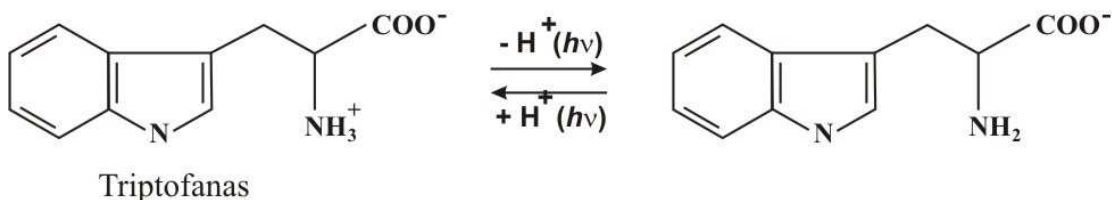
skiriasi. Matuojant sugerties ir liuminescencijos spektrus skirtingo pH terpėse, galima nustatyti molekulių disociacijos kreives. Kadangi molekulės, kurios sugeria šviesą, būna nesužadintoje būsenoje, tai matuojant sugertį nustatoma nesužadintų molekulių disociacijos kreivė. Kvanto išspinduliavimas vyksta iš sužadinto (singuletinio ar tripletinio) lygmens, taigi, naudojant liuminescencinius metodus, registruojama sužadintų molekulių disociacijos



5.5 pav. Triptofano disociacijos kreivės: 1 – pagrindinės būsenos; 2 – sužadintos singuletinės būsenos.

kreivė.

Remiantis eksperimentinių tyrimų duomenimis, šios disociacijos kreivės nesutampa (5.5 pav.) Triptofanui pH ribose 9 – 10 (tokio šarmingumo terpėje vandenilis disocijuoja nuo amino grupės, 5.6 pav.) stebimas aiškus disociacijos vertės (pK) skirtumas, matuojant disociacijos kreives skirtingais būdais – matuojant sugertį (5.5 pav. 1 kreivė) bei matuojant liuminescenciją (5.5 pav. 2 kreivė). pK apskaičiuotas matuojant sugertį lygus 9,8, o pK gautas matuojant liuminescenciją lygus 9,1.



5.6 pav. Vandenilio disociacijos nuo triptofano amino grupės reakcija.

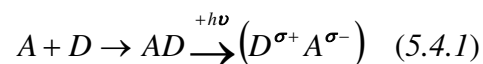
4) Sužadintoje būsenoje keičiasi molekulės donorinės – akceptorinės savybės. Sužadintoje būsenoje atsipalaiduoja vakansija elektronui, tad molekulė tampa elektrono akceptoriumi. Dėl to gali vykti fotoredukcijos reakcija, jeigu molekulės aplinkoje yra

tinkamas elektrono donoras. Tuo pat metu tos pačios molekulės aukštesnėje orbitalėje yra labai aktyvus elektronas. Dėl to molekulė gali tapti elektrono donoru ir aktyviai dalyvauti fotooksidacijos reakcijoje.

5.4. Kompleksai su krūvio pernaša

Tarpmolekuliniai junginiai, kurie susidaro pernešant elektroną nuo elektrono donoro į elektrono akceptorį, vadinami kompleksais su krūvio pernaša. Susidariusiame komplekse šios molekulės sąlytyje gali būti palaikomos elektrostatinės traukos ir daug silpnesnių sąveikų dėka, pvz., van der Valso jėgų, vandenilinių jungčių ir kt.

Elektrono perneša nesužadintoje būsenoje dažniausiai būna nežymi (pvz. 0,3 elektrono, 0,03 elektrono), tačiau sužadintoje būsenoje galimas perėjimas iš donoro S_0 būsenos į akceptoriaus S_1 būseną. Tai atitinka pilną elektrono pernašą iš donoro molekulės į akceptoriaus molekulę:

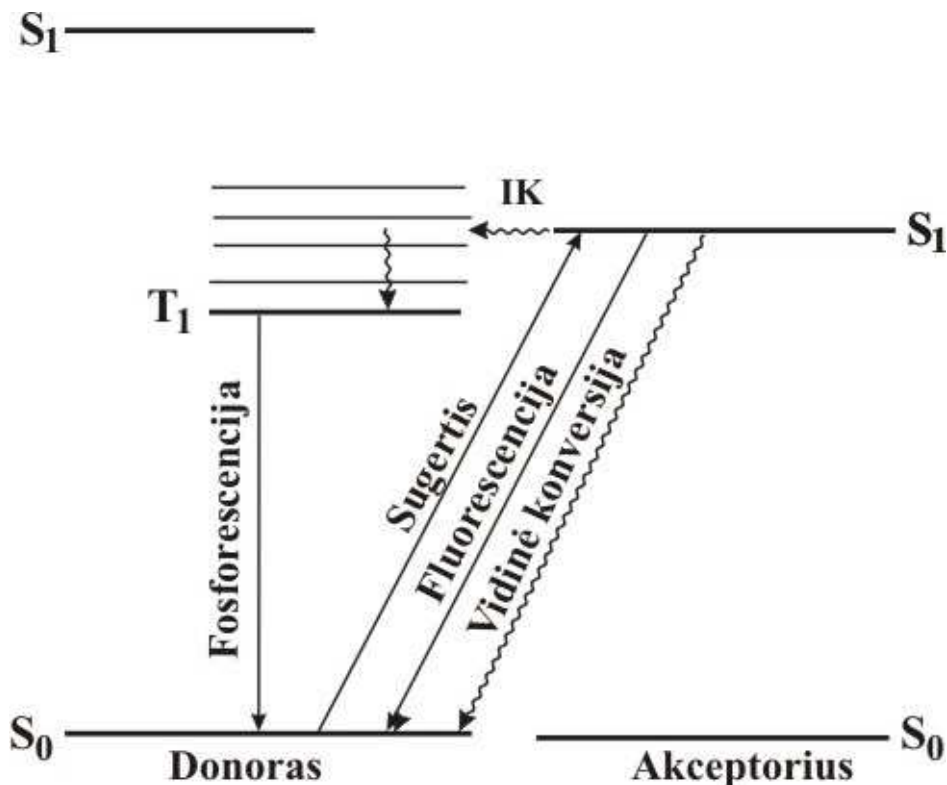


Atliekant spektroskopinius matavimus elektrono pernaša pasireiškia naujos plačios juostos atsiradimu, kurios nėra atskirų komponentų spektruose.

Susidaręs sužadintas kompleksas energiją praranda keliais procesais:

- 1) $S_1^A \rightarrow S_0^D$ – atvirkštinė krūvio pernaša komplekse, nespindulinis ir spindulinis energijos praradimas.
- 2) fotocheminiai virsmai, ;
- 3) Jeigu donoro tripletinis lygmuo yra žemiau už akceptoriaus S_1 lygmenį, gali vykti interkombinacinė konversija ir donoro fosforescencija.

Šiuo metu vyrauja nuomonė, kad kompleksus su krūvio pernaša lengvai sudaro deguonis su įvairiais polimerais (pvz., tokiam polietileno kompleksui su O_2 priskiriama sugerties juosta iki 400 nm), o taip pat aromatiniais junginiais. Dažniausiai tokių kompleksų susidarymo pasekmė yra organinių molekulių fotooksidacija. Akceptoriais kompleksuose dažnai būna chinonai, polinitroaromatiniai junginiai, donorais – aromatiniai angliavandeniliai, junginiai su dieniniu ryšiu.



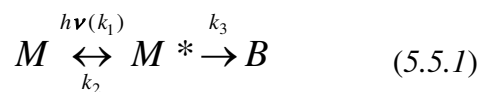
5.7 pav. Elektrono šuolių pernešant energiją schema komplekse.

Donoro - akceptoriaus kompleksai su krūvio pernaša gali susidaryti ir tarp sužadintos ir nesužadintos skirtingų junginių molekulių. Tokie kompleksai vadinami eksipleksais (palyginimui, žr. 4.12 sk.). Eksipleksų susidarymas gali pasireikšti tuo, kad fluorescencijos spektre, esant gesikliams, susiformuoja nauja fluorescencijos juosta, pasislinkusi į ilgujų bangų pusę.

5.5. Pirminių fotoproduktų tyrimo metodai

Pirminiai fotocheminių reakcijų produktai (molekulės sužadintoje būsenoje, laisvi radikalai ir t.t.) labai nestabilūs ir greitai transformuojasi į pradines molekules arba į stabilūs fotoproduktus (naujas molekules). Pirminių fotoproduktų koncentracija daugeliu atveju labai maža, todėl paprastais fiziko-cheminiais metodais šie fotoproduktai praktiškai neaptinkami.

Supaprastinta fotocheminė reakcija gali būti aprašoma tokia schema:



M^* – pirminis labilus fotoproduktas;

k_1, k_2, k_3 – atitinkamų monomolekulinių reakcijų spartos konstantos.

Fotoprodukto kaupimasis tokios reakcijos atveju aprašomas kinetine diferencialine lygtimi:

$$\frac{dM^*}{dt} = k_1[M] - (k_2 + k_3)[M^*] \quad (5.5.2)$$

Pastovaus apšvietimo sąlygomis pirminio fotoprodukto M^* koncentracijos kitimo sparta maža, tad:

$$\frac{dM^*}{dt} \approx 0 \quad (5.5.3)$$

Tuomet, iš (5.5.2) išraiškos įvertinama santykinė fotoprodukto koncentracija:

$$\frac{[M^*]}{[M]} = \frac{k_1}{k_2 + k_3} \quad (5.5.4)$$

Pirminio fotoprodukto $[M^*]$ susidarymo sparta praskiestuose tirpaluose gali būti apskaičiuota pasinaudojus vienpakopės reakcijos kinetine lygtimi (5.2.3):

$$\left(\frac{dM^*}{dt}\right)_R = k_1[M] = I_0\Phi\sigma[M] = I_0\sigma_R[M] \quad (5.5.5)$$

Tuomet (5.5.4) išraiška pastovaus apšvietimo sąlygomis leidžia įvertinti susiformavusio pirminio fotoprodukto kiekį:

$$\frac{[M^*]}{[M]} = \frac{I_0\sigma_R}{k_2 + k_3} \quad (5.5.6)$$

Šis sąryšis atskleidžia, kad susidarančio pirminio fotoprodukto kiekį galima padidinti padidinus fotocheminę reakciją sukeliančios šviesos intensyvumą (I_0) arba sumažinus tamsinių monomolekulinių reakcijų spartas k_2 ir k_3 .

5.5.1. Impulsinė fotolizė

Naudojant šį metodą bandinys apšviečiamas labai intensyvios šviesos blyksniu, tad didelė dalis bandinio molekulių atsiduria sužadintoje būsenoje. Tai sudaro prielaidas susiformuoti didelei pirminių labilių fotoproduktų koncentracijai, kurių spektrines charakteristikas ir stabilumą per trumpą laikotarpį galima išmatuoti atitinkama kinetinės spektrofotometrijos aparatūra. Šiuo metu, panaudojant kinetinės fotolizės eksperimentuose impulsinius lazerius, galima registruoti pirminius fotoproduktus, kurių gyvavimo trukmės yra trumpesnės negu pikosekundės.

Impulsinės fotolizės metodu galima tiesiogiai stebėti molekulių tripletinės būsenos užpildos kitimą kambario temperatūroje. Kadangi triplet-tripletinei sugerčiai elektrono

sukinio pokyčio sąlygojamas draudimas negalioja, ekstinkcijos koeficientas šios sugerties atveju palyginamas su singulet-singuletine sugertimi.

Impulsinė fotolizė plačiai pritaikoma nustatant nestabilių molekulių sugerties koeficientus, matuojant interkombinacinės konversijos kvantinį našumą ir tripletinių lygmenų gyvavimo trukmes bei jų gesinimą įvairiais gesikliais. Naudojantis Šterno-Folmerio lygtimi (žr. (2.11.1) išraišką), galima nustatyti molekulių sąveikos sąlygotas gesinimo konstantas. Taip pat galima spektroskopiškai tyrinėti molekulių laisvuosius radikalus, matuoti jų gyvavimo trukmes įvairiose sąlygose.

5.5.2. Impulsinė radiolizė

Kai kuriais atvejais vietoj impulsinės fotolizės naudojamas impulsinės radiolizės metodas. Šis metodas, kaip ir anksčiau minėtasis, remiasi impulsiniu molekulių sužadinimu, tik šiuo atveju vietoj šviesos impulso naudojamas jonizuojančios spinduliuotės impulsas. Tai gali būti pagreintintų dalelių srautai, rentgeno arba gama spinduliai. Registravimo sistemos abiem atvejais yra tapačios. Tiek impulsinės fotolizės, tiek impulsinės radiolizės matavimų metu, nors ir skirtingais būdais, generuojami panašūs fotoproduktai – singuletinės ir tripletinės molekulių sužadintos būsenos, laisvieji radikalai. Tačiau impulsinės radiolizės metodas turi privalumų tiriant molekulių, kurioms būdingas mažas interkombinacinės konversijos kvantinis našumas, tripletines būsenas, nes impulsinės radiolizės atveju molekulės tripletinių lygmenų užpilda galima ir be singuletinės būsenos sužadinimo.

Didžiąją dalį jonizuojančios spinduliuotės praskiestuose bandiniuose sugeria tirpiklio molekulės. Daugelio molekulių tripletinės būsenos energijos lygmenys yra žemiau, negu tirpiklių tripletinės būsenos, tad praktiškai beveik visada lengvai realizuojama triplet-tripletinė energijos pernaša iš tirpiklio į nagrinėjamą molekulę. Kadangi molekulės tripletinė būsena šiuo atveju užpildoma per tirpiklio tripletinę būseną, tai įgalina tiesiogiai stebėti molekulių tripletinės būsenos užpildos kitimą nenaudojant tripletinių fotosensibilizatorių ir išmatuoti molekulės tripletinės būsenos parametrus netgi tada, kai jos (pvz., karotino) interkombinacinės konversijos kvantinis našumas labai mažas arba lygus nuliui.

Be to, visada reikia turėti omeny, kad radiolizės metu generuojami greiti elektronai bei kitos aktyvios dalelės, kurios taip pat gali turėti įtakos tiriamų molekulių tripletinės būsenos užpildai.

5.5.3. Temperatūrinė stabilizacija

Alternatyvus metodas, įgalinantis tirti pirminių fotoproduktų savybes, yra pagrįstas temperatūrine jų stabilizacija. Netgi labai žema temperatūra neįtakoja pirminių fotocheminių

procesų ir radikalų susidarymo spartos, tačiau stipriai mažina sužadintos molekulės (pirminio fotoproducto) virsmų spartas k_2 ir k_3 (žr. (5.5.1)). Todėl žemoje temperatūroje bandiniuose galima sukaupti pakankamus labilių pirminių fotoproductų kiekius bei išmatuoti jų savybes spektrofotometriniais ir radiospektroskopijos metodais. Pavyzdžiui, 77 K temperatūroje daugelio molekulių triplet-tripletinius sugerties spektrus jau galima išmatuoti klasikinės spektroskopijos metodais nenaudojant impulsinių šaltinių.

Tirpiklio ledinėje matricoje užšaldyti laisvieji radikalai gyvuoja ilgai po švitinimo nutraukimo, tad juos tirti galima spektroskopiniais ar elektrono paramagnetinio rezonanso (EPR) metodais. EPR metodo jautrumas įgalina registruoti 10^{-8} M radikalų koncentraciją, tačiau normaliomis sąlygomis vykstančiose fotobiologinėse reakcijose laisvų radikalų koncentracija būna dar mažesnė, tad EPR spektrai, kaip taisyklė, registruojami žemose temperatūrose, kur susidarančių fotoproductų kiekį galima įvertinti pagal (5.5.6) sąryšį.

Pažymėtina, kad žemoje temperatūroje tripletinių būsenų T_1 užpilda bandinyje gali padidėti tiek, kad tampa galima antro šviesos kvanto sugertis ir šuolis į aukštesnį tripletinį lygmenį. Aukštesniosiose sužadintose būsenose galima molekulių fotojonizacija. Viena vertus, tai papildoma galimybė identifikuoti molekulės pirminius fotocheminius procesus, tačiau, kita vertus, visada reikia turėti omenyje, kad dar vienas papildomas procesas sudaryti keblumų tiksliam pirminių fotoproductų atpažinimui.

5.5.4. Inhibitoriai fotoproductų identifikavime

Paveikus bandinį spinduliuote kartais gali susidaryti didelė įvairovė pirminių fotoproductų su panašiomis spektrinėmis savybėmis. Todėl siekiant juos identifikuoti neretai naudojami inhibitoriai, selektyviai slopinantys įvairias radikalines reakcijas. Gerai žinoma, kad molekulinis deguonis gesina daugelio organinių molekulių tripletines būsenas. Tokiomis pat savybėmis pasižymi ir metalų paramagnetiniai jonai (Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} ir kt.), ir kai kurios molekulės, pvz., β -karotinas. Neparamagnetiniai metalų jonai (pvz., Ca^{2+} , Zn^{2+}) tripletinius molekulių lygmenis gesina žymiai silpniau. Tad panaudojant inhibitorius, galima reguliuoti vienos ar kitos fotocheminės reakcijos našumą, taigi, kryptingai keisti pirminių fotoproductų kiekybinę sudėtį ir taip gauti papildomą informaciją, palengvinančią jų identifikaciją.

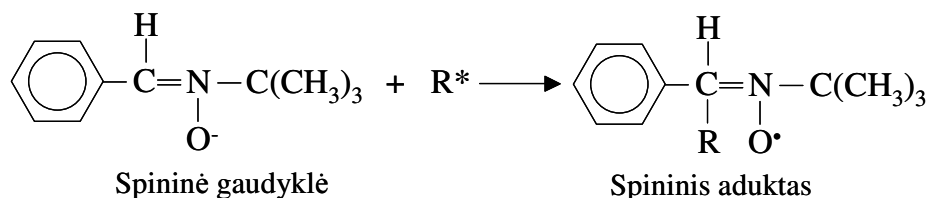
Pirminių radikalų gaudyklių pasiūlyta daug ir įvairių. Šių inhibitorių sąlygotas galutinio fotoproducto formavimosi kvantinio našumo pokytis tampa tiesioginiu įrodymu, kad vienos ar kitos rūšies radikalai iš tikrųjų įtraukti į fotovirsmų eigą. Tokios molekulės, kaip cisteinas, cistinas, KNO_3 , N_2O pasižymi aukštu giminingumu elektronui, todėl efektyviai inhibuoja

reakcijas, kurios sąlygotos solvatuotų elektronų. Šios molekulės sugaudo solvatuotus elektronus, tuo pačiu nutraukdamos tų fotoproduktų, kurie susidaro molekulei sąveikaujant su elektronu, formavimąsi. Kai kurie alkoholiai, pvz., butanolis, aktyviai jungiasi su hidroksiradikalais ($\cdot\text{OH}$).

Fotoreakcijų tyrimai panaudojant inhibitorius itin naudingi sudėtingose biologinėse sistemose, pvz., oda, kiti audiniai ir organai, kuriuose pirminių fotoproduktų aptikimas kitokiais fizikiniais – cheminiais metodais yra itin sudėtingas. Antioksidantams, esantiems audiniuose, pvz., vitaminui E, būdingas mažas jonizacijos potencialas, tad jie lengvai atiduoda savo elektronus laisviems radikalams ir taip inhibuoja jų sukeltą chemines reakcijas.

5.5.5. Spininių gaudyklių metodas

Laisvųjų radikalų tyrimai įprastai atliekami užšaldytuose bandiniuose. Tačiau tirti laisvųjų radikalų savybes fiziologinėse temperatūrose galima panaudojant spininių gaudyklių metodą. Tokie junginiai reaguoja su trumpai gyvuojančiais laisvaisiais radikalais sudarydami stabilius (ilgai gyvuojančius) laisvuosius radikalus (spininius aduktus), kurių spektrus tirpaluose galima išmatuoti EPR metodu. Spininės gaudyklės pavyzdžiu galėtų būti C-fenil-N-tretbutilnitronas:



5.8 pav. C-fenil-N-tretbutilnitrono reakcija su laisvuju radikalų R^*

Šio junginio nitroksidinio radikalo stabilumas aiškinamas steriniais suvaržymais. Deguonies atomas, turintis nesuporuotą elektroną, yra erdviškai ekranuotas nuo terpės trimis metilo grupėmis. Spininio adukto EPR spektro forma priklauso nuo prisijungusio radikalo R tipo. Tokiu būdu, panaudojant EPR, laisvuosius radikalus galima identifikuoti biologinėse terpėse atliekant matavimus joms būdingose fiziologinėse temperatūrose.