



М.Ф. Умаров, В.С. Горелик

Оптическая спектроскопия биоактивных препаратов



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОЛОГОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

М.Ф. Умаров
В.С. Горелик

ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Монография

Вологда
2014

УДК 535.361
ББК 53.54
У 18

Рецензенты:

А.Г. Витухновский, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. отделом
люминесценции им.С.И. Вавилова Физического института
им. П.Н.Лебедева АН РФ

В.А. Горбунов, д-р физ.-мат. наук, профессор,
зав. кафедрой информационных систем и технологий
Вологодского государственного университета

Умаров, М.Ф.

У18 **Оптическая спектроскопия биоактивных препаратов:** монография
/ М.Ф. Умаров, В.С. Горелик. – Вологда: ВоГУ, 2014. – 147 с.

ISBN 978-5-87851-550-4

В монографии представлены результаты исследования состава фармацевтических препаратов, изложен ряд экспериментальных и теоретических результатов, направленных на углубленное изучение дисциплин «Биофизика», «Технология спектрального анализа в медицине», «Биофизические основы живых систем», «Методы обработки биомедицинских сигналов и данных» и т.п.

Практический интерес представляет контроль хиральной чистоты биоактивных препаратов на основе предложенных методик оптической спектроскопии.

Издание может быть полезно научным сотрудникам, преподавателям, аспирантам и студентам, обучающимся по направлению бакалавриата 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии» и профиля подготовки «Инженерное дело в медико-биологической практике».

УДК 535.361
ББК 53.54

ISBN 978-5-87851-550-4

© ВоГУ, 2014
© Умаров М.Ф., 2014
© Горелик В.С., 2014

ВВЕДЕНИЕ

Жизнедеятельность организма обеспечивается двумя процессами – ассимиляцией и диссимиляцией, в основе которых лежит обмен веществ между внутренней (клетками организма) и внешней средой. Для нормального течения обменных процессов необходимо поддерживать постоянство химического состава и физико-химических свойств внутренней среды организма. Такое постоянство зависит от ряда факторов, среди которых важное место занимают биологически активные вещества, поступающие с пищей (витамины, ферменты, минеральные соли, микроэлементы и др.) и осуществляющие взаимосвязь всех физиологических и биохимических процессов в организме. Нормализуя и регулируя все жизненные функции, биологически активные вещества оказывают также эффективное лечебное действие.

Биологически активные препараты – это химические вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности живых организмов, обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях. Концентрат этих веществ называется биологически активной добавкой или БАД. Они производятся различными методами: химическими и биотехнологическими.

Биоактивные препараты включают в себя большой класс веществ, оказывающих сильное воздействие на молекулярном уровне на биологические структуры и живые организмы. К ним относятся, в частности, различные фармацевтические препараты, стимуляторы процессов жизнедеятельности, аминокислоты, токсические вещества и др. Для эффективного использования биоактивных препаратов необходимо обеспечение соответствия их молекулярной структуры и состава номинальным препаратам, воздействие которых на биологические структуры и живые организмы надёжно установлено.

Важным компонентом биологических объектов являются полинуклеотиды, входящие в состав ДНК и РНК. Основная функция этих молекул состоит в хранении и передаче информации, необходимой для существования и воспроизведения биологического объекта. Поэтому всякая модификация структуры полинуклеотида оказывает огромное влияние на жизнедеятельность.

Не менее важную роль в процессах жизнедеятельности занимает аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ). Эти соединения играют исключительно важную роль в обмене энергии и веществ в организме. Основная роль АТФ в организме связана с обеспечением энергией многочисленных биохимических реакций.

Природные (нативные) объекты, включая растения, микроорганизмы и пищевые продукты, характеризуются определенной молекулярной структурой.

рой, задаваемой генетической системой организма клеток. При модификации структуры ДНК и соответствующих генов изменяется также и исходная генетическая информация. Модификация микроструктуры биологических объектов может происходить под влиянием различных факторов: процессов технологической обработки пищевых продуктов, влияния электромагнитного облучения, в результате химических процессов замещения атомов, в результате механического смешивания и загрязнения.

Как отмечалось выше, ДНК и РНК, входящие в состав биологических объектов, хранят важную генетическую информацию, необходимую для жизнедеятельности организмов. Строение и состав этих кислот отражаются, в частности, в их спектрах фотолюминесценции, а также в спектрах фотолюминесценции простейших микроорганизмов. Как известно, квантовый выход фотолюминесценции нуклеиновых оснований, ДНК и РНК на несколько порядков меньше соответствующего квантового выхода фотолюминесценции триптофана. Поэтому сведения о спектрах фотолюминесценции нуклеиновых оснований, ДНК и РНК при комнатной температуре практически отсутствуют. Таким образом, проблема исследования спектров фотолюминесценции нуклеиновых оснований, ДНК и РНК является весьма актуальной.

В связи с этим возникает задача установления на количественном уровне степени соответствия молекулярной структуры и состава реальных веществ, используемых в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и других областях, номинальным биоактивным препаратам, характеристики которых известны и введены в базу данных. Для решения такой задачи могут быть использованы спектроскопические методы, включая флуоресцентную спектроскопию, метод комбинационного рассеяния света, нелинейно-оптическую спектроскопию и т.д. Для однозначного ответа на вопрос о степени соответствия молекулярной структуры и состава анализируемого реального объекта номиналу, характеристики которого присутствуют в базе данных, необходимо провести на количественном уровне сравнение спектров анализируемого и номинального объекта.

В данной работе сообщается о современных методах спектрального анализа и приводятся сведения об особенностях спектров фотолюминесценции и комбинационного рассеяния света различных типов биологически активных препаратов.

I. ТИПЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

1.1. Фармацевтические препараты

Фармацевтическая промышленность на сегодняшний день является одной из старейших, востребованных и рентабельных отраслей промышленности. Несмотря на большое вложение средств в эту промышленность, процент брака в ней достаточно высок: в несколько раз выше, чем в микроэлектронике. Выпускаемые фармацевтические препараты необходимы для обеспечения здоровья человека. В настоящее время появились дополнительные проблемы, связанные с оборотом лекарств. Особенно остро встал вопрос фальсификации - подделке лекарственных препаратов, что, в свою очередь, ужесточает требования к фармакопейному анализу. Поэтому к качеству выпускаемой продукции предъявляются все более высокие требования. Фармакопейный анализ лекарственных средств включает в себя оценку качества по множеству показателей. В частности, устанавливается подлинность лекарственного средства – проводится его идентификация, анализируется чистота – оценивается содержание различных органических и неорганических примесей и проводится количественное определение – устанавливается содержание действующего вещества. Первоначально для проведения такого анализа применялись исключительно химические методы: реакции подлинности, реакции на содержание примесей, титрование и др. В настоящее время интенсивно развиваются новые технологии, основанные на использовании спектральных методов, включая инфракрасную спектроскопию, лазерную спектроскопию комбинационного рассеяния, фотолуминесцентную спектроскопию и другие методы.

Фармацевтические препараты включают в себя большой класс веществ, оказывающих сильное воздействие на молекулярном уровне на биологические структуры и живые организмы. К ним относятся, в частности, различные коммерческие фармацевтические препараты, в структурах которых присутствуют ароматические кольца, приводящие к фундаментальному электронному поглощению в среднем ультрафиолетовом диапазоне. Соответственно в этих веществах наблюдается флуоресценция в фиолетово-красном диапазоне при возбуждении коротковолновым электромагнитным излучением. В качестве примера рассмотрим четыре таких препарата: анальгин, аспирин, цитрамон и парацетамол.

Анальгин

Анальгин (метамизол натрия– Metamizol natrii) имеет химическую формулу – $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$. Этот препарат является лекарственным средством (анальгетиком и антипиретиком) из группы пиразолонов. Существует в виде белого или жёлтого микрокристаллического порошка. Растворим в воде и этаноле, но нерастворим в эфире, бензоле, ацетоне и хлороформе. Анальгин обладает болеутоляющим, противовоспалительным, жаропонижающим и ревматоидным действием. На рис. 1.1. приведена структурная формула анальгина.



*Рис. 1.1. Структурная формула ароматического соединения
анальгина*

Аспирин

Аспирин (ацетилсалициловая кислота, салициловый эфир уксусной кислоты, Acidum acetylsalicylicum) имеет химическую формулу – $C_9H_8O_4$. Аспирин является лекарственным средством, оказывающим анальгезирующее (обезболивающее), жаропонижающее, противовоспалительное и антиагрегантное действие. Структурная формула аспирина приведена на рис. 1.2. Аспирин имеет вид белых игольчатых кристаллов или кристаллического порошка, малорастворимого в воде при комнатной температуре. Его растворимость повышается при нагревании воды; аспирин легко растворим в этиловом спирте. Ацетилсалициловая кислота широко известна под торговой маркой «Аспирин» фирмы «Байер».

Механизм действия и профиль безопасности ацетилсалициловой кислоты хорошо изучены, её эффективность клинически апробирована. Аспирин входит в список важнейших лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения [1,2].

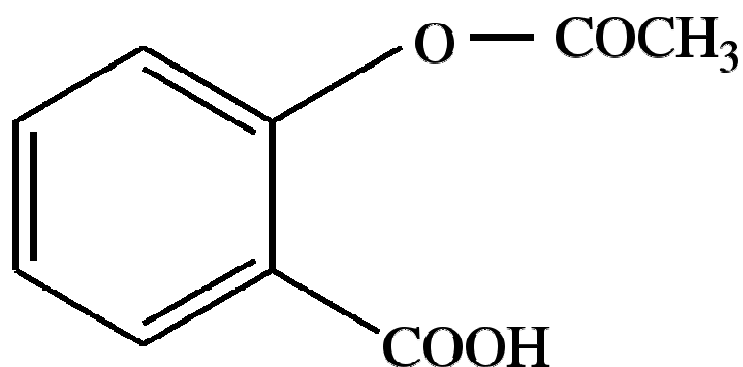


Рис. 1.2. Структурная формула аспирина

Цитрамон-П

Цитрамон-П (Citramonum P) состоит из нескольких компонентов, имеющих следующие химические формулы: $C_9H_8O_4$; $C_8H_{10}N_4O_2$; $C_{10}H_{13}NO_2$. Структурные формулы этих компонентов приведены на рис. 1.3.

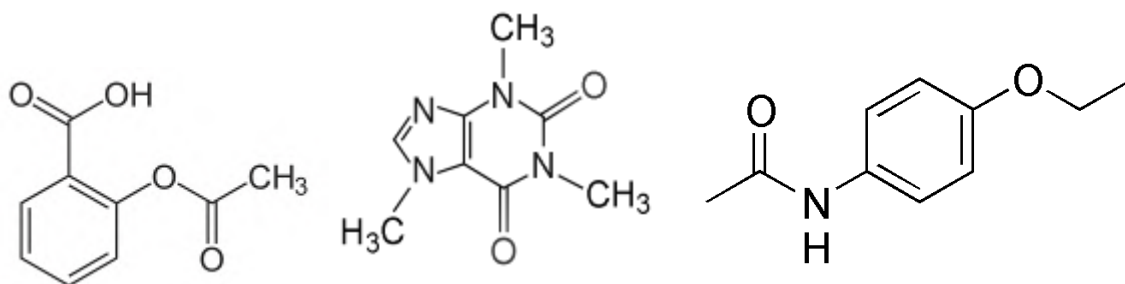


Рис. 1.3. Структурная формула цитрамона-П

Цитрамон-П принадлежит к анальгетическим средствам и не имеет наркотических свойств. Цитрамон-П выпускают в виде таблеток светло-коричневого цвета; в одной таблетке содержится: ацетилсалициловая кислота (0,24г.), парацетамол (0,18г.), кофеин (0,03г.), аскорбиновая кислота (0,006г.).

Кроме перечисленных выше веществ, в состав цитрамона-П входят также наполнители: крахмал картофельный, кальция стеарат, повидон низкомолекулярный медицинский. Наполнители не имеют никакого фармакологического действия, увеличивая лишь массу таблетки до установленного стандартом 1 грамма.

Парацетамол

Парацетамол (N-(4-Гидроксифенил) ацетамид, Paracetamolum) имеет химическую формулу – $C_8H_9NO_2$. Структурная формула парацетамола приведена на рис. 1.4.

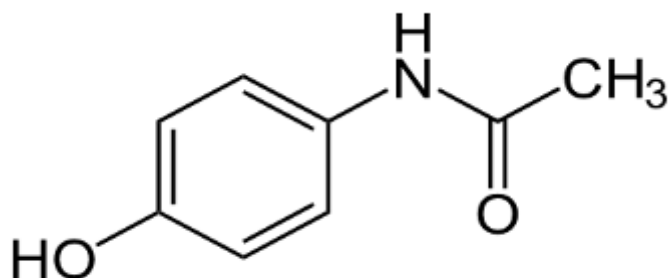


Рис. 1.4. Структурная формула парацетамола

Парацетамол – это лекарственное средство (анальгетик и антипиретик) из группы анилидов. Он оказывает обезболивающее и жаропонижающее действие. Существует в виде белого или белого с кремовым или розовым оттенками кристаллического порошка. Легко растворим в спирте и нерастворим в воде. Является широко распространённым ненаркотическим анальгетиком и обладает довольно слабыми противовоспалительными свойствами. Парацетамол может служить причиной нарушений работы печени, кровеносной системы и почек. Механизм действия и профиль безопасности парацетамола хорошо изучены; его эффективность клинически апробирована. В связи с этим данный препарат входит в список важнейших лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, а также в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, утверждённый распоряжением Правительства Российской Федерации от 07.12.2011 № 2199-р [2].

1.2. Аминокислоты

Спектры фотолюминесценции аминокислот дают важную информацию о микроструктуре белков и более сложных структур, содержащих аминокислоты. Среди 20 аминокислот, входящих в состав белков живых организмов, наиболее эффективными люминофорами являются ароматические аминокислоты: фенилаланин, тирозин и триптофан. Наибольший квантовый выход фотолюминесценции осуществляется для триптофана. В связи с этим изучение спектра фотолюминесценции триптофана представляется важной задачей, связанной с установлением процессов переноса энергии в белках и сложных

биологических объектах. Решение этой задачи к настоящему времени проводилось многими исследователями [3-8].

Аминокислоты входят в состав белков. Каждый белок характеризуется строго определенным аминокислотным составом. В зависимости от положения аминогруппы по отношению к карбоксилу различают α -, β - и γ -аминокислоты. Все протеиногенные аминокислоты являются α -аминокислотами. Они представляют собой бесцветные кристаллические вещества. Большинство из них растворимо в воде. В водных растворах аминокислоты находятся в виде амфотерных ионов (цвиттер-ионов). Так как во всех α -аминокислотах (кроме глицина) имеется асимметричный α -углеродный атом, то такие аминокислоты являются энантиоморфными, то есть могут существовать в виде левой (L), правой (D) или рацемической (DL) формах. Все естественные протеиногенные аминокислоты имеют L-конформацию. Аминокислоты D-конформации, как правило, живыми клетками не усваиваются. Продуктом химической реакции без участия какого-либо асимметричного агента, реагирующего на зеркальную асимметрию молекулы, является рацемическая фаза (DL- конформация) или смесь в равных концентрациях D- и L-конформаций. Присутствие в организме рацематов приводит к нарушению процессов жизнедеятельности.

Другая возможность модификации структуры белков состоит в замещении атомов водорода близкими по размеру атомами активного электроотрицательного фтора. Аминокислотные остатки, содержащие атом фтора, могут войти в состав белковой цепочки. При этом биологические функции, необходимые для жизнедеятельности биологического объекта, могут быть заблокированы или существенным образом видоизменены. Причиной фторирования естественных белков могут быть фторсодержащие соединения, попадающие в биологический объект из окружающей среды, из фторсодержащих гербицидов, инсектицидов и лекарственных препаратов.

При кристаллизации аминокислот возможно существование трех кристаллических фазовых модификаций: L- (левой хирально чистой фазы), D- (правой хирально чистой фазы) и DL- (рацемической фазы, содержащей как L-, так и D- молекулы аминокислот). Исследования спектров люминесценции триптофана до настоящего времени проводились в основном без учета энантиоморфной конформации этой молекулы. Хотя химическая формула для всех трех упомянутых модификаций триптофана одинакова, представляет интерес исследовать особенности спектров как хирально чистых фаз триптофана, так и соответствующего рацемата.

Структурные формулы 20 аминокислот, входящих в состав белков, приведены на рис. 1.5.

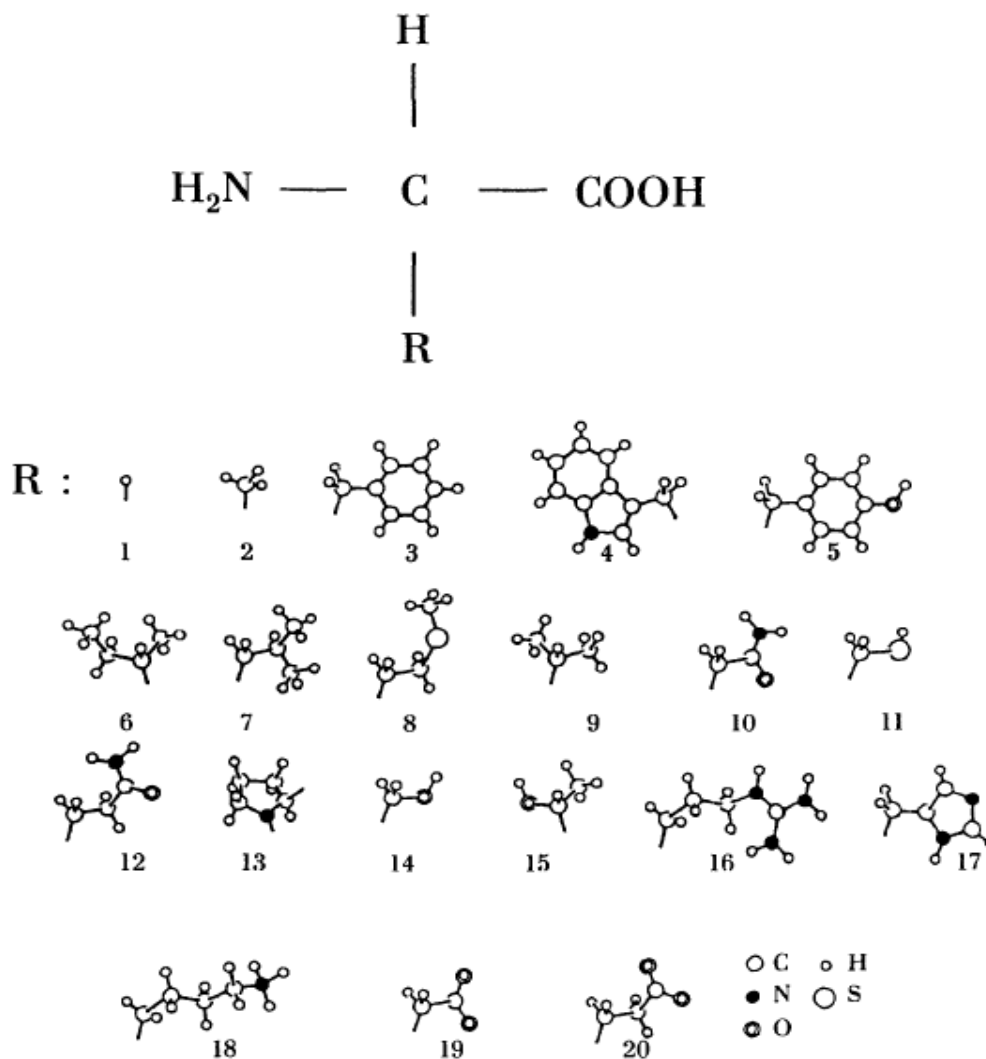


Рис. 1.5. Структура молекул аминокислот:
 1) глицин (gly), 2) аланин(ala), 3) фенилаланин (phe),
 4) триптофан (trp), 5) тирозин (tyr), 6) изолейцин (ile),
 7) лейцин (leu), 8) метионин (met), 9) валин (val),
 10) аспарагин (asn), 11) цистеин(cys), 12) глутамин(gln),
 13) пролин(pro), 14) серин (ser), 15) треонин (thr), 16) аргинин (arg),
 17) гистидин(his), 18) лизин(lys), 19) аспарагиновая кислота (asp),
 20) глутаминовая кислота (glu) [8]

Каждая молекула аминокислоты состоит из атома углерода, соединенного с атомом водорода, амидной группой, карбоксильной группой и аминокислотным остатком R. В случае простейшей аминокислоты – глицина – R=H. Все аминокислоты (кроме глицина) могут существовать в виде хирально чистых фаз (L или D энантиомеров). При механическом смешивании зеркально-симметричных энантиомеров аминокислот формируется рацемическая смесь.

Кроме того, возможно формирование «истинного рацемата» при молекулярном соединении L и D энантиомеров. Истинный рацемат (DL) может существовать в твердотельном состоянии. В нашей работе в качестве объекта исследования были выбраны твердотельные фазы хирально чистых (L и D) энантиомеров триптофана (см. рис. 1.6) и твердотельная фаза истинного рацемата (DL) триптофана. Молекулярная масса триптофана ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) в а.е.м.: 204,22. В таблице 1.1 приведены физико-химические характеристики триптофана.

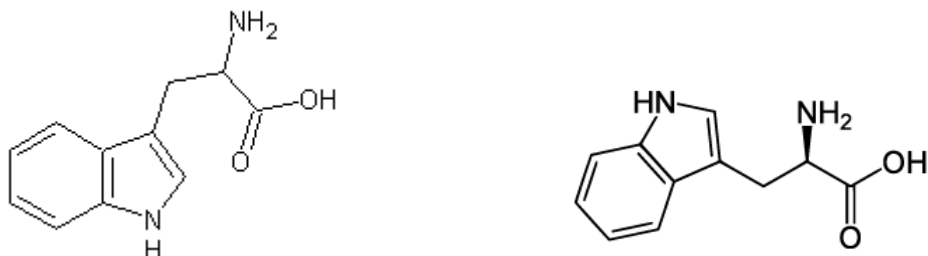


Рис. 1.6. Энантиоморфные молекулы L- (слева) и D-триптофана ($C_{11}H_{12}N_2O_2$).

Таблица 1.1

Физико-химические характеристики ароматических аминокислот [9-13]

Название вещества	Температура плавления	Растворимость (в г/100г растворителя)	Вкус	Удельное вращение для D-линии натрия для 25см водного раствора: 0,5г/100г, при 20°C	Показатель диссоциации	Описание спектра
L-триптофан	293°C	вода: 1,14 (25°C); вода: 2,79 (75°C); диэтиловый эфир: нерастворим; хлороформ: нерастворим; этанол: мало растворим (20°C); этанол: растворим (78°C); растворим в щелочах	горький	-31,5°	pK_a (COOH) = 2,38 (25°C, вода); pK_a (NH ₂) = 9,39 (25°C, вода)	В спектре флуоресценции λ испускания 348 нм; в спектре поглощения λ_{max} = 279,8 нм; $\epsilon_{279,8} = 5,6 \times 10^3$

Окончание табл. 1.1

D-триптофан	281°C		сладость -25-50 по отношению к 2% раствору сахарозы	+32,9°		
DL-триптофан	283°C					
Фенилаланин	283°C	Растворимость в воде, гр/100мл, при 20°C:	D-фенилаланин имеет сладкий вкус, L-фенилаланин - слегка горьковатый			
Тирозин	343°C	растворим в воде, ограниченно – в этаноле, не растворим в диэтиловом эфире	Сладкий вкус			

1.3. Белки

Белки (протеины) – это высокомолекулярные природные органические вещества, построенные из аминокислот и играющие фундаментальную роль в структуре и жизнедеятельности организмов. Именно белки осуществляют обмен веществ и энергетические превращения, неразрывно связанные с активными биологическими функциями. Белки входят в состав сложных клеточных структур – органелл. Органеллы содержат также другие вещества: липиды, углеводы, нуклеиновые основания, неорганические компоненты. Белки играют важную роль в выполнении физиологических функций. Например, благодаря соответствующей организации различного рода белков биологические мембраны, покрывающие клетки, активно (с затратой энергии) переносят в клетку или из клетки определённые молекулы и ионы. В частности, транспорт катионов создаёт электрическую поляризацию, необходимую для процессов возбуждения физиологических процессов. В двигательных аппаратах (мышечных волокнах) комплексы специфических белков осуществляют сокращение, превращая химическую энергию в механическую работу. Деятельность белков во многом связана с разными небелковыми веществами, из которых

наибольшее биологическое значение имеют нуклеиновые кислоты. Однако решающим фактором молекулярных механизмов всех активных проявлений жизнедеятельности являются белки.

Молекулы белков имеют массу от десятков тыс. до 1 млн. дальтон и выше. Так, фермент рибонуклеаза имеет молекулярную массу 12700, дыхательный пигмент улитки гемоцианин – 6 600 000. Элементарный состав большинства белков: 50,6 – 54,5% углерода, 6,5 – 7,3% водорода, 21,5 – 23,5% кислорода, 15 – 17,6% азота, 0,3 – 2,5% серы; в состав ряда белков входит и фосфор. Сведения о молекулярной массе молекул белков можно получить, исследуя их осаждение (седиментацию) в ультрацентрифуге. Все белки с очень большой молекулярной массой построены из более мелких частиц – субъединиц. Растворимые в воде белки (гидрофильные коллоиды, активно связывающие воду) обладают значительной вязкостью и низким осмотическим давлением. Молекулы белков не проходят через полупроницаемые мембраны и обладают слабой способностью к диффузии.

Белки – амфотерные электролиты, так как имеют свободные карбоксильные (кислотные) и аминные (основные) группы. Белки имеют электрический заряд, изменяющийся в зависимости от их структуры и реакции среды. В электрическом поле растворённые белки движутся (электрофорез). При этом направление и скорость движения неодинаковы для различных белков. Существенные различия в растворимости и других свойствах белков используются при выделении индивидуальных белков из тех сложных систем, в которых они встречаются в природе. После очистки многие белки способны кристаллизоваться [14].

Белок всех организмов состоит из 20 видов аминокислот. Каждый белок характеризуется определённым ассортиментом и количественным соотношением аминокислот. В молекулах белков аминокислоты соединены между собой пептидными связями ($-\text{CO}-\text{NH}-$) в линейной последовательности (рис.1.7), составляющей так называемую первичную структуру белка [15].

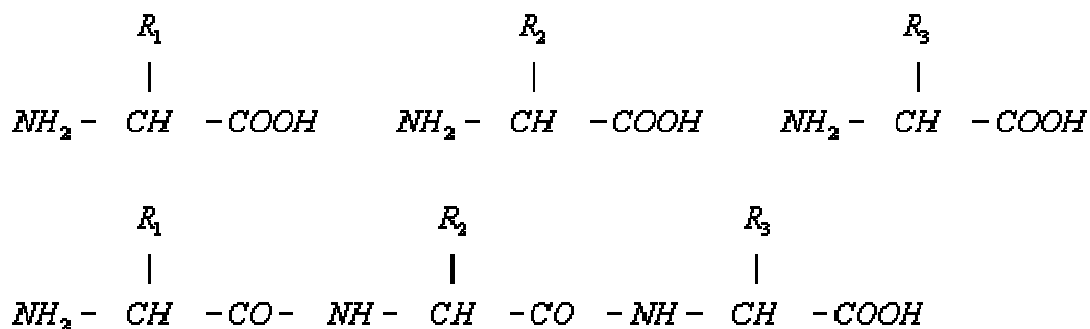
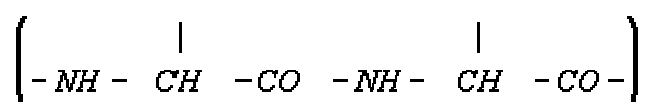


Рис.1.7. Пептидные связи в линейной последовательности белка

Аминокислотные (полипептидные) цепи, содержащие аминокислоту цистин, в местах его расположения скреплены дисульфидными связями (–S–S–). Между аминокислотами в белках, как правило, не существует иных химических связей, кроме пептидных и дисульфидных. Для каждого белка не только состав, но и последовательность аминокислот в полипептидной цепи (первичная структура) строго индивидуальны. Все многочисленные виды белков, существующих в природе, различаются по первичной структуре. Индивидуальная первичная структура каждого белка сохраняется в поколениях благодаря точной передаче соответствующей наследственной информации. Для анализа первичной структуры белка разработаны специальные методы.

Кроме пептидных и дисульфидных связей, в молекуле белка есть многочисленные связи с меньшей энергией взаимодействия, имеющие большое значение для внутренней организации и функции белка. Среди этих связей наиболее существенны так называемые гидрофобные связи, создаваемые неполярными боковыми группами аминокислот. Эти группы имеют тенденцию контактировать между собой внутри молекулы белка. Кроме того, в молекуле белка присутствуют водородные связи, образуемые полярными группами, например –CO–NH–, и проявляются электростатические взаимодействия между группами, несущими электрические заряды.

Пространственная конфигурация (конформация) полипептидной цепи белка определяется его первичной структурой и условиями среды. При обычных условиях (температура не выше 40°C, нормальное давление и т.д.) белки характеризуются внутримолекулярной упорядоченностью. "Хребет" полипептидной цепи



местами может закручиваться спиралью или образовывать полностью вытянутые отрезки (вторичная структура). В обоих случаях возникает система водородных связей. В значительной части "хребта" геометрическая регулярность может отсутствовать. Полипептидная цепь в целом "упаковывается" и жестко фиксируется с помощью взаимодействий боковых групп аминокислот (третья структура). В зависимости от укладки полипептидных цепей форма молекул белка варьируется от фибриллярной (вытянутой, нитеобразной) до глобулярной (округлой). Детальная конфигурация глобулярных молекул сложна и своеобразна для каждого белка. В молекуле белка превалирует совершенная упорядоченность, распространяющаяся на положение отдельных

атомов. Однако некоторые периферические участки могут быть закреплены менее жестко, а погруженные в растворитель гидрофильные боковые группы остаются достаточно гибкими. Конформация некоторых белков, например лизоцима (рис.1.8), установлена в результате рентгеноструктурных исследований [16].

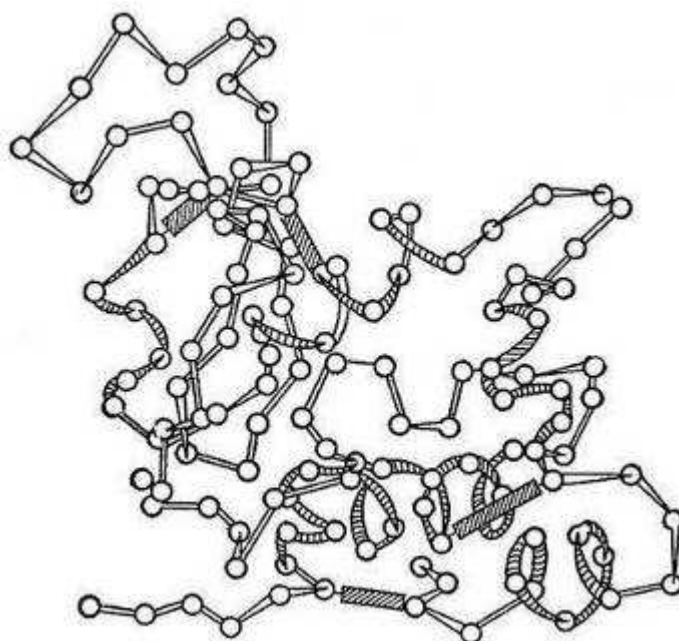


Рис.1.8. Трёхмерная структура фермента лизоцима [16]

Создание упорядоченной прочной конформации белка определяется целыми системами взаимодействий, находящихся во взаимной зависимости. Смены конформации белка, вызываемые изменениями среды или реакциями, в которые белки вступают, связаны с изменением ряда взаимодействий. Конформационные переходы охватывают молекулу белка целиком или ограничиваются определёнными районами. При нагревании, резком подкислении среды и других сильных воздействиях происходит "плавление" молекулы белка, т.е. переход в состояние беспорядочного клубка. Это, как правило, влечёт за собой ряд других превращений, общий результат которых обозначают как денатурацию белка. При этом понижается растворимость белка, усиливается вязкость их растворов, теряются ферментативные и другие биологические свойства.

Изучение структуры белков даёт возможность переходить к их синтезу. В 1955 году была выяснена структура инсулина, молекула которого состоит из двух сравнительно коротких полипептидных цепей (21 и 30 аминокислотных остатков) (рис.1.9). Как видно из данного рисунка, действительно А-цепь инсулина включает 21 аминокислоту, В-цепь – 30; цепи соединены двумя ди-

сульфидными «мостиками». Зрелый инсулин образуется в результате двухступенчатой посттрансляционной модификации препроинсулина (препоследовательность) и затем проинсулина (пропоследовательность). Недостаток инсулина (в частности, врожденный) ведет к диабету (повышению содержания сахара в крови). Инсулин открыт Ф.Бантингом и Ч.Бестом в 1922 году, а его первичная структура (впервые для белков вообще) установлена Ф.Сэнджером в 1956 году. Инсулин – первый поступивший на рынок (1982) препарат, синтезированный с использованием методов генной инженерии. Ген, кодирующий инсулин у человека, сцеплен с хромосомой. Во многих лабораториях осуществлен, кроме того, химический синтез инсулина. Наиболее близким по своей структуре к инсулину человека является инсулин свиньи, у которого в цепи В (рис.1.9) вместо треонина в положении 30 содержится аланин. Существенных различий в аминокислотной последовательности в инсулине от разных животных нет. Инсулины различаются аминокислотным составом цепи А (рис.1.9) в положениях 8–10 [17].

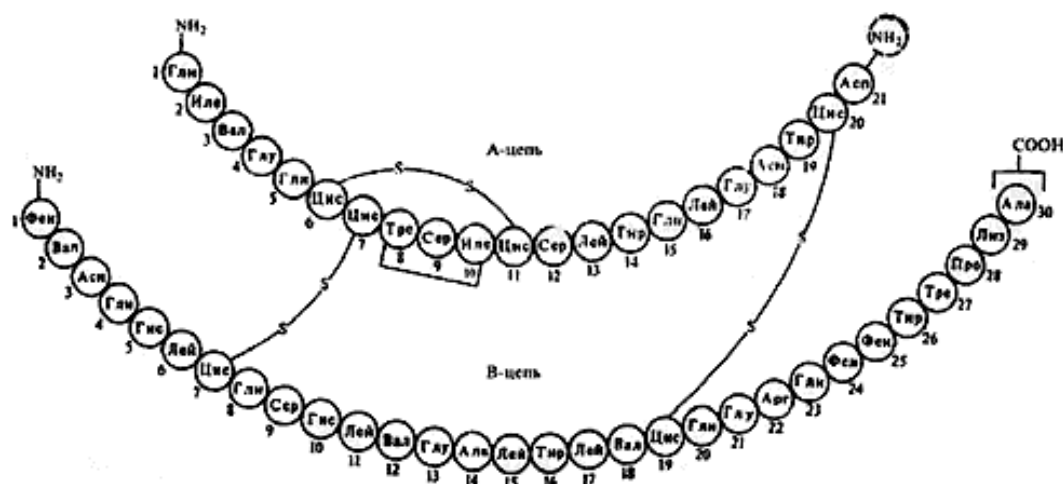


Рис.1.9. Структура инсулина[17].

Вслед за инсулином была раскрыта первичная структура гемоглобина, рибонуклеазы, трипсина и ряда других белков. Путём химического синтеза сначала были получены сложные пептиды со свойствами гормонов, затем удалось синтезировать гормон инсулин, наконец – фермент рибонуклеазу. Правильность химической формулы инсулина и рибонуклеазы подтвердилась тем, что синтетические белки не отличались от белков, продуцируемых организмом, ни по физико-химическим свойствам, ни по биологической активности. Установлена полностью или частично первичная структура свыше 200 белков.

До сих пор нет единого принципа классификации белков. При делении всех известных белков на группы учитывают и их состав (строение), физико-

химические свойства (растворимость, щёлочность), происхождение и роль в организме. Белки делят на простые – протеины, состоящие только из аминокислот, и сложные – протеиды, в состав молекулы которых входят, кроме аминокислот, и другие соединения. К простым белкам относятся альбумины, глобулины, гистоны, глутелины, проламины, протамины и протеиноиды. К сложным белкам относятся гликопротеиды (содержащие, кроме аминокислот, углеводы), липопротеиды (содержащие липиды), нуклеопротеиды (в их состав входят и нуклеиновые кислоты), фосфопротеиды (содержащие фосфорные кислоты) и хромопротеиды (имеющие пигментные металлосодержащие группы).

Процесс образования белков из аминокислот в клетках живых организмов, т.е. биосинтез белка, имеет огромное биологическое значение. Биосинтез белка идёт при помощи особых сложных механизмов, обеспечивающих упорядоченное воспроизведение специфических белков уникальной структуры. Эти механизмы едины или весьма сходны для самых разнообразных клеток и организмов, в них принимают участие нуклеиновые кислоты, в особенности рибонуклеиновые кислоты (РНК). Этот процесс идёт с использованием энергии, накопленной в виде аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) [18].

Биосинтез белка происходит на особых рибонуклеопротеидных частицах – рибосомах, состоящих из почти равных количеств рибосомной РНК (*p*-РНК) и белков. Первичная структура (последовательность аминокислот) синтезирующихся полипептидных цепочек обеспечивается соединением с рибосомами особой матричной, или информационной, рибонуклеиновой кислоты (и-РНК, или м-РНК), которая содержит информацию о специфическом строении белка, «закодированную» в виде последовательного расположения нуклеотидов, составляющих и-РНК. Эту информацию и-РНК получает от дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), хранящей и передающей её по наследству. Аминокислоты, прежде чем попасть в рибосомы, активируются, получая энергию от АТФ и образуя соединение с адениловой кислотой. Далее остаток данной аминокислоты переносится на соответствующую транспортную рибонуклеиновую кислоту (т-РНК). Оба эти процесса катализируются одним и тем же ферментом (аминоациладенилатсинтетазой, или аминоацил-РНК-синтетазой), специфическим для каждой аминокислоты. Определённой аминокислоте соответствуют одна или несколько специфичных для неё т-РНК. Все т-РНК сравнительно низкополимерны, содержат около 80 нуклеотидных остатков. Они построены по общему плану: в начале цепи находится 5-гуаниловая кислота, а в конце – часто обменивающаяся группировка из двух остатков цитидиловой кислоты и аденозина, к которому и присоединяется остаток аминокислоты. Остаток аминокислоты, соединённый с т-РНК, далее пе-

реносится на рибосомы, где и происходит образование полипептидной цепочки белка (рис.1.10) [19].

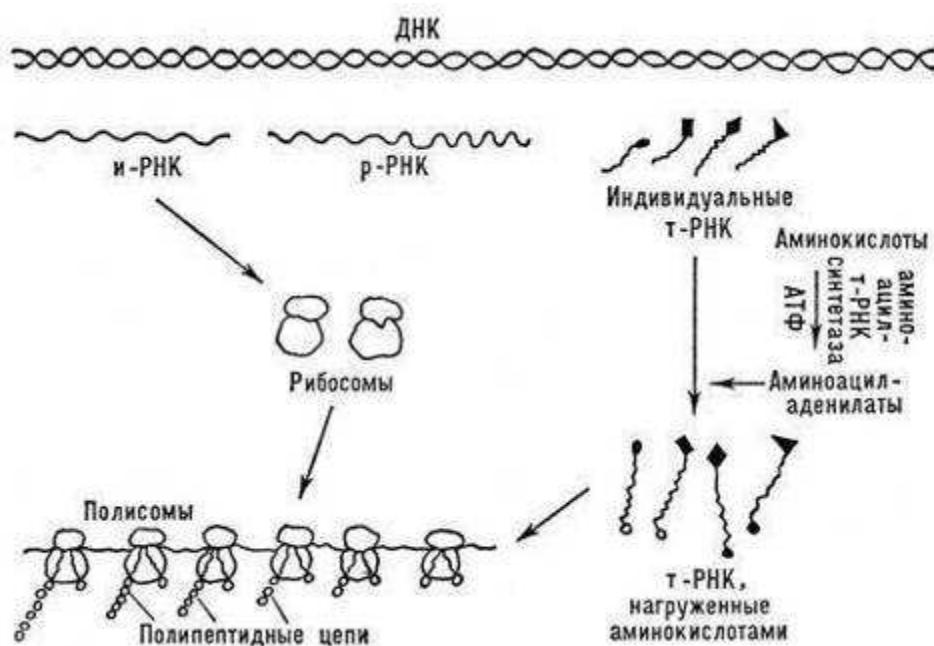


Рис.1.10. Биосинтез белков [19]

Таким образом, рибосомная стадия – центральный этап биосинтеза белка. В процессе биосинтеза белка рибосомы соединяются в цепочки при помощи и-РНК, образуя активные белоксинтезирующие структуры – полирибосомы, или полисомы.

1.4. Нуклеиновые основания

Нуклеиновые кислоты – это высокомолекулярные органические соединения. Они состоят из углерода, водорода, кислорода, фосфора, азота. Нуклеиновые кислоты были открыты в 1869 г. швейцарским врачом Ф.Мишером в ядрах лейкоцитов, входящих в состав гноя. Впоследствии нуклеиновые кислоты были обнаружены во всех растительных и животных клетках, бактериях, протистах, грибах и вирусах. Они играют центральную роль в хранении и передаче наследственной информации о свойствах организма [20].

Гетероциклические основания, входящие в состав нуклеиновых кислот (нуклеиновые основания), – это гидрокси- и аминопроизводные пиримидина и пурина. Нуклеиновые кислоты содержат три гетероциклических основания с пиримидиновым циклом (пиримидиновые основания) и два – с пуриновым циклом (пуриновые основания). Нуклеиновые основания имеют тривиальные названия и соответствующие однобуквенные обозначения.

1.4.1. Пиримидиновые основания

Пиримидиновые основания – это группа природных соединений, состоящая из канонических и минорных пиримидиновых оснований, производных гетероциклического азотистого основания пиримидина, входящего в состав нуклеиновых кислот, нуклеотидов, коферментов и др. Канонические пиримидиновые основания – это цитозин (4-амино-2-пиримидон, сокращенно С), урацил (пиримидин-2,4-дион, U) и тимин (3-метил-пиримидин-2,4-дион, Т). Структурные формулы пиримидиновых оснований (существующих при разных значениях рН) показаны на рис. 1.11.

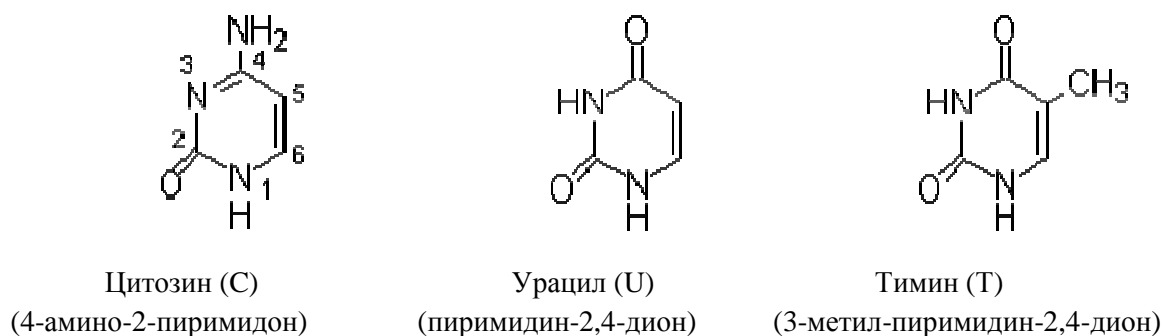


Рис.1.11. Пиримидиновые основания

Пиримидиновые основания представляют собой высокоплавкие (т. пл. больше 300⁰С) бесцветные кристаллические соединения, умеренно растворяющиеся в горячей воде и не растворяющиеся в этаноле и диэтиловом эфире.

Протонирование и депротонирование пиримидиновых оснований сопровождается изменениями характерных УФ спектров и реакционной способности. В таблице 1.2 приведены некоторые физические свойства пиримидиновых оснований [21].

Таблица 1.2

Некоторые физические свойства пиримидиновых оснований

Основание	Молекулярная масса	УФ-спектры			Реакционная способность, рКа
		Форма молекулы	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$	$\epsilon_{\text{макс}} \cdot 10^{-3}$	
Цитозин	111,1	катион	275	10,03	4,5-4,7
		нейтральная	268	6,09	12,1-12,3
		анион	283	8,09	
Урацил	112,1	нейтральная	258	8,20	9,35-9,50
		моноанион	282	5,90	13,9
		дианион	273	7,17	
Тимин	126,1	центральной	265	7,90	9,9
		моноанион	293	5,19	13,9
		дианион	280	5,97	

Пиримидиновые основания, благодаря способности специфически (по принципу комплементарности) взаимодействовать с пуриновыми основаниями, участвуют в кодировании и передаче наследственной информации. Структурные компоненты нуклеотидных коферментов играют важную роль в процессах обмена углеводов (производные уридиндифосфата) и липидов (производные цитидинтрифосфата), антибиотиков и многих других биологически активных соединений. Биосинтез пиримидиновых оснований начинается с образования пиримидинового кольца оротовой кислоты из карбамоилфосфата и аспарагиновой кислоты. После присоединения к оротовой кислоте Д-рибозо-5 -фосфатной боковой цепи образовавшийся нуклеотид (оротидиловая кислота) декарбоксилируется с образованием нуклеотида урацила (уридинмонофосфата – УМФ). Уридинтрифосфат (УТФ), образовавшийся после двойного фосфорилирования УМФ, аминируется с образованием цитидинтрифосфата (ЦТФ). Нуклеотид тимина (дезокситимидиловая кислота) возникает в реакции метилирования дезоксиуридинмонофосфата [22,23]. Свободные пиримидиновые основания, образовавшиеся при распаде нуклеиновых кислот, могут повторно использоваться для синтеза нуклеиновых кислот или подвергаются дальнейшей деградации. Распад пиримидиновых оснований идёт в основном по восстановительному пути с образованием некоторых других аминокислот. У большинства организмов свободные пиримидиновые основания, в конечном счёте, распадаются до мочевины и NH_3 . Окислительный путь распада пиримидиновых оснований обнаружен у некоторых бактерий; он включает стадию барбитуровой или метилбарбитуровой кислоты и заканчивается образованием мочевины и малоновой (из урацила) или метилмалоновой (из тимина) кислот (рис.1.12) [24].

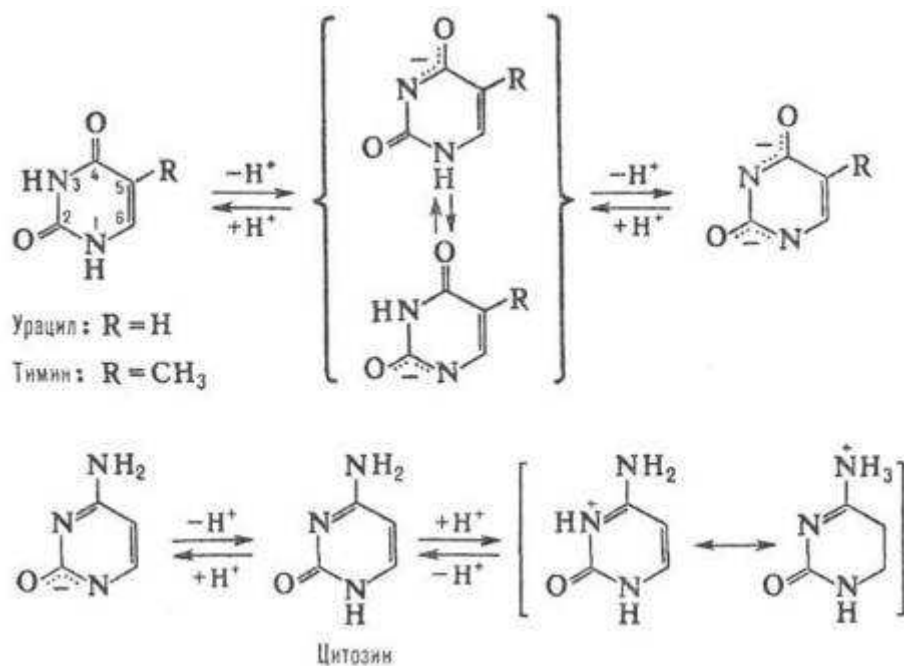


Рис. 1.12. Путь распада пиримидиновых оснований [22]

Кроме канонических пиримидиновых оснований в состав нуклеиновых кислот входят так называемые минорные пиримидиновые основания, главным образом замещенные по атому С-5-5-метил- и 5-гидроксиметилцитозин, 5-карбоксиметилурацил, а также 5,6-дигидро-урацил, N⁴-метилцитозин и др.

Специфические наборы водородных связей между пиримидиновыми и пуриновыми основаниями в комплементарных участках цепей, а также межплоскостные взаимодействия между соседними основаниями в цепи определяют формирование и стабилизацию вторичной и третичной структуры нуклеиновых кислот.

При радиолизе водных растворов пиримидиновых оснований образуются 5,6-дигидрокси-, 5-гидрокси-6-гидроперокси- и 5-гидроперокси-6-гидрокси-5, 6-дигидропиримидины и продукты их дальнейших превращений. Действие УФ излучения на водные растворы пиримидиновых оснований приводит к образованию 5,6-дигидро-6-гидроксипиримидинов (фотогидратов), циклобутановых димеров (через триплетное состояние) с раскрытием связей С=С, нециклобутановых димеров пиримидиновых оснований (через нижнее синглетное возбужденное состояние). Фотогидраты спонтанно превращаются в исходные соединения, а циклобутановые димеры дедимеризуются фотохимически.

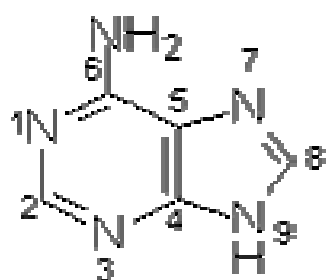
Различия в реакционной способности пиримидиновых оснований позволяют избирательно модифицировать их в составе полинуклеотидов. Такие реакции лежат в основе определения нуклеотидной последовательности (первичной структуры) нуклеиновых кислот. Взаимодействие с соседними основаниями, зависящими от локальной высшей структуры полинуклеотидов, оказывают влияние на скорость модификации пиримидиновых оснований при действии различных агентов. В связи с этим сопоставление относительных скоростей модификации пиримидиновых оснований используется для изучения вторичной и третичной структуры нуклеиновых кислот [25].

Как канонические, так и минорные пиримидиновые основания обычно получают препаративно из нуклеиновых кислот путем кислотного гидролиза и последующего разделения.

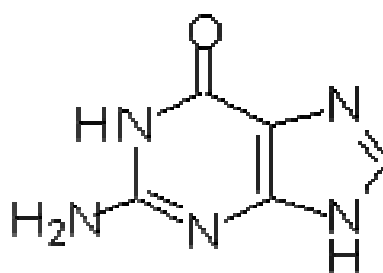
1.4.2. Пуриновые основания

Пуриновые основания — это группа природных соединений (аденин, гуанин), являющихся производными гетероциклического азотистого основания пурина. Входят в качестве агликонов (неуглеводного компонента) в нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, нуклеотиды, фрагменты коферментов, вита-

минов и др. Канонические пуриновые основания нуклеиновых кислот – аденин (6-аминопурин, сокращенно А) и гуанин (2-амино-6-пурион, G), которые показаны на рис.1.13.



Аденин (А)
(6-аминопирин)



Гуанин (G)
(2-амино-6-пурион)

Рис.1.13. Пуриновые основания

Различные формы молекул пуриновых оснований, существующие при разных значениях pH, и их таутомерные формы показаны на рис.1.14 [24].

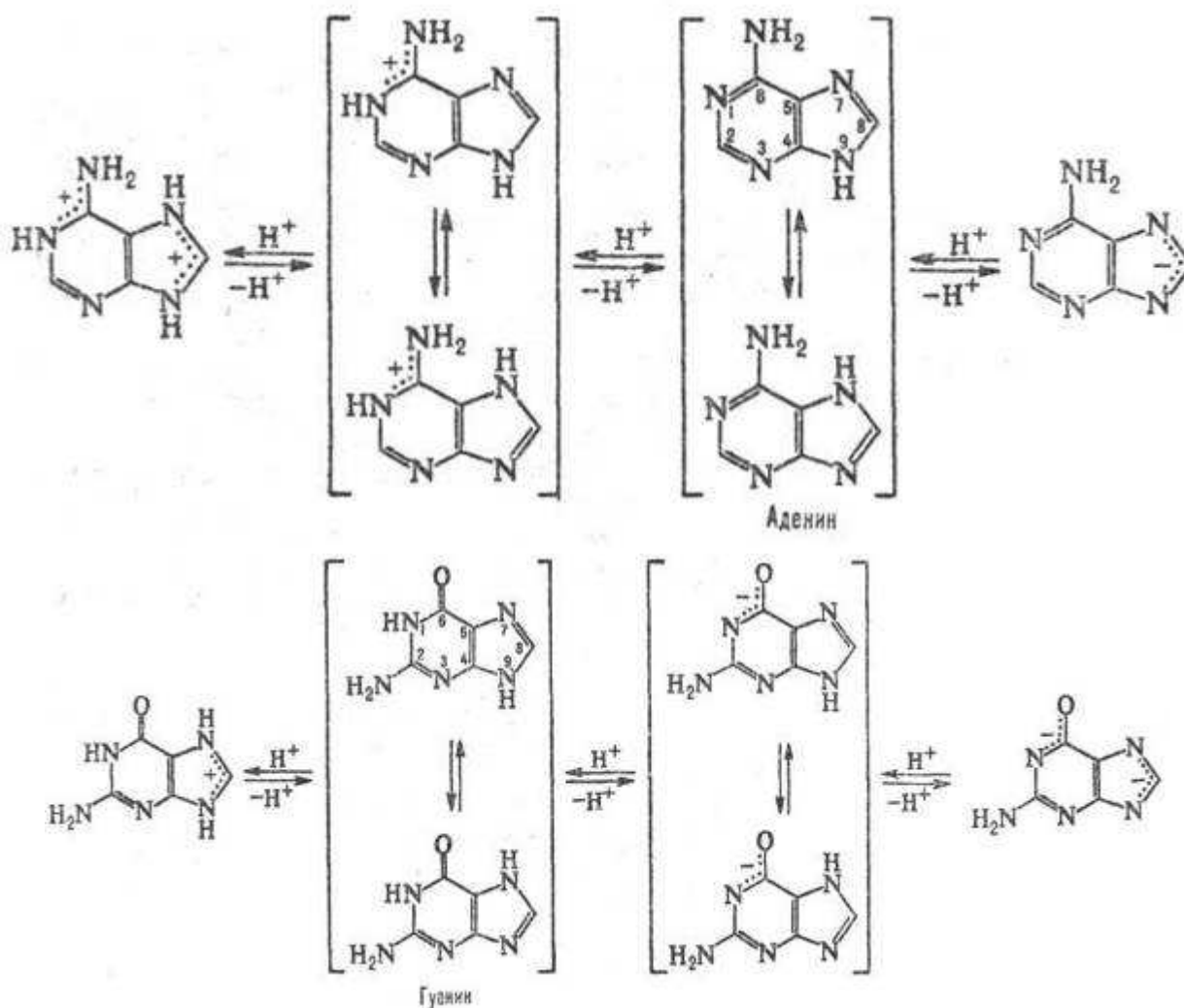


Рис.1.14. Путь распада пуриновых оснований

Кроме канонических пуриновых оснований, в состав нуклеиновых кислот входят также минорные пуриновые основания, главным образом метилированные по экзоциклической аминогруппе и (или) по атомам N гетероцикла. Эти основания образуются ферментативно в составе полинуклеотидов и играют важную роль в регуляции репликации и транскрипции, в защите клеток от чужеродных ДНК и системы трансляции от действия антибиотиков и др.

В комплементарных участках помимо канонических пар пуриновых оснований с пиримидиновыми основаниями (А-Т и G-С; Т и С-соответственно тимин и цитозин) могут образовываться неканонические пары (G-G, G-A, G-T и др.).

Последовательность пуриновых и пиримидиновых оснований в полинуклеотидной цепи определяет генетическую информацию, заключенную в ДНК, вирусных и матричных РНК.

Дезаминирование аденина в составе полинуклеотида (превращение в гипоксантин) меняет информационный смысл и приводит к точковой мутации. Дезаминирование гуанина (превращение его в ксантин) в составе матричных полинуклеотидов приводит к блокированию репликации и транскрипции. Метилирование пуриновых оснований по N-7 в составе матричных полинуклеотидов не сопровождается изменением генетического смысла основания.

Пуриновые основания представляют собой высокоплавкие (т. пл. больше 250°C), бесцветные кристаллические соединения, плохо растворимые в горячей воде (особенно гуанин), не растворимые в этаноле и диэтиловом эфире. Протонирование и депротонирование пуриновых оснований сопровождается изменениями УФ спектров поглощения и реакционной способности (см. табл.1.3) [21].

Таблица 1.3

Некоторые физические свойства пуриновых оснований

Основание	Молекулярная масса	УФ-спектры			Реакционная способность, pKa
		Форма молекулы	$\lambda_{\text{макс}}$ нм	$\varepsilon_{\text{макс}} \cdot 10^{-3}$	
Аденин	135,1	дикатион	265	10,95	0,1; 4,1; 9,1
		катион	265	13,16	
		нейтральная	260	13,32	
		анион	270	12,26	
Гуанин	151,1	катион	250	11,49	3,2; 9,3; 12,5
		нейтральная	245	10,88	
		моноанион	275	8,24	
		дианион	273	10,20	

Хорошо изучены реакции ацилирования и дезаминирования экзоциклических аминогрупп пуриновых оснований действием азотистой кислоты и замещение аминогруппы аденина при действии гидроксилминов. Алкилирование пуриновых оснований идет по атомам N циклов (реакционная способность уменьшается в ряду: N-9 > N-7 > N-3 > N-1), по экзоциклическим аминогруппам и по атому O-6 гуанина. Возможно прямое галогенирование по атому C-8. При действии органических пероксидных соединений (надкислот) на аденин образуются N-оксиды по атомам N имидазольного цикла. При действии формальдегида образуются N-метилольные соединения. Хлор- и бром-ацетальдегид избирательно реагируют с аденином, образуя этеноаденин в результате взаимодействия альдегидной группы с аминогруппой аденина и последующего N-1 алкилирования с участием α -атома C реагента. Глиоксаль и кетоксаль избирательно реагируют с гуанином, образуя третий гетероцикл в результате реакций карбонильных групп агента с экзоциклической аминогруппой и атомом N-1 [26]. Скорости всех этих реакций весьма существенно зависят от локальных особенностей высшей структуры полинуклеотида, что широко используют для изучения вторичной и третичной структур нуклеиновых кислот. Канонические и минорные пуриновые основания могут быть получены препаративно из нуклеиновых кислот путем кислотного гидролиза и последующего разделения. Гуанин в больших количествах получают из рыбьей чешуи.

1.5. Дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты

В каждом живом организме присутствуют два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК). Материалом, из которого состоят гены, является ДНК, а материалом, обеспечивающим декодирование генетической информации, является РНК. У отдельных вирусов первичным генетическим материалом служит РНК. Таким образом, ДНК и РНК – это хранители (носители) и переносчики генетической информации. Для ДНК характерна специфичность локализации в клетках, поскольку она обнаруживается только в ядрах клеток (хромосомах), митохондриях (у животных) и хлоропластах (у растений). У многих микроорганизмов ДНК локализована только в ядерной области (нуклеоиде) или в цитоплазме в виде плазмид. Для организмов каждого вида характерно определенное количество ДНК на клетку. Молекулы ДНК являются линейными макромолекулами, представляющими собой длинные двойные цепи полимеров; их молеку-

лярная масса варьирует от 1 000 до 1 000 000 кД. Молекулы РНК состоят только из одной цепи, их молекулярная масса меньше, чем у ДНК. Молекулы ДНК и РНК состоят из мономерных единиц – нуклеотидов, поэтому нуклеиновые кислоты называют полинуклеотидами.

Каждый нуклеотид содержит три химически различных компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид (пентозу) и остаток фосфорной кислоты. В зависимости от числа имеющихся в молекуле остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты (НМФ), нуклеозиддифосфаты (НДФ), нуклеозидтрифосфаты (НТФ) (рис. 1.15).

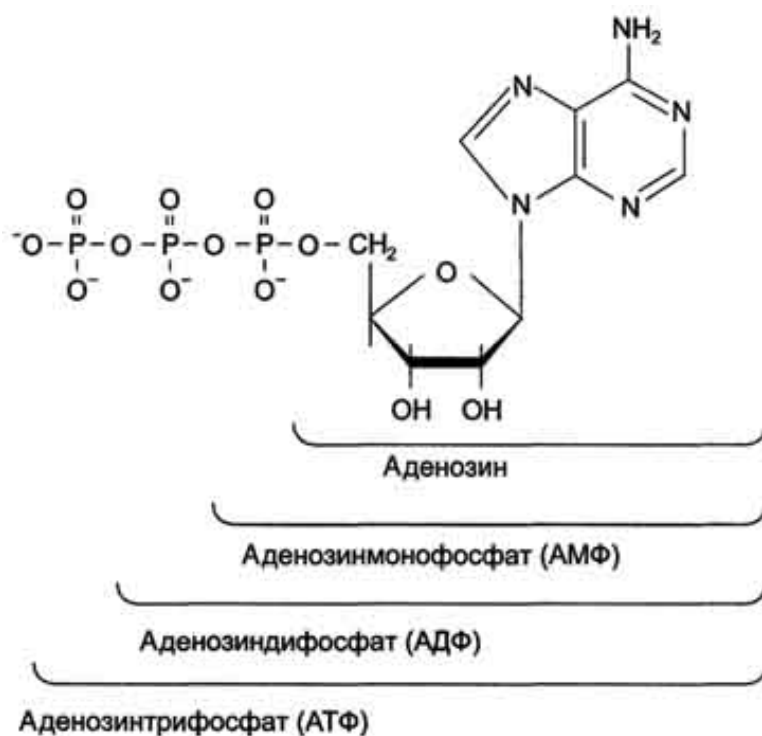


Рис. 1.15. Нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты аденозина.

Нуклеотиды – фосфорные эфиры нуклеозидов.

Остаток фосфорной кислоты присоединён к 5'-углеродному атому пентозы (5'-фосфоэфирная связь)

В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые – аденин (А), гуанин (G) и пиримидиновые – цитозин (С), тимин (Т) и урацил (U). Нумерация атомов в основаниях записывается внутри цикла (рис. 1.16). Номенклатура нуклеотидов приведена в таблице 1.4.

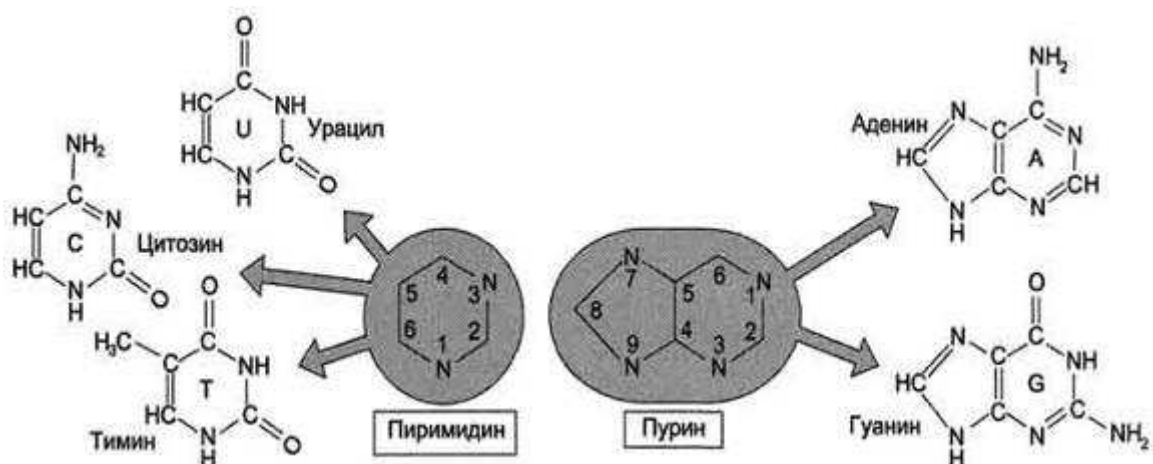


Рис. 1.16. Пуриновые и тимидиновые основания

Таблица 1.4

Номенклатура нуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотид	Трёхбуквенное обозначение	Однобуквенный код
Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат	АМФ	A
Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат	ГМФ	G
Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат	ЦМФ	C
Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат	УМФ	U
Тимин	Тимидин	Тримидинмонофосфат	ТМФ	T

Пентозы в нуклеотидах представлены либо рибозой (в составе РНК), либо дезоксирибозой (в составе ДНК). Чтобы отличить номера атомов в пентозах от нумерации атомов в основаниях, запись производят с внешней стороны цикла и к цифре добавляют штрих (') - 1', 2', 3', 4' и 5' (рис. 1.17).

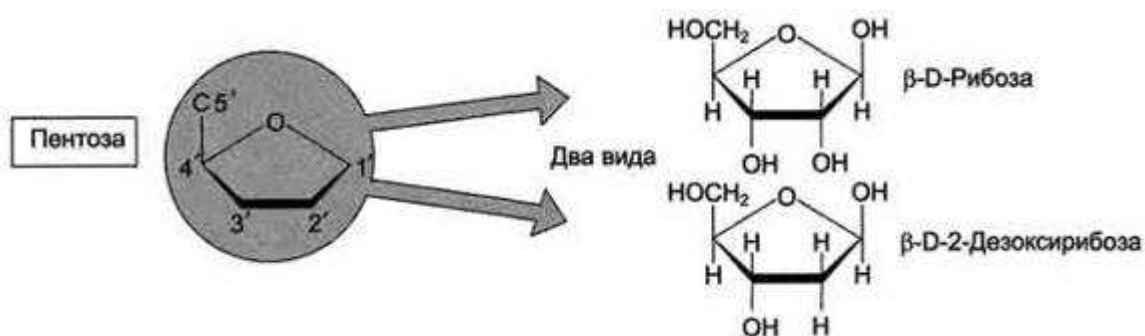


Рис. 1.17. Пентозы. Присутствуют 2 вида - β-D-рибоза в составе нуклеотидов РНК и β-D-2-дезоксирибоза в составе нуклеотидов ДНК

Пентозу соединяет с основанием N-гликозидная связь, образованная C₁-атомом пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина (рис. 1.18).

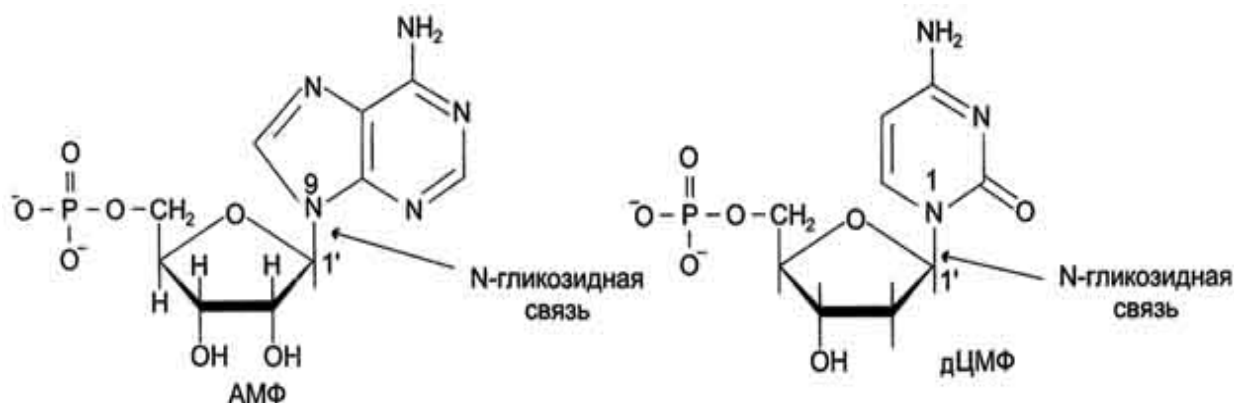


Рис. 1.18. Пуриновый и пиримидиновый нуклеотиды

Нуклеотиды, в которых пентоза представлена рибозой, называют рибонуклеотидами, а нуклеиновые кислоты, построенные из рибонуклеотидов, – рибонуклеиновыми кислотами, или РНК. Нуклеиновые кислоты, в мономеры которых входит дезоксирибоза, называют дезоксирибонуклеиновыми кислотами, или ДНК. Нуклеиновые кислоты по своему строению относятся к классу линейных полимеров. Остов нуклеиновой кислоты имеет одинаковое строение по всей длине молекулы и состоит из чередующихся групп – пентоза-фосфат-пентоза- (рис. 1.19).

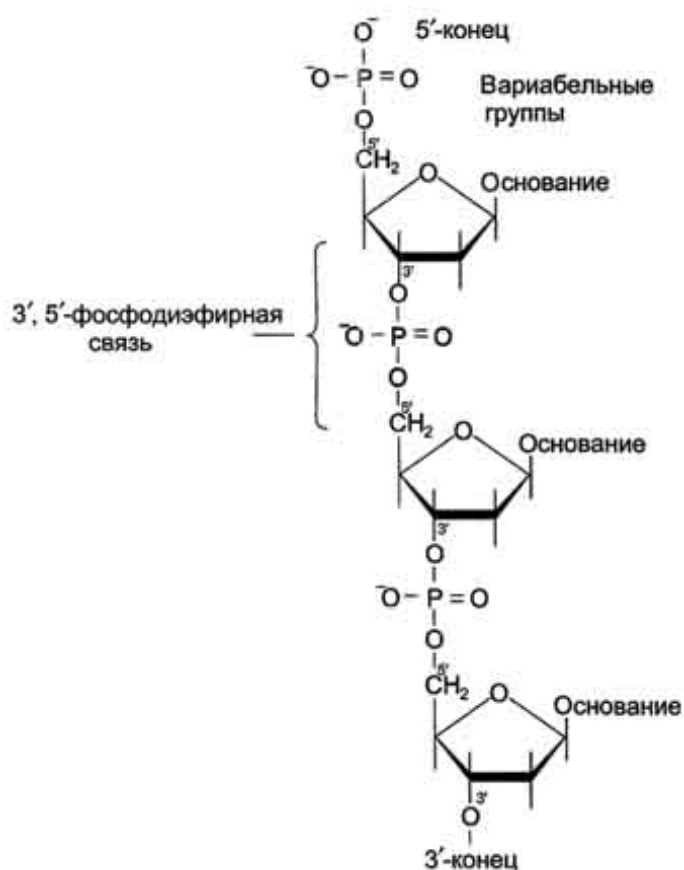


Рис. 1.19. Фрагмент цепи ДНК

Вариабельными группами в полинуклеотидных цепях служат азотистые основания – пурины и пиримидины. В молекулы РНК входят аденин (А), урацил (U), гуанин (G) и цитозин (C), в ДНК – аденин (А), тимин (Т), гуанин (G)

и цитозин (С). Уникальность структуры и функциональная индивидуальность молекул ДНК и РНК определяются их первичной структурой – последовательностью азотистых оснований в полинуклеотидной цепи.

1.5.1. Структура ДНК

Для состава ДНК характерны следующие закономерности, известные как правила А. Чаргаффа [27] .

1. Сумма нуклеотидов, содержащих пуриновые азотистые основания, равна сумме нуклеотидов, содержащих пиримидиновые азотистые основания ($A + G = T + C$, или $A + G/T + C = 1$).

2. Содержание аденина равно содержанию тимина, а гуанина – содержанию цитозина ($A = T$, или $A/T = 1$ и $G = C$, или $G/C = 1$).

3. Содержание $G + T = A + C$, или $G + T/A + C = 1$.

4. ДНК из разных источников может иметь различия, обусловленные в одних случаях преобладанием аденина над гуанином и тимина над цитозином ($A + T > G + C$), в других – преобладанием гуанина и цитозина над аденином и тимином ($G + C > A + T$).

Для ДНК характерна структура трех видов – первичная, вторичная и третичная.

Первичная структура ДНК – порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (дНМФ) в полинуклеотидной цепи. Каждая фосфатная группа в полинуклеотидной цепи, за исключением фосфорного остатка на 5'-конце молекулы, участвует в образовании двух эфирных связей с участием 3'- и 5'-углеродных атомов двух соседних дезоксирибоз, поэтому связь между мономерами обозначают 3', 5'-фосфодиэфирной. Концевые нуклеотиды ДНК различают по структуре: на 5'-конце находится фосфатная группа, а на 3'-конце цепи – свободная ОН-группа. Эти концы называют 5'- и 3'-концами. Линейная последовательность дезоксирибонуклеотидов в полимерной цепи ДНК обычно сокращённо записывают с помощью однобуквенного кода, например -А-Г-С-Т-Т-А-С-А- от 5'- к 3'-концу. В каждом мономере нуклеиновой кислоты присутствует остаток фосфорной кислоты. При рН 7 фосфатная группа полностью ионизирована, поэтому *in vivo* нуклеиновые кислоты существуют в виде полианионов (имеют множественный отрицательный заряд). Остатки пентоз тоже проявляют гидрофильные свойства. Азотистые основания почти нерастворимы в воде, но некоторые атомы пуринового и пиримидинового циклов способны образовывать водородные связи. Таким образом, первичная структура ДНК представляет собой линейную последовательность

дезоксирибонуклеотидов в одной цепочке. В такой форме в природе ДНК не существует, но именно первичная структура (последовательность нуклеотидов) определяет все ее свойства [28].

Вторичная структура ДНК. В 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель пространственной структуры ДНК. Согласно этой модели, молекула ДНК имеет форму спирали, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг одной оси. Двойная спираль правозакрученная, полинуклеотидные цепи в ней антипараллельны (рис. 1.20), т.е., если одна из них ориентирована в направлении $3' \rightarrow 5'$, то вторая – в направлении $5' \rightarrow 3'$.

Поэтому на каждом из концов молекулы ДНК расположены $5'$ -конец одной цепи и $3'$ -конец другой цепи. Как видно из рис.1.20, все основания цепей ДНК расположены внутри двойной спирали, а пентозофосфатный остов – снаружи. Полинуклеотидные цепи удерживаются относительно друг друга за счёт водородных связей между комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями А и Т (две связи) и между G и C (три связи) (рис. 1.21). При таком сочетании каждая пара содержит по три кольца; поэтому общий размер этих пар оснований одинаков по всей длине молекулы. Водородные связи при дру-

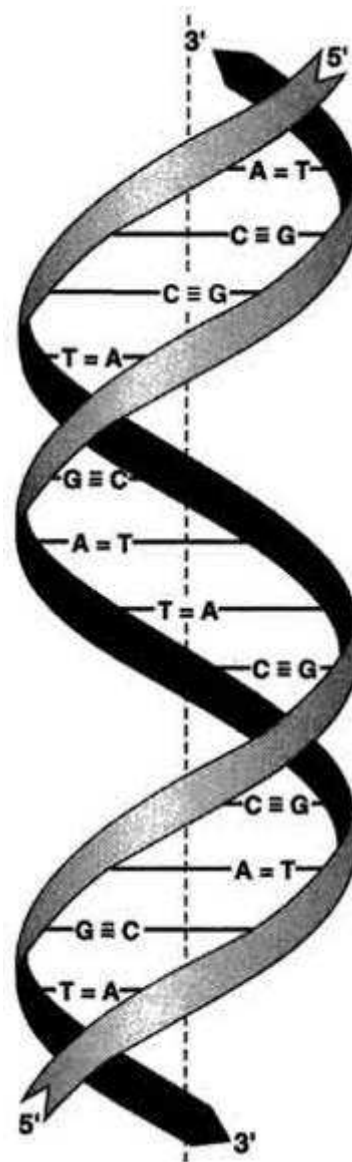


Рис. 1.20. Двойная спираль ДНК. Молекулы ДНК состоят из двух антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи закручены относительно друг друга в правозакрученную спираль так, что на один виток приходится примерно 10 пар нуклеотидов

г друг друга

гих сочетаниях оснований в паре возможны, но они значительно слабее. Последовательность нуклеотидов одной цепи полностью комплементарна последовательности нуклеотидов второй цепи. Поэтому, согласно правилу Чаргаффа (Эрвин Чаргафф в 1951 г. установил закономерности в соотношении пуриновых и пиримидиновых оснований в молекуле ДНК), число пуриновых оснований (А + Г) равно числу пиримидиновых оснований (Т + Ц). Комплементарные основания уложены в стопку в сердцевине спирали. Между основаниями двухцепочечной молекулы в стопке возникают гидрофобные взаимодействия, стабилизирующие двойную спираль. Такая структура исключает контакт азотистых остатков с водой, но стопка оснований не может быть абсолютно вертикальной. Пары оснований слегка смещены относительно друг друга. В образованной структуре различают две бороздки – большую, шириной 2,2 нм, и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина [29].

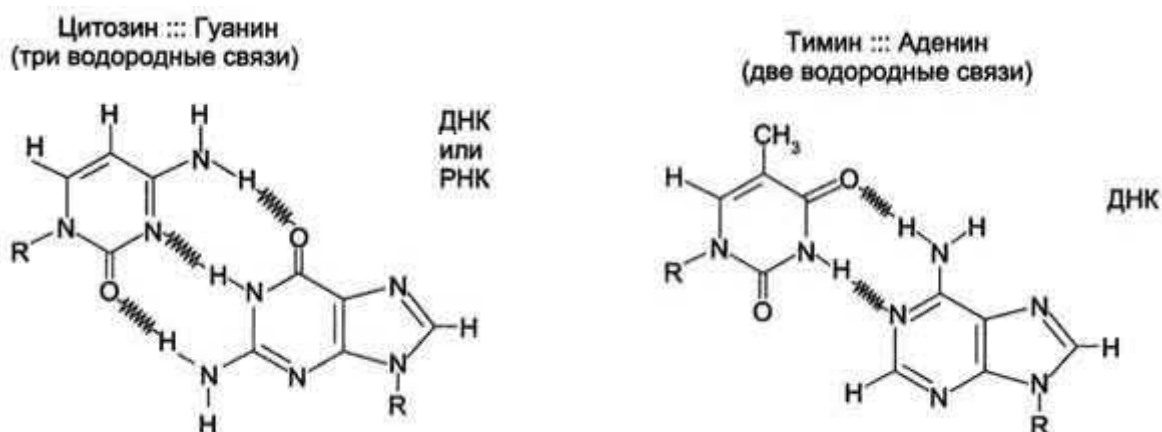


Рис. 1.21. Пурип-пиримидиновые пары оснований в ДНК

Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК).

Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому. В диплоидных клетках человека содержится 46 хромосом. Общая длина ДНК всех хромосом клетки составляет 1,74 м, но она упакована в ядре, диаметр которого в миллионы раз меньше. Чтобы расположить ДНК в ядре клетки, должна быть сформирована очень компактная структура. Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляются с помощью разнообразных белков, взаимодействующих с определёнными последовательностями в структуре ДНК. Все связывающиеся с ДНК эукариотов белки можно разделить на 2 группы: гистоновые и негистоновые белки. Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называют хроматином [30].

Гистоны - белки с молекулярной массой 11-21 кД, содержащие много остатков аргинина и лизина. Благодаря положительному заряду гистоны образуют ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами, расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК [31].

Существует 5 типов гистонов. Четыре гистона H2A, H2B, H3 и H4 образуют октамерный белковый комплекс $(H2A, H2B, H3, H4)_2$, который называют «нукleosомный кор». Молекула ДНК «накручивается» на поверхность гистонического октамера, совершая 1,75 оборота (около 146 пар нуклеотидов). Такой комплекс гистоновых белков с ДНК служит основной структурной единицей хроматина, её называют «нукleosома». ДНК, связывающую нукleosомные частицы, называют линкерной ДНК. В среднем линкерная ДНК составляет 60 пар нуклеотидных остатков. Молекулы гистона H1 связываются с ДНК в межинукleosомных участках (линкерных последовательностях) и защищают эти участки от действия нуклеаз (рис. 1.22) .

В ядре каждой клетки присутствует около 60 млн. молекул каждого типа гистонов, а общая масса гистонов примерно равна содержанию ДНК. Аминокислотные остатки лизина, аргинина и концевые аминокислотные группы гистонов могут модифицироваться: ацетилироваться, фосфорилироваться, метилироваться или взаимодействовать с белком убиквитином (негистоновый белок). Модификации бывают обратимыми и необратимыми, они изменяют заряд и конформацию гистонов, а это влияет на взаимодействие гистонов между собой и с ДНК. Активность ферментов, ответственных за модификации, регулируется и зависит от стадии клеточного цикла. Модификации делают возможными конформационные перестройки хроматина.

Негистоновые белки хроматина. В ядре эукариотической клетки присутствуют сотни самых разнообразных ДНК-связывающих негистоновых бел-

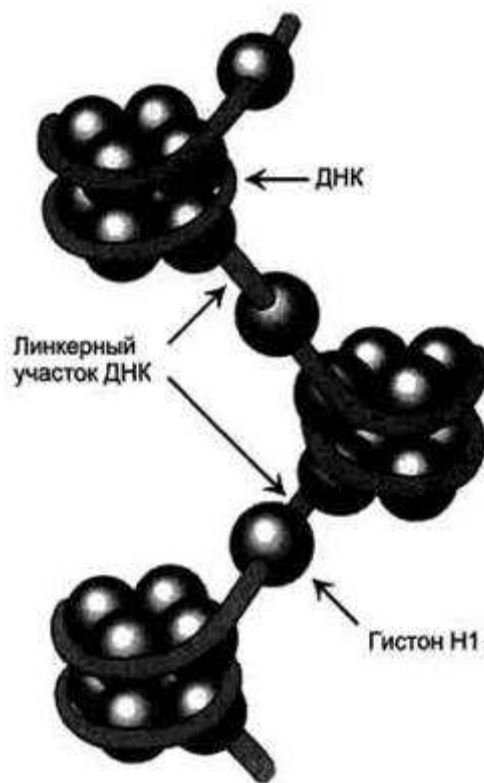


Рис. 1.22. Структура нукleosом. Восемь молекул гистонов $(H2A, H2B, H3, H4)_2$ составляют ядро нукleosомы, вокруг которого ДНК образует примерно 1,75 витка

ков. Каждый белок комплементарен определённой последовательности нуклеотидов ДНК. К этой группе относят семейство сайт-специфических белков типа «цинковые пальцы». Каждый «цинковый палец» узнаёт определённый сайт, состоящий из 5 нуклеотидных пар. Другое семейство сайт-специфических белков – гомодимеры. Фрагмент такого белка, контактирующий с ДНК, имеет структуру «спираль-поворот-спираль». К группе структурных и регуляторных белков, которые постоянно ассоциированы с хроматином, относят белки высокой подвижности. Они имеют молекулярную массу менее 30 кД и характеризуются высоким содержанием заряженных аминокислот. Благодаря небольшой молекулярной массе они обладают высокой подвижностью при электрофорезе в полиакриламидном геле. К негистоновым белкам принадлежат также ферменты репликации, транскрипции и репарации. При участии структурных, регуляторных белков и ферментов, участвующих в синтезе ДНК и РНК, нить нуклеосом преобразуется в высококонденсированный комплекс белков и ДНК. Образованная структура в 10 000 раз короче исходной молекулы ДНК [32].

Генетическая система митохондрий. Митохондрии – важнейшие органеллы клеток, осуществляющие синтез АТФ за счёт окисления субстратов. Митохондрии имеют собственный уникальный геном, наследуемый по материнской линии, так как он происходит из цитоплазмы яйцеклетки. Геном митохондрий сперматозоидов не попадает в оплодотворённую яйцеклетку.

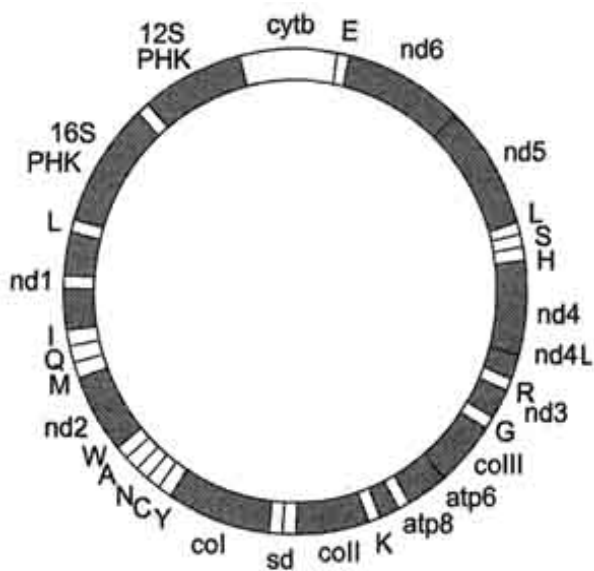


Рис. 1.23. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК

Митохондриальный геном человека представлен одной кольцевой молекулой ДНК из 16 569 нуклеотидных пар (рис. 1.23). Он кодирует 13 белков, используемых на построение структурно-функциональных компонентов митохондрий.

Гены *nd1-nd6*, *nd4l* кодируют субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса; ген *coi-III* – субъединицы цитохромоксидазы; ген *cytb* – цитохром b. Гены *atp 8* и *atp 6* кодируют субъединицы АТФ-синтазы (NADH-дегидрогеназный комплекс, цитохромоксидаза, цитохром b –

белки, участвующие в энергетическом обмене). Остальные гены кодируют рибосомные (12S РНК и 16S РНК) и транспортные РНК соответствующих аминокислот, обозначенные латинскими буквами.

В митохондриях отсутствуют ферменты, ответственные за репарацию, поэтому митохондриальный геном содержит немало ошибок. Митохондрии эукариотов имеют очень маленькие рибосомы с константой седиментации 55S, тогда как рибосомы прокариотов – 70S [33].

1.5.2. Структура РНК

РНК характеризуется такой же структурой, как и ДНК. Однако в отличие от ДНК в РНК сахаром является рибоза с кислородом, представляющая собой сахар с 5 атомами углерода, к одному из которых прикреплена 2'-гидроксильная группа (-ОН). Кроме этого, они отличаются следующим: 1) количество РНК в клетке зависит от возраста, физиологического состояния, органной принадлежности клетки; 2) в мононуклеотидах РНК содержатся рибоза, вместо тимина урацил; 3) для РНК не характерны правила Чаргаффа; 4) в РНК больше минорных оснований, чем в ДНК, при этом в т-РНК количество минорных оснований приближается к 50 [34].

В молекуле РНК, состоящей из одной полинуклеотидной цепочки, также как и в ДНК выделяют первичную, вторичную и третичную структуры.

Первичная структура РНК – порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов (НМФ) в полинуклеотидной цепи. В РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями. Концы полинуклеотидных цепей РНК неодинаковы. На одном конце находится фосфорилированная ОН-группа 5'-углеродного атома, на другом конце - ОН-группа 3'-углеродного атома рибозы, поэтому концы называют 5'- и 3'-концами цепи РНК. Гидроксильная группа у 2'-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Так, в слабощелочной среде молекулы РНК гидролизуются даже при нормальной температуре, тогда как структура цепи ДНК не изменяется.

Вторичная структура РНК. Молекула рибонуклеиновой кислоты построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли – «шпильки», за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями А-У и Г-С. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК.

Третичная структура РНК. Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, возникающей путём взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между нуклеотидными остатками, достаточно удалёнными друг от друга, или связей между ОН-группами остатков рибозы и основаниями. Третичная структура РНК стабилизирована ионами двухвалентных металлов, например ионами Mg^{2+} , связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями.

Основные типы РНК. В цитоплазме клеток присутствуют 3 типа рибонуклеиновых кислот – транспортные РНК (тРНК), матричные РНК (мРНК) и рибосомальные РНК (рРНК). Они различаются по первичной структуре, молекулярной массе, конформации, продолжительности жизни и, самое главное, по функциональной активности.

Транспортные РНК (тРНК). Пространственную структуру любых тРНК, независимо от различий в последовательности нуклеотидов, описывают универсальной моделью «клеверного листа» (рис. 1.24). В каждой молекуле тРНК есть участки цепи, не участвующие в образовании водородных связей между нуклеотидными остатками. К ним, в частности, относят участок, ответственный за связывание с аминокислотой на 3'-конце молекулы и антикодон – специфический триплет нуклеотидов, взаимодействующий комплементарно с кодоном мРНК [35].

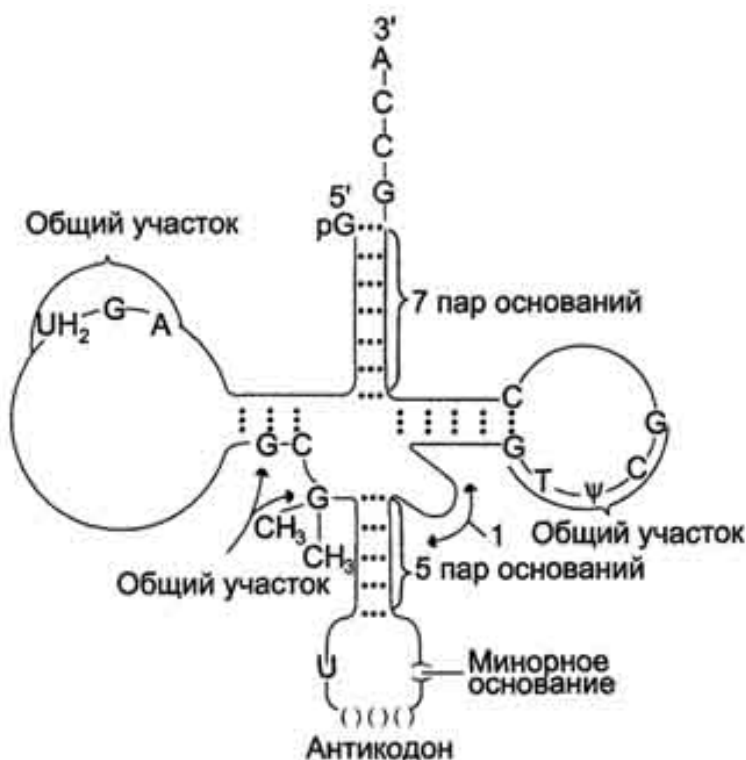


Рис. 1.24. Строение транспортных РНК. Спирализованные участки обозначены на рисунке пунктиром; «общие участки» одинаковы у всех тРНК; 1 - петля переменного размера; UH_2 (дигидроурацил), ψ (псевдоурацил) - минорные основания; антикодону всегда предшествует U (урацил), а после него всегда стоит минорное основание

В состав нуклеотидов тРНК входят минорные основания (в среднем 10-12 оснований на молекулу). Они представлены метилированными основаниями, изомерами и аналогами пиримидинов (рис. 1.25).



Рис. 1.25. Минорные основания тРНК

Минорные основания выполняют 2 функции: они делают тРНК устойчивыми к действию нуклеаз цитоплазмы и поддерживают определённую третичную структуру молекулы, так как не могут участвовать в образовании комплементарных пар, и препятствуют спирализации определённых участков в полинуклеотидной последовательности тРНК.

Матричные РНК (мРНК). Первичная структура всех мРНК, независимо от уникальности их кодирующей последовательности, имеет одинаковое строение 5'- и 3'-концов. Так, на 5'- конце присутствует модифицированный нуклеотид 7-метилгуанозин-5'-трифосфат (кэп). Несколько десятков нуклеотидов отделяют кэп от иницирующего кодона, обычно это триплет -AUG-. За кодирующим участком следует один из терминирующих кодонов -UGA-, -UUA-, -UAG-. На 3'-конце большинства мРНК присутствует последовательность нуклеотидов из 100-200 аденозинмонофосфатных остатков [36].

Рибосомальные РНК (рРНК). Рибосомальные РНК имеют многочисленные спирализованные участки. Различают рРНК - 5S, 5,8S, 28S и 18S (S - коэффициент седиментации). Рибосомальные РНК содержат несколько модифицированных нуклеотидов, чаще всего это метилированные производные азотистых оснований или рибозы (2'-метилрибоза). рРНК образуют комплексы с белками, которые называют рибосомами. Каждая рибосома состоит из двух субъединиц - малой (40S) и большой (60S). Субъединицы рибосом различаются не только набором рРНК, но и количеством и структурой белков (рис. 1.26). На данном рисунке величина S характеризует скорость оседания частиц при ультрацентрифугировании и пропорциональна их молекулярной массе. Рибосома прокариотов (70S) состоит из 50S и 30S субъединиц, эукариотов (80S) - состоит из субъединиц 60S и 40S. Рибосомы эукариотов и

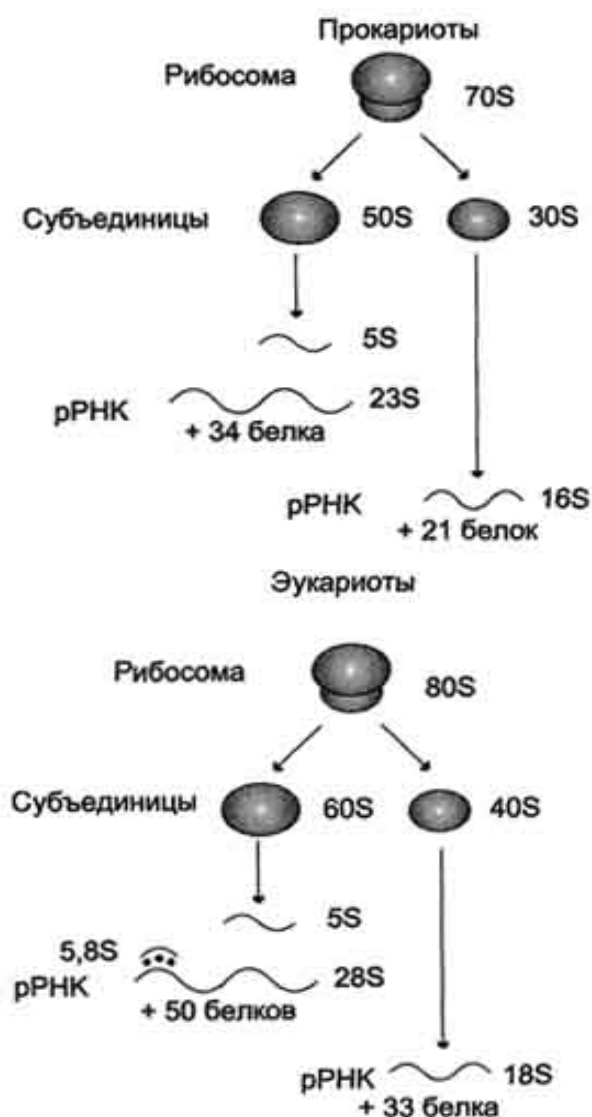


Рис. 1.26. Строение эукариотических и прокариотических рибосом

прокариотов различаются по кулярной массе субъединиц, числу молекул рРНК, массе рРНК, количеству и разнообразию белков, способных связывать специфические лиганды [37].

Гибридизация нуклеиновых кислот. Вторичная структура нуклеиновых кислот образуется за счёт слабых взаимодействий – водородных и гидрофобных. Поэтому если водный раствор ДНК нагреть до 100°C, то связи, удерживающие две цепи двойной спирали вместе, разрушаются. В результате разрыва водородных и гидрофобных связей цепи ДНК расходятся. Этот процесс называют «денатурация». Однако если раствор, содержащий денатурированную ДНК, очень медленно охлаждать, то могут получиться двухспиральные структуры, идентичные исходным. Такой процесс получил название «ренативация» [38].

На явлении денатурации и ренативации основан метод, называемый «молекулярная гибридизация». Процесс гибридизации может осуществляться между двумя любыми цепями нуклеиновых кислот (ДНК-ДНК, ДНК-РНК) при условии, что они содержат комплементарные последовательности нуклеотидов. Такие гибридные структуры можно выделить центрифугированием в градиенте плотности сахарозы или наблюдать в электронном микроскопе (рис. 1.27) [39].

Если раствор, содержащий образцы ДНК 1 и 2, выделенные из организмов разных видов, денатурировать, а затем провести ренативацию, то образуются двухспиральные структуры. Но наряду с исходными ДНК 1 и ДНК 2 образуются гибридные двойные спирали, содержащие цепь ДНК образца 1 и цепь ДНК образца 2, где присутствуют как спирализованные, так и неспирализованные участки. В неспирализованных участках фрагменты цепей ДНК

не комплементарны, т.е. в ходе гибридизации получаются несовершенные гибриды [40]. Методом молекулярной гибридизации можно установить:

- сходство и различие первичной структуры разных образцов нуклеиновых кислот;
- различие ДНК, выделенных из организмов разных видов;
- идентичность ДНК всех органов и тканей одного организма.

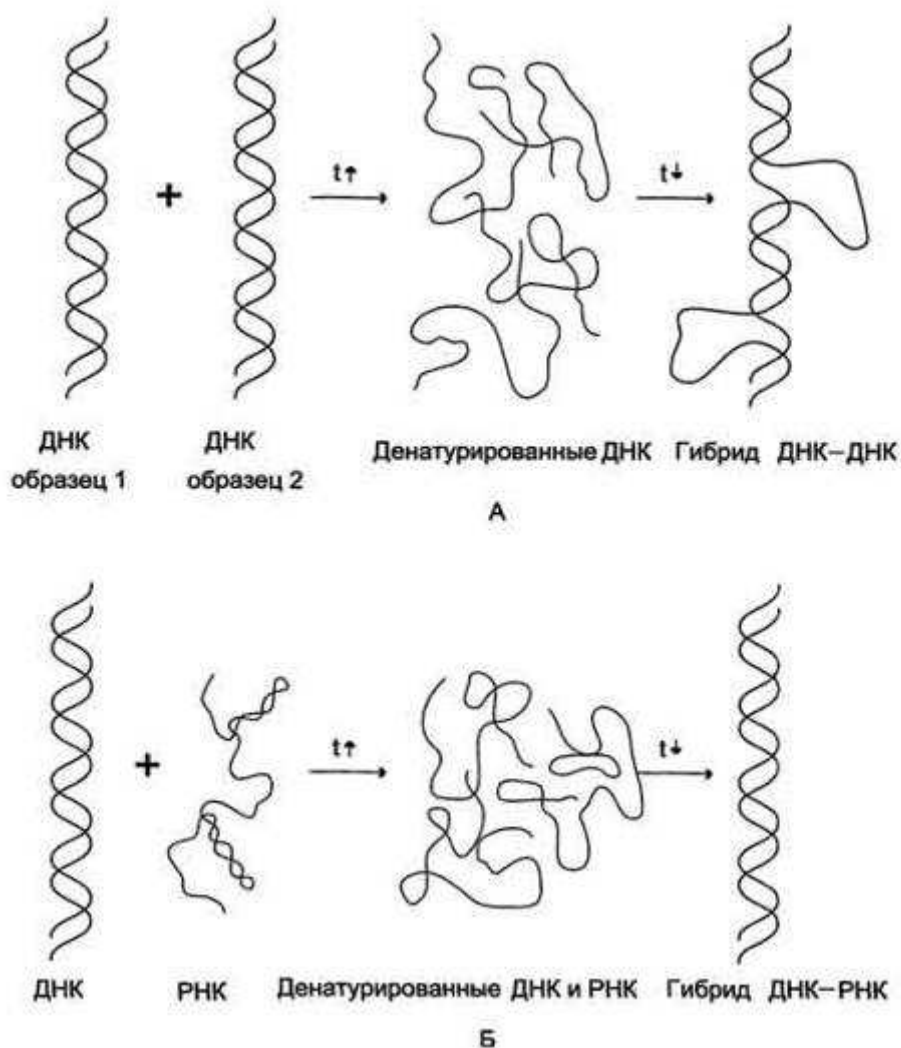


Рис. 1.27. Гибридизация нуклеиновых кислот.

А - гибридизация ДНК-ДНК; Б - гибридизация ДНК-РНК [39]

При проведении гибридизации ДНК-РНК были выделены гибридные молекулы, содержащие одну цепь ДНК и одну цепь РНК. Если для эксперимента были взяты ДНК и РНК (первичный транскрипт), выделенные из одного организма, то образовывались совершенные гибриды, потому что молекула РНК комплементарна цепи ДНК. Гибридизацией ДНК-РНК было впервые установлено, что все виды РНК клетки имеют на молекуле ДНК комплементарные участки.

II. ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

В последнее время резко возрос интерес исследователей к определению лекарственных соединений в различных медико-биологических объектах, а также выявление фальсифицированных препаратов, поскольку современные рынки заполнены фармацевтической продукцией, качество которой часто не отвечает требуемым стандартам. Как правило, такие препараты представляют угрозу тем, что активные компоненты находятся в них в гораздо меньших, а, следовательно, терапевтически неэффективных количествах. Кроме того, в ряде случаев в составе подобных препаратов могут полностью отсутствовать компоненты, заявленные производителем. В связи с ростом количества фальсификатов особую важность приобретает разработка надежных и экспрессных методов их анализа. Тест-методы, несмотря на их привлекательную экспрессность и простоту, не решают полностью проблему контроля лекарственных препаратов, поскольку изначально не ориентированы на проведение арбитражного количественного анализа. Чаще всего для идентификации и определения основных компонентов лекарственных форм в настоящее время используют хроматографические методы. Однако, несмотря на их очевидные достоинства, эти методы довольно сложны в плане предварительной пробоподготовки, требуют использования сложной и дорогой аппаратуры, высококвалифицированного персонала и, в связи с этим, не всегда доступны для рядовых аналитических лабораторий и мониторингового контроля. Оптические спектроскопические методы, с учетом их относительной простоты и дешевизны аппаратуры, вполне могут обеспечить требуемую чувствительность и селективность определений, что позволяет рассматривать их в качестве альтернативы хроматографическим методам.

Оптическая абсорбционная спектроскопия позволяет исследовать зависимости интенсивности поглощения света от длины волны, исходного (первичного) излучения. При этом используется инфракрасное, видимое и ультрафиолетовое излучение. Абсорбционная спектроскопия в каждом спектральном диапазоне имеет свои особенности. Этим методом получена обширная информация о микроструктуре биообъектов на атомном и молекулярном уровнях. Особенность оптической абсорбционной спектроскопии состоит в том, что большинство структурно организованной материи резонансно взаимодействует с электромагнитным полем именно в оптическом диапазоне частот. Поэтому именно оптическая абсорбционная спектроскопия широко используется в настоящее время для получения информации о биологических веществах.

Кроме абсорбционной спектроскопии, в настоящее время широко используется спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света, а также фотолюминесцентная (ФЛ) спектроскопия. В дальнейшем мы остановимся на особенностях различных видов спектроскопии и их применении в медико-биологических исследованиях.

Быстрое развитие методов оптической спектроскопии в последние годы послужило причиной появления огромного количества направлений в биологии и медицине. В настоящее время оптические спектральные методы являются незаменимыми при решении широкого круга исследовательских и прикладных задач.

2.1. Общая характеристика и классификация спектроскопических методов анализа

2.1.1. Природа и свойства электромагнитного излучения

Электромагнитные волны характеризуются напряжённостью электрического поля \vec{E} и магнитной индукцией \vec{B} , периодически изменяющихся со временем с круговой частотой $\omega = 2\pi f$. Частота $f = (1/T)$, T -период колебаний. Векторы \vec{E} и \vec{B} в электромагнитной волне перпендикулярны друг другу и перпендикулярны направлению распространения волны, задаваемому волновым вектором волны \vec{k} и вектором фазовой скорости волны \vec{V} (см. рис. 2.1). Электромагнитное излучение имеет двойственную природу и обладает как волновыми, так и корпускулярными (дискретными) свойствами.

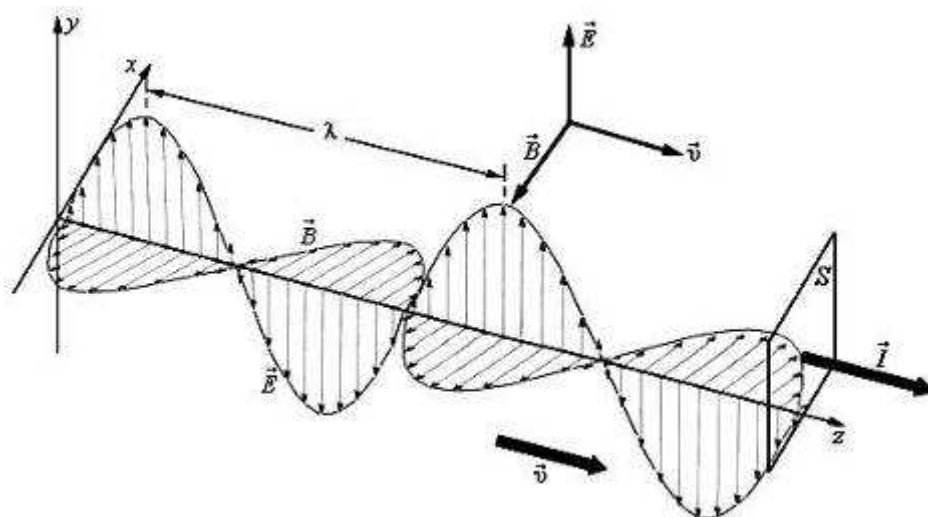


Рис.2.1. Распространение электромагнитной волны

В отличие от других типов волн, электромагнитные волны могут распространяться как в материальных средах, так и в вакууме. Для описания

свойств электромагнитной волны необходимо задать ряд параметров, среди которых отметим следующие.

Длина волны λ – расстояние, которое проходит волна за один период её колебаний (расстояние между двумя последовательными максимумами напряжённости электрического поля или индукции магнитного поля). Длина волны может измеряться в метрах (м). Используются также кратные единицы – нанометр ($1 \text{ нм} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ м}$) или микрометр ($1 \text{ мкм} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ м}$).

Частота $f = (1/T)$ – число колебаний в 1 секунду. Частота измеряется в герцах ($1 \text{ Гц} = 1 \text{ с}^{-1}$) или в кратных единицах; например, $1 \text{ МГц} = 1 \cdot 10^6 \text{ Гц}$. Длина волны в материальной среде и частота колебаний связаны между собой следующим соотношением:

$$\lambda = f V, \quad (2.1)$$

где V – фазовая скорость распространения волны в данной среде. Для электромагнитной волны имеет место

$$V = c / n, \quad (2.2)$$

где c – скорость света в вакууме ($2,99792 \cdot 10^8 \text{ м/с}$), n – показатель преломления среды.

В соответствии с соотношениями (2.1), (2.2) длина волны в вакууме λ_0 связана с длиной волны в материальной среде соотношением

$$\lambda = \lambda_0 / n \quad (2.3)$$

Таким образом, длина волны электромагнитного излучения изменяется при переходе излучения из вакуума в материальную среду, но частота излучения $\omega = 2\pi f$ остаётся неизменной. Скорость излучения в воздухе всего на 0,03% отличается от « c », что обычно не учитывается при распространении процессов в воздушной среде. В спектроскопии часто для описания спектров используют волновое число, т.е. величину ν , обратную длине волны λ_0 в вакууме: $\nu = (1/\lambda_0)$. Величина ν обычно измеряется в см^{-1} . Эта величина непосредственно связана с частотой электромагнитной волны и энергией фотонов – квантов электромагнитного излучения:

$$E = \hbar \omega = \hbar c k_0 = \hbar \frac{2\pi c}{\lambda_0} = \hbar 2\pi \nu. \quad (2.4)$$

Здесь введена постоянная Планка, $\hbar = 1,05 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot \text{сек}$, задающая связь между круговой частотой электромагнитной волны и энергией соответствующего фотона – кванта света (k_0 – модуль волнового вектора в вакууме). Наиболее часто понятие волнового числа используют в ИК- и КР-спектроскопии.

Таким образом, при квантовом описании электромагнитного излучения его рассматривают как поток фотонов-частиц, обладающих определенной энергией (E), зависящей от частоты $\omega=2\pi f$ электромагнитного излучения. Импульс каждого фотона связан с волновым вектором электромагнитной волны и соответствующей частотой известным соотношением:

$$p = \hbar k = \hbar \frac{\omega}{c} = \hbar \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{h}{\lambda} = \frac{h\nu}{c} \quad (2.5)$$

Кроме основной единицы энергии (Джоуля), в спектроскопии часто используют внесистемные единицы: электрон-вольт ($1\text{эВ} = 1,6022 \cdot 10^{-19}$ Дж), см^{-1} ($1\text{эВ}=8066 \text{ см}^{-1}$) и Герцы ($\text{см}^{-1} = 3 \cdot 10^{10}$ Гц). Согласно соотношению (2.5), чем больше длина волны электромагнитного излучения (меньше частота колебаний), тем меньше энергия соответствующих квантов света.

Мощность излучения P (Вт) определяется энергией излучения, которое попадает на данную площадь в единицу времени:

$$P = \frac{dE}{dt} \quad (2.6)$$

Интенсивность излучения I ($\text{Вт} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{ср}^{-1}$) определяется мощностью, отнесенной к телесному углу Ω , в котором распространяется излучение, и к единице площади:

$$I = \frac{dE}{dt d\Omega dS} \quad (2.7)$$

Мощность и интенсивность излучения пропорциональны квадрату амплитуды E световой волны:

$$I \sim E^2 \quad (2.8)$$

2.1.2. Спектры электромагнитного излучения

Спектр электромагнитного излучения, возникающего в веществе (вторичного излучения), характеризует зависимость его интенсивности от частоты ω или длины волны λ_0 падающего на исследуемое вещество из вакуума (воздуха) электромагнитного излучения (первичного излучения). В абсорбционной и эмиссионной спектроскопии в качестве спектров поглощения или испускания часто используется зависимость между числом поглощённых в веществе или возникающих в веществе квантов излучения и энергией квантов света, падающих на вещество (см. рис.2.2).

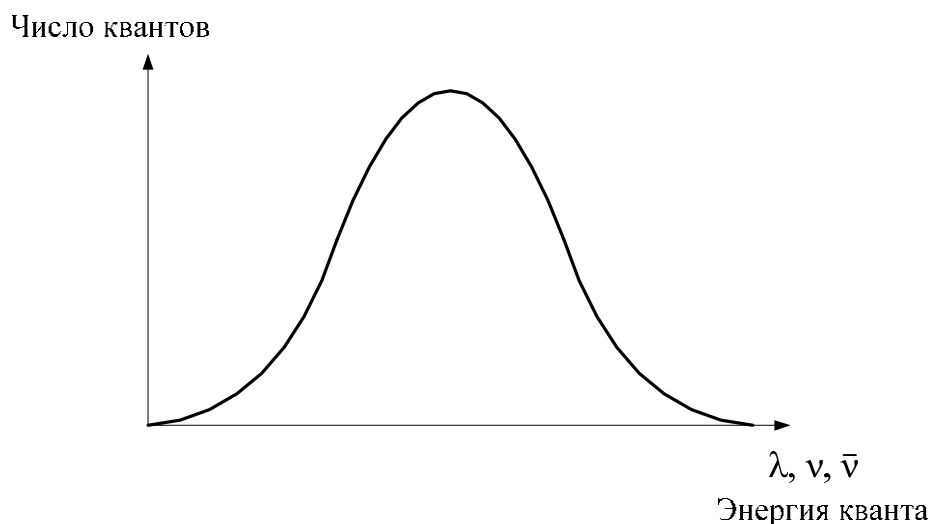


Рис.2.2. Спектр (поглощения, испускания) в спектроскопических методах анализа

Спектры испускания можно представлять также в виде зависимости интенсивности излучения тела от частоты, а спектром поглощения – в виде зависимости интенсивности поглощаемого в веществе излучения от частоты первичного излучения. Вид спектров испускания и спектров поглощения тел зависит от многих факторов. В частности, спектр испускания определяется составом излучающего вещества, его агрегатным состоянием, температурой, концентрацией компонентов. Спектр поглощения зависит от состава и концентрации исследуемого вещества, его агрегатного состояния и температуры, а также от толщины поглощающего слоя.

При изучении спектров испускания и поглощения было обнаружено, что атомные спектры имеют линейчатый характер.

Линейчатые спектры имеют следующие свойства:

- 1) для одного и того же химического элемента расположение спектральных линий одинаково для спектров испускания и спектров поглощения и не зависит от температуры;
- 2) относительная интенсивность различных линий зависит от температуры, а для спектров поглощения также от спектрального состава поглощаемого излучения;
- 3) расположение спектральных линий в спектрах разных элементов различно;
- 4) положение спектральных линий изменяется при соединении атомов в молекулы;

5) переход вещества в конденсированное состояние сопровождается превращением линейчатых спектров в непрерывные.

Спектры испускания и спектры поглощения каждого химического элемента имеют много линий, в расположении которых, на первый взгляд, не видно никакого порядка. Однако в результате многочисленных наблюдений удалось установить, что частоты всех линий спектра испускания или спектра поглощения простейшего из атомов – атома водорода – описываются формулой Бальмера:

$$f = R \left(\frac{1}{n_1^2} - \frac{1}{n_2^2} \right), \quad (2.10)$$

где f – частота излучения; $R = \frac{me^4}{8\epsilon_0^2 h^3} \approx 3,291 \cdot 10^{15} \text{ с}^{-1}$ – постоянная Ридберга (m , e – соответственно масса и заряд электрона; ϵ_0 – диэлектрическая постоянная вакуума); n_1, n_2 – целые числа ($n_1=1, 2, 3, \dots$; $n_2 = n_1 + 1, n_1 + 2, n_1 + 3, \dots$).

Если $n_1=1$ (минимальное значение n_1 , соответствующее минимальной возможной энергии электрона в атоме водорода), то обозначив $n_2 = n = 2, 3, 4, \dots$, получим:

$$f = R \left(1 - \frac{1}{n^2} \right) \quad (2.11)$$

Тогда формулу (2.10) можно представить в следующем виде:

$$f = f_{n_2, n_1} = f_{n_2} - f_{n_1} \quad f = f_{n_2, n_1} = f_{n_2} - f_{n_1}. \quad (2.12)$$

т.е. каждую спектральную частоту атома водорода можно представить как разность двух частот из набора f_n , соответствующего формуле (2.11).

Дальнейшие исследования показали, что соотношение типа (2.10) справедливо для спектров любых атомов. Для спектра испускания или поглощения любого атома вещества можно подобрать такой набор частот f_1, f_2 , что частота каждой спектральной линии оказывается равной разности двух частот из этого набора. В этом заключается комбинационный принцип Ритца. Частоты f_1, f_2, \dots называют спектральными термами (иногда спектральными термами называют соответствующие волновые числа ν_1, ν_2, \dots ($\nu = f/c$)).

Из принципа Ритца следуют простые связи между наблюдаемыми спектральными частотами, например:

$$f_{31} \equiv f_3 - f_1 \equiv (f_3 - f_2) + (f_2 - f_1) = f_{32} + f_{21}. \quad (2.13)$$

Эти связи имели место во всех изученных атомных спектрах.

Происхождение принципа Ритца было непонятно и находилось в противоречии с классической физикой. Согласно классическим представлениям

вращающиеся вокруг ядра электроны должны излучать на всех частотах, т. е. испускать электромагнитные волны с непрерывным, а не дискретным спектральным составом. В 1913 году Н.Бор объединил представления о квантах электромагнитного излучения с энергетическим спектром атома.

Энергетическим спектром квантовой системы называют совокупность всех возможных значений энергии, которую может иметь эта система. Если спектр дискретен, то каждое значение энергии в нем называют энергетическим уровнем, или просто уровнем системы. Самый низкий уровень энергии называют основным, а все остальные – возбужденными. Н.Бор связал с каждым спектральным термом f_n энергию E_n , воспользовавшись формулой Планка (2.5):

$$E_n = h f_n = \hbar \omega_n, \quad (2.14)$$

где $\omega_n = 2\pi f_n$ – круговая частота.

Н.Бор предположил, что энергетический спектр электронных возбуждений каждого атома состоит только из значений энергии, задаваемых соотношением (2.14). При движении электрона с заданной энергией не происходит излучения квантов света. При переходе электрона с одного энергетического уровня на другой происходят процессы излучения или поглощения световых квантов, энергия которых равна разности энергий соответствующих спектральных термов:

$$\hbar \omega = E_n - E_m. \quad (2.15)$$

Дискретный спектр присутствует в атомах для электронов, связанных кулоновскими силами с атомным ядром. Спектр электрона, оторвавшегося от атома, становится непрерывным. После отрыва электрона изменяется также спектр образовавшегося из атома положительно заряженного иона, по сравнению со спектром нейтрального атома данного элемента.

В результате взаимодействия между атомами формируются молекулы. В молекулах возникают два дополнительных вида движения: колебательные движения атомов (ионов) вблизи положений равновесия и вращательные движения молекулы как единого целого. Полную внутреннюю энергию E такой молекулярной системы можно представить в виде суммы энергий трех видов движения – электронного $E_{эл}$, колебательного $E_{кол}$ и вращательного $E_{вр}$:

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр}. \quad (2.16)$$

Приближенное разделение внутренней энергии возможно вследствие того, что энергии различных типов отличаются примерно на два порядка:

$$E_{эл} : E_{кол} : E_{вр} \approx 10^4 : 10^2 : 1. \quad (2.17)$$

Таким образом, после образования молекулы возникают еще два вида дискретных спектра – колебательный и вращательный. Энергия колебательных переходов, обусловленная движением ядер молекулы в эффективном потенциале, создаваемом электронной подсистемой, значительно меньше энергии переходов между электронными уровнями. Такие переходы соответствуют ИК области спектра. В свою очередь энергии вращательных переходов лежат в микроволновой области.

На рис. 2.3 приведена энергетическая диаграмма переходов в конденсированных молекулярных средах, происходящих в инфракрасном (ИК), видимом и ультрафиолетовом (УФ) диапазонах. Энергетические уровни изображены горизонтальными линиями. При этом вращательное движение молекул не учитывается. Расстояние между любыми двумя линиями пропорционально энергии возбуждения. Стрелками показаны возможные направления энергетических переходов, соответствующие возбуждению квантовой системы. Обратное направление стрелок соответствует испусканию квантов электромагнитного излучения материальной средой. Значение энергии E_0 соответствует основному электронному состоянию системы; значения E_1 , E_2 соответствуют возбужденным электронным состояниям. Уровни энергии, обозначенные

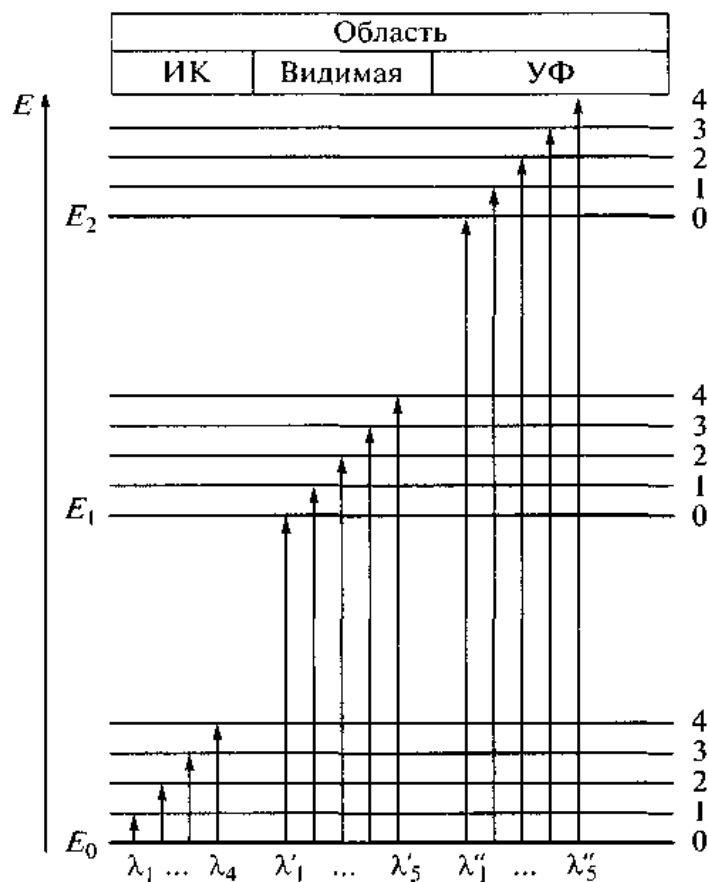


Рис. 2.3. Энергетическая диаграмма переходов между электронно-колебательными уровнями энергии молекулы

цифрами 0, 1, 2, 3, 4, соответствуют колебательным уровням энергии атомов, колеблющихся вблизи положения равновесия; длины волн переходов между колебательными уровнями основного электронного состояния обозначены как $\lambda_1, \lambda_2, \dots$; длины волн переходов из основного электронного уровня на первое возбужденное электронное состояние обозначены как $\lambda'_1, \lambda'_2, \dots$; длины волн переходов из основного электронного уровня на второе возбужденное электронное состояние – как $\lambda''_1, \lambda''_2, \dots$.

2.1.3. Классификация спектроскопических методов анализа

Спектральный анализ включает в себя совокупность методов качественного и количественного определения состава веществ, основанных на исследовании спектров испускания, поглощения, люминесценции, отражения и рассеяния электромагнитного излучения. Различают атомный и молекулярный спектральный анализ. Задача этих методов заключается в определении элементного и молекулярного состава вещества. Эмиссионный спектральный анализ проводят по спектрам испускания атомов, ионов или молекул, возбужденных различными способами. Абсорбционный спектральный анализ основывается на спектрах поглощения электромагнитного излучения анализируемыми объектами.

В зависимости от цели исследования, свойств анализируемого вещества, специфики спектров, области длин волн и других факторов ход анализа, аппаратура, способы измерения спектров и метрологические характеристики результатов сильно различаются. В соответствии с этим спектральный анализ подразделяют на ряд самостоятельных методов, в частности, на атомно-абсорбционный анализ, атомно-флуоресцентный анализ, люминесцентный анализ, инфракрасную (ИК) спектроскопию, спектроскопию комбинационного рассеяния (КР), молекулярную оптическую спектроскопию, спектроскопию отражения, спектрофотометрию, ультрафиолетовую (УФ) спектроскопию, фотометрический анализ, Фурье-спектроскопию, рентгеновский спектральный анализ.

В основе спектроскопических методов (или спектрального анализа) лежат следующие процессы.

1. Взаимодействие исследуемого вещества с электромагнитным излучением, приводящее к частичному поглощению (абсорбции) этого излучения.
2. Возбуждение электронно-колебательных состояний исследуемой материальной среды внешним (первичным) электромагнитным излучением и по-

следующее испускание квантов вторичного излучения с изменённой длиной волны. Такой процесс называется фотолюминесценцией.

3. Самопроизвольная эмиссия (испускание) излучения анализируемым веществом, находящимся в состоянии плазмы: в пламени горелки или в электрическом дуговом, искровом или высокочастотном разряде .

4. Рассеяние падающего на исследуемое вещество первичного электромагнитного излучения анализируемым веществом.

В абсорбционных спектроскопических методах через исследуемый образец пропускают электромагнитное излучение определённой длины волны. Если в данном образце имеются частицы, способные поглощать такое электромагнитное излучение, то интенсивность выходящего излучения становится меньше интенсивности исходного излучения, падающего на образец. Практически в абсорбционных методах анализа сравнивают интенсивность электромагнитного излучения, прошедшего через образец и падающего на его поверхность (рис. 2.4, *а*).

В эмиссионных спектроскопических методах исследуемые частицы тем или иным образом переходят в возбуждённое состояние. При возвращении в основное состояние они испускают электромагнитное излучение, интенсивность которого и измеряется (рис 2.4, *б*). Переход частицы в возбуждённое состояние может происходить как в результате воздействия на неё энергии электромагнитного излучения (например, при фотолюминесценции), так и в результате воздействия других видов энергии (например, при нагревании в пламени).

Люминесцентная спектроскопия основана на анализе спектров излучения материальных сред, которые предварительно возбуждают (в отличие от эмиссионных методов) лазерным излучением или каким-либо другим способом, например в результате химической реакции (хемилюминесценция). Взаимодействие квантов электромагнитного излучения с веществом может быть упругим или неупругим. При упругом взаимодействии энергия квантов электромагнитной волны остается неизменной, но изменяется их импульс и направление распространения. К числу спектроскопических методов, основанных на упругом взаимодействии, относят рефрактометрические методы анализа.

При неупругом взаимодействии происходит обмен энергией между квантами первичного излучения и молекулами вещества. При этом изменяется как внутреннее состояние анализируемых молекул, так и энергия квантов (длина волны) вторичного излучения, возникающего в молекулярной среде.

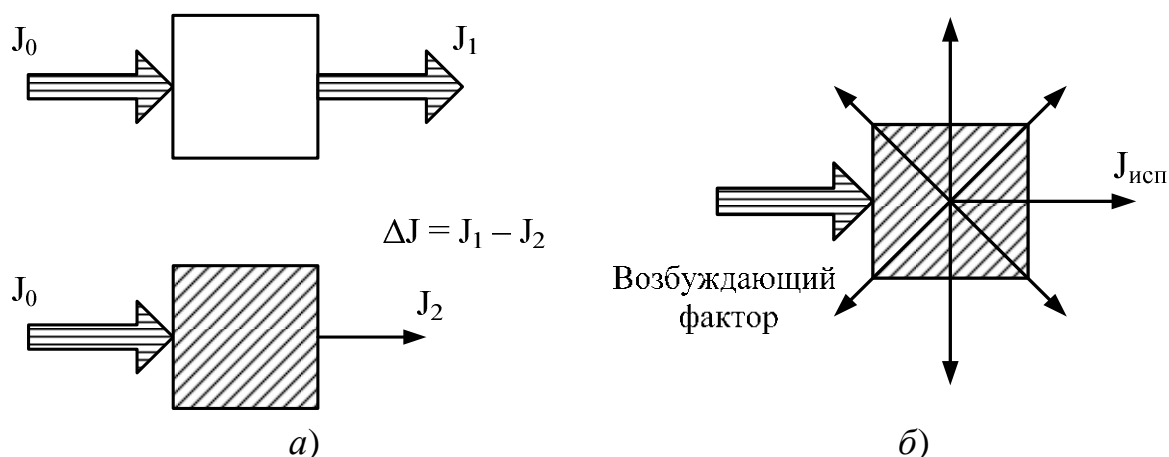


Рис. 2.4. Принципиальная схема абсорбционных (а) и эмиссионных (б) спектроскопических методов анализа

В зависимости от типа материальных сред, взаимодействующих с электромагнитным излучением, спектроскопические методы анализа разделяют на атомные и молекулярные. Атомные и молекулярные спектроскопические методы отличаются друг от друга характером получаемых спектров, используемой аппаратурой и кругом решаемых задач. Задачей атомного спектрального анализа является установление элементного состава вещества. Одним из наиболее мощных методов элементного анализа является атомно-эмиссионный спектральный анализ, изучающий спектры испускания свободных атомов и ионов в газовой фазе. Молекулярный спектральный анализ предполагает идентификацию данного вещества и определение его количества (концентрации).

Совокупность спектральных методов качественного и количественного анализа, основанных на изучении спектров поглощения электромагнитного излучения исследуемым веществом, называют спектроскопией поглощения, или абсорбционной спектроскопией. Абсорбционные методы основаны на измерении интенсивности поглощения излучения анализируемым веществом при неупругом взаимодействии.

Фотометрический анализ – один из разновидностей молекулярного абсорбционного спектрального анализа. Здесь регистрируют поглощение излучения в видимой, ИК и УФ областях спектра молекулами определяемого компонента (или его соединениями с подходящим реагентом). Фотометрический анализ включает визуальную фотометрию, или колориметрический анализ, спектрофотометрию и фотоколориметрию.

Фотоколориметрия отличается от спектрофотометрии тем, что поглощение света измеряют обычно в видимой области спектра, реже – в ближних УФ и ИК областях (длины волн $\lambda = 315 - 980$ нм). Инструментальное отличие этих методов состоит также в том, что для выделения нужного участка спектра (обычно шириной 10 – 100 нм) в фотоколориметрическом методе используют узкополосные светофильтры, тогда как в спектрофотометрии применяют монохроматоры, что повышает точность метода.

В спектроскопических методах анализа используется практически весь диапазон электромагнитного излучения: от γ - излучения до радиоволн. Классификация спектроскопических методов анализа в зависимости от используемого электромагнитного излучения и вызываемых им процессов приведена в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Классификация спектроскопических методов анализа в зависимости от используемого электромагнитного излучения (ЭМИ)

Используемая область ЭМИ		Длина волны (λ)	Вызываемый процесс	Метод анализа
γ - излучение		10 ⁻⁴ - 0,1 нм	ядерные реакции	нейтронно-активационный анализ
рентгеновское		0,1-10 нм	изменение энергии внутренних электронов	рентгеновская спектроскопия
УФ - излучение	оптический диапазон	200-400 нм	изменение энергии валентных электронов	УФ - спектроскопия
Видимое излучение		400-750 нм	то же	спектроскопия в видимой области
ИК-излучение		10 ⁻⁶ -10 ⁻³ м	изменение колебательного состояния молекулы	ИК - спектроскопия
микроволновое		10 ⁻³ - 10 ⁻¹ м	изменение вращательного состояния молекулы	микроволновая спектроскопия
радиоволны		10 ⁻¹ - 10 м	электронно-спиновые переходы ядерно-спиновые переходы	спектроскопия ЭПР спектроскопия ЯМР

Все виды электромагнитного излучения имеют общую природу, так как представляют собой потоки фотонов различных энергий. Поэтому между различными спектроскопическими методами анализа имеется много общего.

Вместе с тем, различные виды электромагнитного излучения по-разному взаимодействуют с веществом. Поэтому каждый спектроскопический метод анализа имеет свою область применения, свою аппаратуру, особенности обработки детектируемых сигналов и т.д.

В процессе спектрального анализа получают аналитическую зависимость интенсивности вторичного излучения от энергии, частоты, длины волны или волнового числа первичного излучения.

Спектральные методы анализа в сочетании с методами разделения и концентрирования изучаемого вещества – интенсивно развивающаяся область инструментальных методов анализа. Они позволяют проводить экспрессное детектирование ультрамикрочастиц вещества (вплоть до одиночных атомов и молекул).

Как видно из таблицы 2.1, УФ - излучение, видимое излучение и ИК - излучение относятся к оптическому диапазону электромагнитного излучения, т.е. к так называемой оптической спектроскопии.

2.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света

2.2.1. Теория явления КР

Спектроскопия КР (рамановская спектроскопия) – раздел оптической спектроскопии, изучающий неупругое взаимодействие монохроматического излучения с веществом. Монохроматический свет, падающий на образец, может быть отражен, поглощен или рассеян. Процесс рассеяния света может быть упругим (то есть происходить без обмена энергией между квантами света первичного излучения и молекулой или кристаллом) и неупругим (когда часть энергии квантов света передаётся молекуле или забирается у неё). Упругое рассеяние света называется Релеевским рассеянием. Релеевское рассеяние происходит без изменения частоты рассеянного света (по сравнению с падающим – первичным излучением). Неупругое рассеяние света называется комбинационным рассеянием (КР), или Раман-эффектом (рамановским рассеянием). Сущность же комбинационного рассеяния состоит в появлении в спектре рассеянного света новых линий с частотами, являющимися комбинациями частот падающего излучения и собственных частот молекулы или кристалла (колебательных и вращательных).

Эффект комбинационного рассеяния (КР) света был открыт в 1928 году советскими учеными Г. С. Ландсбергом и Л. И. Мандельштамом при исследовании рассеяния света в кристаллах и одновременно индийскими учеными Ч.

В. Раманом и К. С. Кришнаном при исследовании рассеяния света в жидкостях. Поэтому в зарубежной литературе комбинационное рассеяние света обычно называют Раман-эффектом.

При комбинационном рассеянии электромагнитное излучение и материальная среда (молекула, кристалл) обмениваются энергией. В результате частота рассеянного света может как уменьшаться (при этом энергия переходит от света к веществу), так и увеличиваться (при этом энергия переходит от вещества к свету). В первом случае говорят о стоксовом КР, во втором – об антистоксовом КР. Рассеяние можно рассматривать как очень быстрый процесс поглощения и дальнейшего испускания фотона. Это происходит, если энергия фотона первичного излучения меньше энергии перехода между основным и первым возбуждённым электронным состоянием. При этом молекула не может перейти в устойчивое возбужденное электронное состояние, но переходит в возбужденное состояние лишь на очень короткое время, испуская после этого квант света, энергия которого отличается от энергии падающего кванта на величину потерянной или приобретённой молекулой энергии. При Релеевском рассеянии молекула поглощает фотон из нулевого колебательного уровня и на него же переходит после излучения. При стоксовом КР молекула переходит с основного электронного состояния на возбуждённый колебательный уровень. При антистоксовом КР молекула перед процессом рассеяния уже находится в возбуждённом колебательном состоянии, а после процесса рассеяния переходит в основное состояние. (см. рис.2.5).

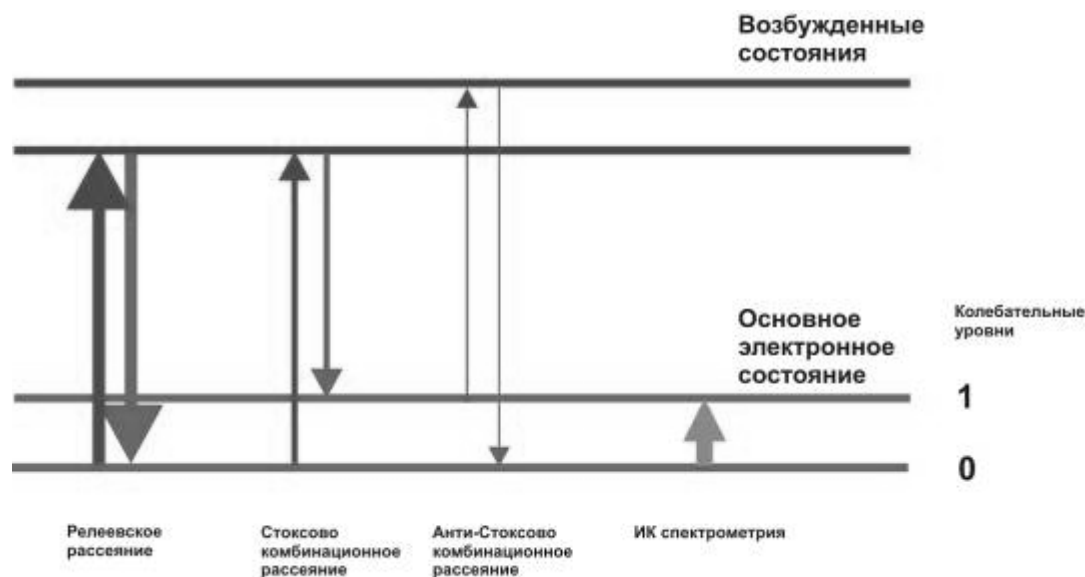


Рис. 2.5. Процесс переходов молекулы при релеевском и комбинационном рассеянии света

Спектроскопия КР широко используется в разных областях науки и техники как аналитический метод. Спектры КР позволяют судить о структуре и фазовом составе объекта, не повреждая исследуемый образец.

Спектры КР каждого соединения настолько специфичны, что могут служить для идентификации этого соединения и обнаружения его в смесях. Качественный и количественный анализ по спектрам КР широко применяют в аналитической практике, особенно при анализе органических материалов (рис. 2.6) [41].

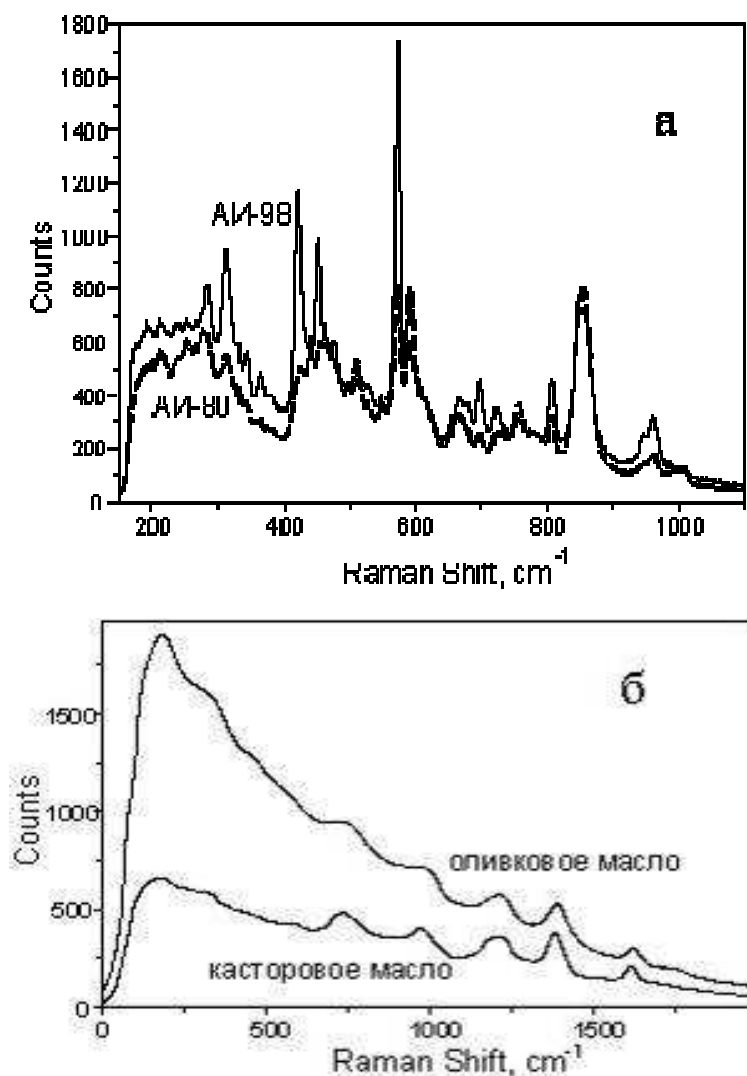


Рис.2.6. Спектры комбинационного рассеяния продуктов органической природы: а – бензин разной марки; б – масло различного происхождения [41]

Спектры КР большинства органических молекул состоят из линий, отвечающих деформационным и валентным колебаниям химических связей углерода (С) с другими элементами, как правило, водородом (Н), кислородом (О) и азотом (N), а также характеристическим колебаниям различных функ-

циональных групп (гидроксильной -ОН, аминогруппы -NH₂ и т.д.). Эти линии проявляются в диапазоне от 600 см⁻¹ (валентные колебания одинарных С-С связей) до 3600 см⁻¹ (колебания гидроксильной -ОН группы). Кроме того, в спектрах органических молекул в диапазоне 250 - 400 см⁻¹ проявляются деформационные колебания алифатической цепи. В отличие от ИК спектра, в котором проявляются линии, отвечающие колебательным переходам с изменением дипольного момента, в спектре КР проявляются линии, отвечающие колебательным переходам с изменением поляризуемости молекулы. Таким образом, ИК- и КР-спектроскопия являются не исключающими, а взаимно дополняющими спектроскопическими методами.

Остановимся на теоретическом описании явления КР. Современная квантово-механическая теория КР позволяет объяснить основные экспериментальные факты. Вместе с тем, наиболее общие закономерности могут быть получены также на основе использования классического описания процессов взаимодействия электромагнитного излучения с веществом.

При прохождении электромагнитной волны в веществе индуцируется дипольный момент \vec{p} за счет смещения электронов в поле волны от положения равновесия. В случае, когда частота излучения лежит значительно выше частот колебательных резонансов и значительно ниже частот электронных резонансов, дипольный момент прямо пропорционален электрическому полю [42]:

$$p_i = \alpha_{ij} E_j = \epsilon_{ij} \tilde{E}_j \cos(\omega t), \quad (2.18)$$

где α_{ij} – тензор электрической поляризуемости молекулы, $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \frac{\Phi}{\text{м}}$.

В этом выражении подразумевается суммирование по повторяющимся индексам. При физическом описании говорят, что дипольный момент появляется за счет смещения заряженного электронного облака относительно ядер. При взаимодействии со светом относительно легкое электронное облако следует за падающим полем, а более тяжелые ядра в первом приближении остаются неподвижными. При таком описании α_{ij} на любой частоте является просто константой, значение которой определяется молекулой или элементарной ячейкой. Эта поляризуемость ответственна за показатель преломления среды на частотах, лежащих выше резонансных частот ионных колебаний. Однако предположение о том, что ядра остаются абсолютно неподвижными, не совсем корректно, так как некоторая часть поглощенной электронами энергии вследствие движения электронного облака передается ядрам. В результате яд-

ра начинают осциллировать относительно положения равновесия. При колебании ядер электронная поляризуемость изменяется, так как меняется ядерная конфигурация. Математически это можно описать, разлагая электронную поляризуемость в ряд Тейлора по нормальным координатам Q колебания ядер. Этот метод был первоначально предложен Плачеком [43] и приводит, с учетом того, что колебания ядер должны происходить по гармоническому закону, к следующим выражениям:

$$\alpha_{ij} = \alpha_{ij}^0 + \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)_0 Q + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q^2} \right)_0 Q^2 + \dots, \quad (2.19)$$

где ω_k – частота колебаний, а $\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)_0$ – значение производной, вычисленное для равновесного положения ядер.

Подстановка (2.19) в (2.18) дает:

$$p_i = \alpha_{ij}^0 \tilde{E}_j \cos(\omega_k t) + \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q} \right)_0 \tilde{Q} \cdot \tilde{E}_j \cos(\omega_k t) + \dots \quad (2.20)$$

Из этого выражения видно, что при колебаниях молекул изменения электронной поляризуемости приводят к появлению дипольных моментов, которые обуславливают появление двух линий излучения, одна из которых имеет частоту выше, а другая – ниже частоты возбуждающего излучения. Обе они смещены на величину, которая соответствует частоте колебаний. Это и есть генерация тех смещенных линий, которые составляют эффект КР.

Как следует из (2.20), наличие или отсутствие эффекта КР зависит от изменения поляризуемости как функции смещений, а, следовательно, от симметрии колебаний для данного типа молекул. Таким образом, правила отбора для спектров КР молекул и кристаллов можно получить, используя теорию групп [44-47]. В рассмотренном изложении мы не учитывали высшие члены разложения в (2.19). Учет членов второго порядка приведет к появлению в спектре рассеяния линий с удвоенной частотой нормальных колебаний, а также к комбинации частот двух различных колебаний. Но интенсивность этих линий существенно меньше, чем линий, соответствующих первым членам разложения.

Выводы классической теории показывают, что интенсивность стоксовых и антистоксовых компонентов спектра должна быть одинаковой, поскольку в равной мере возможна как модуляция с увеличением частоты, так и модуляция с ее уменьшением. Однако количественные данные эксперимента не согласуются с этими выводами классической теории КР: опыт показывает,

При квантовом описании явления КР [48] электромагнитное излучение рассматривается как поток квантов определенной энергии, взаимодействующих с молекулами или кристаллами. При КР изменение частоты первичного излучения сопровождается переходом рассеивающихся молекул на другие колебательные и вращательные уровни. Таким образом, КР света можно рассматривать как процесс, состоящий из двух актов, - поглощения кванта $\hbar\omega_e$ первичного света

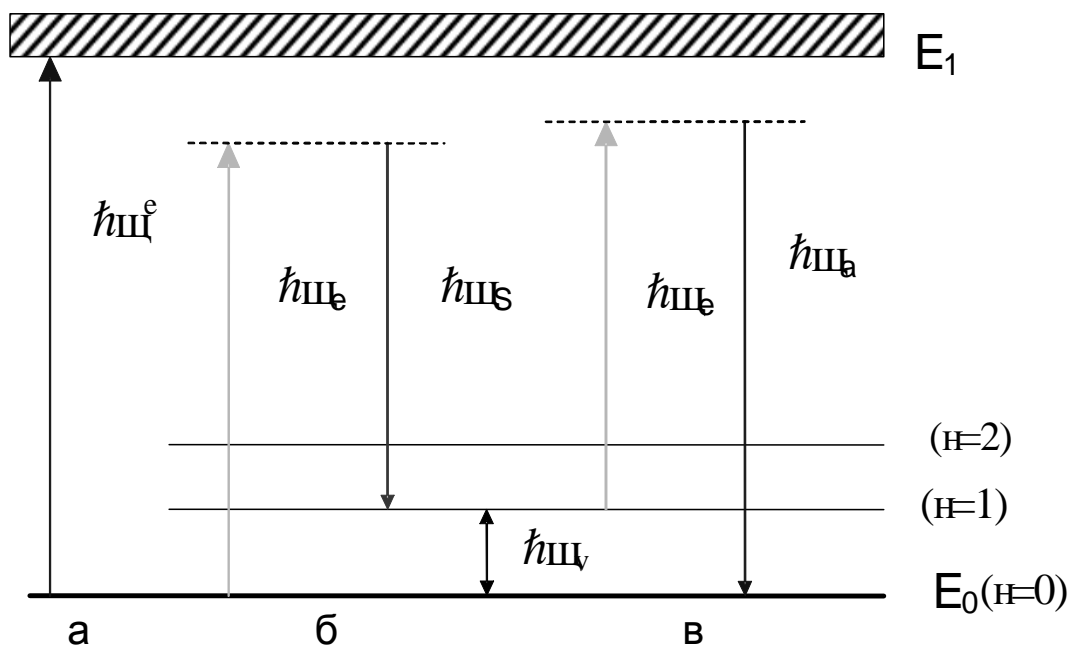


Рис. 2.8. Схема переходов при поглощении и КР:
а – поглощение; б – стоксово КР; в – антистоксово КР

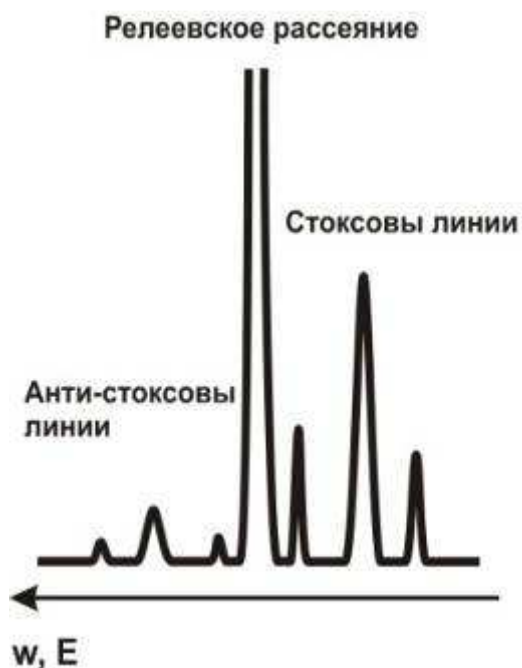


Рис. 2.7. Схематический вид стоксова и антистоксова спектров КР

Соотношение между энергиями падающего и рассеянного фотонов в случае стоксова КР (рис. 2.8, б) имеет вид:

$$\hbar\omega_s = \hbar\omega_e - \hbar\omega_v, \quad (2.21)$$

и в случае антистоксова КР (рис. 2.8, в)

$$\hbar\omega_a = \hbar\omega_e + \hbar\omega_v. \quad (2.22)$$

Здесь $\hbar\omega_v$ равна энергии возбужденного колебательного (или вращательного) состояния молекулы. Таким образом, из квантовой теории КР следует, что в спектре КР должен присутствовать набор линий (полос), отличающихся по частоте от падающего света на величины, равные частотам ω_v внутримолекулярных колебаний. Из квантовой теории КР также может быть определено соотношение интенсивностей стоксовой (I_s) и антистоксовой (I_a) компонент КР. Такое соотношение было получено уже в первых работах Г.С. Ландсберга и Л.И. Мандельштама [49]. Из теории рассеяния известно, что интенсивность рассеяния пропорциональна 4-ой степени частоты света. Отсюда следует, что соотношение интенсивностей между стоксовой и антисто-

ксвой компонентами пропорционально величине $\left[\frac{\omega_e - \omega_v}{\omega_e + \omega_v} \right]^4$. В то же время число молекул, находящихся в состоянии с энергией E , согласно формуле Больцмана, составляет:

$$N_E = N_0 \exp\{-E/k_B T\}, \quad (2.23)$$

где N_0 – общее число молекул в системе; k_B – постоянная Больцмана; T – температура. Таким образом, соотношение стоксова компонента к антистоксову в спектре рассеянного света представляется выражением:

$$\frac{I_s}{I_a} = \left[\frac{\omega_e - \omega_v}{\omega_e + \omega_v} \right]^4 \exp[\hbar\omega_v/k_B T]. \quad (2.24)$$

При высокой температуре показатель экспоненты близок к нулю и интенсивности стоксовой и антистоксовой компонент становятся практически одинаковыми (при малых значениях частотных сдвигов). При низких температурах отношение интенсивностей компонент стремится к бесконечности, т.е. интенсивность стоксовой компоненты существенно не изменяется, а интенсивность антистоксовой компоненты резко падает.

Таким образом, собственные колебания ионов молекулы или кристалла приводят к появлению в спектре рассеянного света дополнительных спутни-

ков (стоксовых и антистоксовых), связанных с этими колебаниями и, следовательно, со структурой вещества. Для молекулы из N атомов количество колебательных степеней свободы равно $3N - 6$, а для линейной молекулы $3N - 5$. В экспериментально наблюдаемых спектрах КР число комбинационных спутников может быть существенно меньше. Это связано с тем, что некоторые типы колебаний (моды) могут быть вырождены, а также в связи с проявлением правил отбора для оптических процессов. Такие правила устанавливаются методами теории групп, учитывающих свойства симметрии структуры молекулы или кристалла.

В случае centrosymmetric молекул имеет место так называемый альтернативный запрет, согласно которому типы колебаний, разрешённые правилами отбора в спектрах КР, запрещены в ИК-спектрах, и наоборот. Теоретико-групповые методы анализа колебательных спектров молекул и кристаллов позволяют выяснить не только активность типов колебаний для различных оптических процессов, но и установить, при каких поляризационных геометриях они должны проявляться в экспериментах.

2.2.2. Лазерная спектроскопия КР

Первые эксперименты по наблюдению КР света в жидкостях и кристаллах были сопряжены с огромными трудностями. Это было связано с чрезвычайно малой интенсивностью комбинационных спутников, возникающих при возбуждении КР спонтанными источниками света. Обычно такими источниками в первых экспериментах служили дуговые ртутные лампы. В результате для получения спектров были необходимы многочасовые, и даже многосуточные экспозиции. Другая трудность состояла в том, что слабый сигнал КР находился сравнительно недалеко по шкале частот от частоты интенсивного возбуждающего излучения. В связи с этим обычные монохроматоры оказались малоэффективными для анализа спектра КР, особенно в области так называемых малых частот, то есть вблизи возбуждающей линии. Таким образом, первые годы после открытия явления КР света основное внимание исследователей было обращено к жидкостям и гораздо меньше к кристаллам. Это связано с тем, что жидкости могут быть хорошо очищены и характеризуются меньшим фоном "паразитного" рассеяния. При этом многие жидкости прозрачны в видимой области спектра, и их спектры КР оказываются достаточно интенсивными.

Важнейшую роль в развитии спектроскопии КР сыграло появление в 60-е годы лазерных источников света. Впервые условия усиления электромаг-

нитных волн при прохождении через вещество сформулировал отечественный физик Фабрикант в 1940 г. Механизм такого усиления основывается на квантовой теории спонтанного и индуцированного (стимулированного) излучения, развитой в начале XX столетия Эйнштейном. Материальные среды, в которых происходит усиление электромагнитных волн, получили название активных. При этом в активной среде оказалось возможным осуществить не только усиление, но и генерацию электромагнитного излучения. Приборы, в которых реализуется генерация электромагнитного излучения, получили название оптические квантовые генераторы, или лазеры. Первые лазеры были созданы Басовым и Прохоровым в СССР и Таунсом в США в середине 50-х годов. При этом осуществлялась генерация электромагнитного излучения в субмиллиметровой области спектра, т.е. в радиодиапазоне. Первый лазер оптического диапазона был создан Мейменом (США) в 1960 г.; при этом активной средой служил синтетический рубин, представляющий собой кристаллы сапфира (Al_2O_3) с примесью хрома.

Применение лазеров позволило снять многие трудности, существовавшие при исследовании КР. В частности, за счет большой спектральной яркости лазеров на несколько порядков были уменьшены времена экспозиции, необходимые для регистрации спектров, упрощены геометрические схемы экспериментов, улучшены условия для проведения температурных и поляризационных экспериментов, уменьшен фон мешающих линий и т.д. Доступными для исследования оказались новые типы объектов, в частности разнообразные кристаллы: диэлектрики, полупроводники и даже металлы. Открылись возможности для анализа дефектности материалов, влияния различных возмущающих факторов (электрического, магнитного полей и т.д.), для исследования неоднородностей в кристаллах, изучения сплавов, тонких пленок, поверхности и т.д.

Первые лазерные источники, использованные для возбуждения спектров КР, характеризовались невысокой средней мощностью. В частности, широко применяемый в спектроскопии КР гелий-неоновый лазер непрерывного действия ($\lambda = 632,8$ нм) имел мощность 10 – 50 мВт [50]. Аргоновый лазер ($\lambda = 488,0$ и 514,5 нм), также широко применявшийся в спектроскопии КР [51-54], работал в непрерывном режиме, но его мощность для типичных лабораторных приборов составляет ~ 1 Вт. Еще одним шагом в развитии спектроскопии КР стало появление твердотельных YAG: Nd^{3+} лазеров с длиной волны излучения 1064 нм [55]. Ввиду высокого КПД (~1%) таких лазеров стало возможным создание компактных лазеров для спектроскопии КР. Однако при использовании лазеров, генерирующих излучение в инфракрасной области,

возникает ряд трудностей, связанных с понижением чувствительности приёмников излучения и отсутствием соответствующей спектральной аппаратуры для анализа спектров в ближнем инфракрасном диапазоне. В связи с этим возникла задача перевода инфракрасного излучения твердотельных лазеров в видимую и ультрафиолетовую области спектра. Решение этой задачи было выполнено путём введения нелинейно-оптических кристаллов в лазерный резонатор, обеспечивающих генерацию, второй, третьей и даже четвёртой оптических гармоник. Соответственно на выходе лазерного резонатора возникает излучение с длинами волн 532, 348 и 266 нм. Особенно эффективно осуществляется перевод исходного инфракрасного излучения лазера в видимый и ультрафиолетовый диапазоны для импульсно-периодического режима работы лазера YAG: Nd³⁺. При этом генерируются короткие (10 нс) лазерные импульсы при достаточно высокой пиковой (10 кВт) и средней (0,1-10 Вт) мощности с большой частотой следования (10 кГц). Соответственно в видимой области спектра для второй оптической гармоники (532 нм) сравнительно легко достигается средняя мощность излучения в несколько сот милливатт. Соответственно для четвёртой оптической гармоники (266 нм) может быть реализована средняя мощность генерации в компактных твердотельных лазерах YAG: Nd³⁺ с двумя нелинейно-оптическими кристаллами внутри резонатора 10-100 мВт. Использование ультрафиолетового излучения особенно ценно для исследований так называемого резонансного комбинационного рассеяния (РКР). В случае РКР частота возбуждающего излучения приближается к полосе фундаментального поглощения исследуемых веществ, в частности, биоактивных препаратов. При этом эффективное сечение КР резко возрастает, что открывает возможности для локального анализа предельно малых количеств вещества.

Новые возможности появились после применения в спектроскопии КР лазеров на парах металлов. Впервые генерация на самоограниченных переходах атомов металлов была получена в 1965 г. [56,57]. К настоящему времени определены основные принципы конструирования лазеров на парах металлов и практически завершены исследования физических процессов, протекающих в их активных средах и определяющих их основные характеристики [58-63]. Ярким представителем лазеров на парах металлов является лазер на парах меди. В настоящее время он является одним из самых мощных и эффективных лазеров в видимой области спектра. С одного активного элемента в таком лазере удастся получить среднюю мощность 100–750 Вт при КПД 1-3% [63,64].

Лазер на парах меди относится к так называемым импульсно - периодическим лазерам на самоограниченных переходах в парах металлов (для таких переходов нижний уровень является долгоживущим, т.е. метастабильным). На

рис. 2.9 приводится энергетическая схема уровней энергии в атоме меди, с указанием соответствующих длин волн в нанометрах и обозначений атомных термов. Конфигурация электронов внешних оболочек в основном состоянии задается в виде $3d^{10}4s$ (в обозначении конфигурации электронов цифры перед буквами указывают главное квантовое число; буквы задают орбитальный момент электрона, цифры в показателе степени - число электронов с заданным орбитальным моментом). Соответственно терм основного состояния есть 2S , т.е. характеризуется спином $1/2$, орбитальным моментом $L = 0$ и полным моментом $I = 1/2$. При переходе атома в возбужденное состояние образуются конфигурации: $3d^94s^2$ и $3d^{10}4p$. Соответствующие термы есть: $^2D_{3/2}$; $^2D_{5/2}$ и $^2P_{1/2}$; $^2P_{3/2}$. Разрешенные оптические переходы указаны стрелками. При этом оптический переход с 2D -терма в основное состояние оказывается запрещенным по орбитальному моменту ($\Delta L=2$). Поэтому такие термы являются "долгоживущими", или метастабильными, т.е. могут существовать в парах металла в течение нескольких миллисекунд. Время жизни атомов на более высоких термах 2P составляет примерно 10^{-8} с и определяется скоростью их распада за счет излучения при переходах в основное 2S -состояние и в метастабильные 2D -состояния.

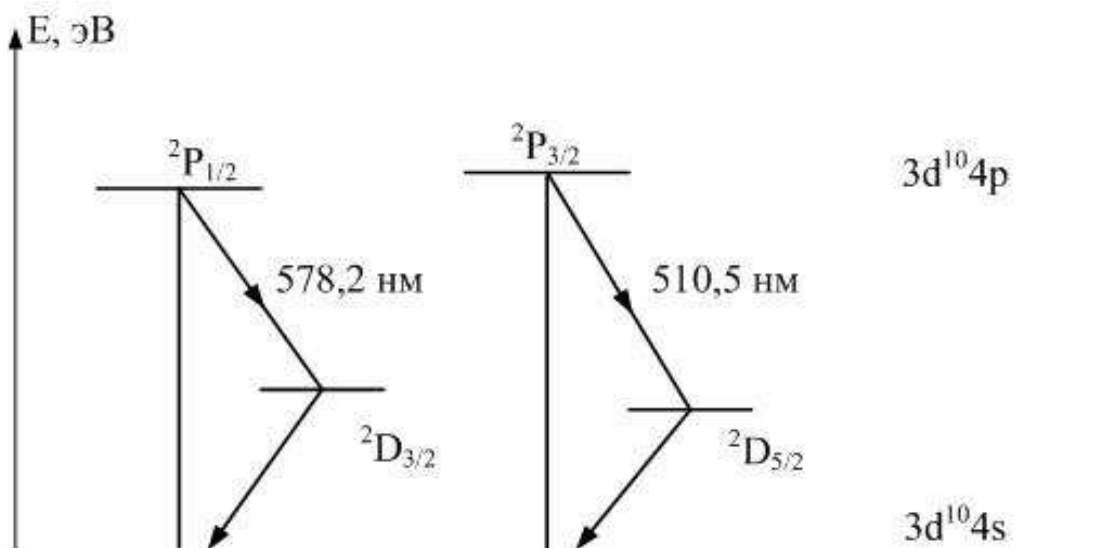


Рис. 2.9. Схема энергетических уровней и оптических переходов в лазере на парах меди

Принципиальная схема устройства активного элемента лазера на парах меди приводится на рис. 2.10. Активный элемент представляет собой вакуумированную металлокерамическую трубку с двумя электродами и оптически-

ми окнами на торцах. Внутри активного элемента имеется тугоплавкий цилиндр из корунда, внутренний диаметр которого составляет 15 мм. Тугоплавкий цилиндр окружен слоем теплоизоляции из порошка двуокиси циркония, характеризующегося низкой теплопроводностью.

Внутри активного элемента присутствует буферный газ - аргон и кусочки рафинированной меди. К электродам активного элемента подводится высокое импульсное напряжение (10 кВ) с помощью блока питания лазера.

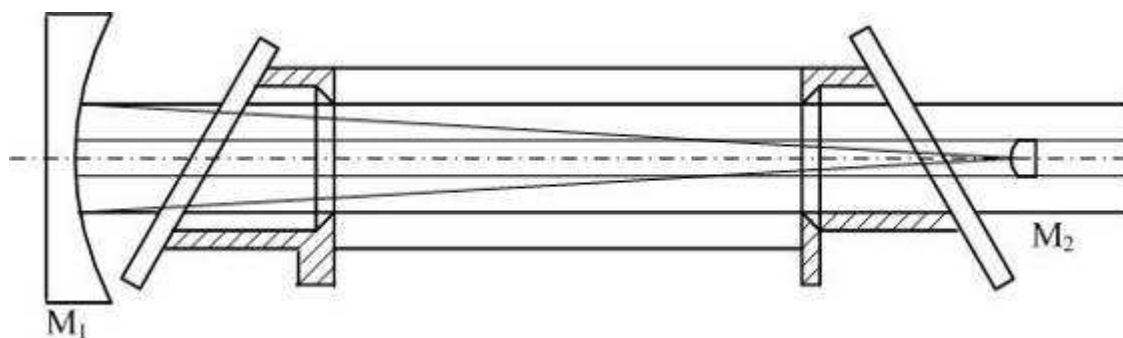


Рис. 2.10. Активный элемент лазера на парах меди

Принципиальная схема блока питания приводится на рис. 2.11. Блок питания лазера на парах меди вырабатывает импульсы высокого напряжения (см. рис.2.12) с крутым фронтом, длительностью 15-20 нс и частотой следования 10^4 Гц. В результате включения блока питания возникает импульсный электрический разряд через буферный газ - аргон. Под действием токов высокой частоты происходит разогревание кусочков меди до высокой температуры с последующим их превращением в пары меди.

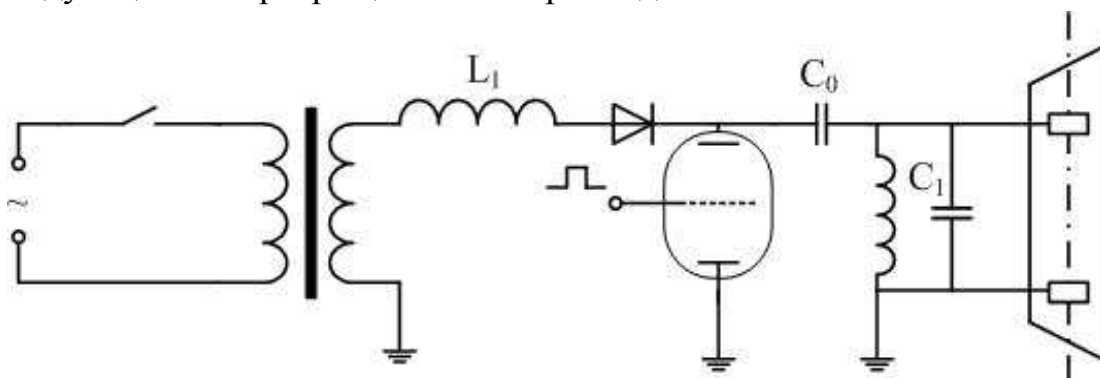


Рис. 2.11. Блок электрического питания лазера на парах меди

В рабочем режиме температура внутри корундовой трубки активного элемента лазера составляет $1800\text{ }^{\circ}\text{C}$; при этом трубка раскаляется до белого свечения. Через 20-25 мин. после начала электрического разряда плотность паров меди оказывается достаточной для начала генерации. Генерация осу-

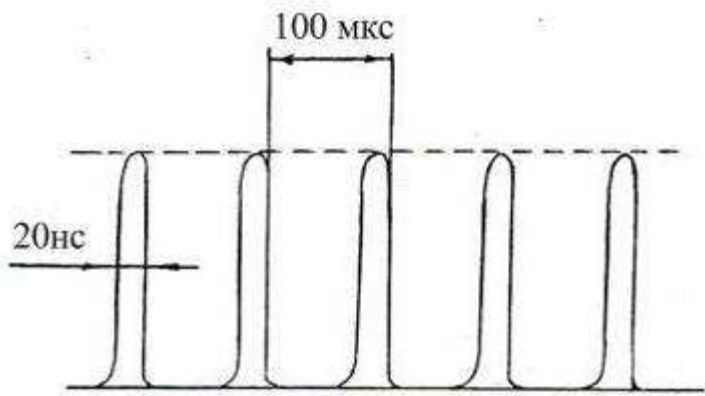


Рис. 2.12. Форма импульса, вырабатываемого электрическим блоком питания

ществляется за счет использования резонатора, показанного на рис. 2.10. При этом используются два сферических зеркала M_1 и M_2 разного диаметра с коэффициентом отражения, близким к 100 %; одно из зеркал является вогнутым (большого радиуса), другое – выпуклым (меньшего радиуса). Центры сфериче-

ских зеркал совмещены в одной точке, так что фактически резонатор представляет собой один из примеров телескопической системы. Такая конфигурация резонатора обеспечивает высокую направленность лазерного излучения. Расходимость лазерного луча при этом обусловлена только дифракционным эффектом; угол расходимости в данном случае оценивается как

$$\varphi \approx \frac{\lambda}{D} = \frac{0.5 \cdot 10^{-6}}{15 \cdot 10^{-3}} = 0.3 \cdot 10^{-4} (\text{ср}) [\text{стерадиан}].$$

Генерация осуществляется на двух длинах волн: $\lambda_1 = 510,6$ нм (зеленая линия) и $\lambda_2 = 578,2$ нм (желтая линия). Длительность импульсов лазерной генерации составляет 20 нс, т.е. существенно меньше длительности импульса электрического разряда. Это связано с тем, что процесс генерации проходит в неравновесном режиме, на переднем фронте электрического импульса.

Одной из важных характеристик лазеров является их коэффициент полезного действия η . Величину η можно определить как отношение выходной мощности генерации оптического излучения к подводимой мощности накачки:

$$\eta = \frac{P_0}{P_H}. \quad (2.25)$$

Средняя мощность электрической накачки лазера на парах меди, используемого в данной работе, составляет порядка 1 кВт. Средняя мощность излучения генерации в обеих линиях составляет 3 Вт. Таким образом, в данном случае $\eta = 0,3\%$. Такое значение КПД оказывается довольно большим по сравнению с другими лазерами непрерывного или квазинепрерывного действия.

Применение лазера на парах меди оказалось весьма эффективным для анализа не только исходного КР, но и более сложных комбинационных оптических процессов. В частности, оказалось возможным весьма эффективно ис-

следовать трехфотонные процессы КР, включая гиперрелеевское и гиперкомбинационное рассеяние света [65].

Одновременно с развитием лазерной техники происходила разработка новых методов регистрации спектров КР. В первых экспериментах наблюдение КР производилось визуально или фотографическим способом. Это позволяло изучать главным образом материалы, прозрачные для возбуждающего и рассеянного излучений, так как в дисперсных (сильно рассеивающих) средах интенсивность рассеяния на несмещенной частоте была настолько велика, что наблюдать слабый сигнал КР было практически невозможно. Однако уже в 60-70 годы спектроскопия КР света превратилась в один из наиболее мощных и широко используемых методов для изучения состава и строения практически любых, в том числе дисперсных сред. Это было связано с появлением ряда спектрофотометров (серии СФ и ИКС), а также КР-спектрометров (ДФС-12, ДФС-24, ДФС-52), позволивших многократно повысить чувствительность регистрации оптического сигнала. Оптическая схема таких КР-спектрометров построена по принципу двойного или тройного монохроматора.

На мировом уровне спектрально-аналитические технологии и аппаратуру для КР-спектроскопии представляет целый ряд фирм – Perkin Elmer, Bruker, Shimadzu, Hamamatsu, Nicolette, Jobin Yvon и др. В подавляющем большинстве аппаратуры этих фирм функции управления измерениями и обработки результатов выполняются IBM PC-совместимыми компьютерами по специализированным программам, функционирующим в среде Microsoft Windows. К настоящему моменту созданы специальные малогабаритные КР-спектрометры, использующие одинарные монохроматоры с вогнутыми дифракционными решетками, а также высокоскоростные счетчики фотонов, с которых цифровой сигнал с легкостью передается на ЭВМ. В таких спектрометрах применяется метод многоканальной регистрации спектров. В этом случае на выходе монохроматора устанавливается прибор, позволяющий регистрировать излучение одновременно в нескольких точках своей рабочей поверхности. Первыми приборами такого рода являлись матрицы фотодиодов; в настоящее время для этой цели обычно используют приборы с зарядовой связью (ПЗС). Применение линеек ПЗС на выходе монохроматора позволяет за один период накопления сигнала получить информацию обо всем спектре рассеянного излучения. Таким образом, несмотря на то, что ПЗС линейки уступают по чувствительности фотоумножителям, а, следовательно, требуют большего времени накопления, удаётся получить выигрыш по общему времени снятия спектра, так как накопление проводится для всего спектра одновременно, а не повторяется во многих точках спектра, как при

использовании фотоумножителей. Аналогичные малогабаритные КР-спектрометры разрабатываются в последнее время и в России (используемые малогабаритные КР-спектрометры приводятся ниже. Одно из главных преимуществ спектроскопии КР перед другими аналитическими методами заключается в том, что она позволяет работать с небольшими количествами веществ и трудно приготавливаемыми образцами и относительно быстро получать результаты [66,67].

2.3. Фотолюминесцентная спектроскопия

Фотолюминесцентная спектроскопия является важнейшим инструментом при изучении сложных молекулярных объектов и систем, включая лекарственные препараты, биологические мембраны, протеины, ДНК и др. Этот экспериментальный метод позволяет получать детальную информацию о структуре и динамических свойствах молекулярных систем. Фотолюминесцентная спектроскопия включает в себя флуоресцентный и фосфоресцентный виды спектроскопии, отличающихся временами анализируемых процессов. Характерные времена флуоресцентной спектроскопии: $\tau < 10^{-8}$ с. Фосфоресценция характеризуется длительным послесвечением; соответствующие времена варьируются в широком диапазоне: от миллисекунд до нескольких секунд и более. Ключевым моментом успешного применения фотолюминесцентной спектроскопии является адекватный анализ получаемых экспериментальных данных.

Методы фотолюминесцентной спектроскопии широко применяются в биофизических, медицинских и химических исследованиях, так как этим методам присуща высокая чувствительность, а также удобный временной диапазон: испускание флуоресценции происходит через 10 нс после поглощения света. За этот промежуток времени может произойти множество различных молекулярных процессов, которые способны повлиять на спектральные характеристики флуоресцирующего соединения. Такое сочетание чувствительности с подходящим временным диапазоном способствует тому, что флуоресцентные методы обычно используют для изучения мембран и протеинов и их взаимодействия с другими макромолекулами [68].

2.3.1. К теории фотолюминесцентной спектроскопии

2.3.1.1. Электронно-колебательные спектры молекул

В стационарных условиях молекула обладает электронной конфигурацией с минимальной потенциальной энергией и находится в основном состоянии. Тепловое движение приводит к колебаниям атомов внутри молекулы, что сопровождается флуктуациями потенциальной энергии основного состояния. Каждое электронное состояние состоит из колебательных и вращательных уровней. Обычно расстояние между вращательными уровнями на 2 порядка меньше, чем между колебательными уровнями. Особенностью спектров органических молекул является наличие в них синглетных (полное спиновое квантовое число $S=0$ и мультиплетность $2S+1=1$) и триплетных электронных состояний ($S=1$, $2S+1=3$). Возбужденные синглетные уровни обозначаются S_1 , S_2 , S_3 и т. д., а триплетные соответственно T_1 , T_2 , T_3 и т. д.

Получив извне порцию энергии, молекула перейдет в возбужденное состояние. Это состояние неустойчиво, и через некоторое время, отдав избыточную энергию, система вернется в исходное основное состояние. Люминесценцией называется избыток излучения над температурным излучением тела, если это избыточное излучение длится примерно 10^{-10} с и больше.

По виду возбуждения различают: фотолюминесценцию, радиолюминесценцию, электролюминесценцию, триболюминесценцию, хемилюминесценцию, кандолюминесценцию, лиолюминесценцию.

По длительности свечения различают флуоресценцию – быстро затухающую люминесценцию – и фосфоресценцию – длительную люминесценцию.

Связь энергии перехода между энергетическими уровнями и частотой колебаний поглощенного света устанавливается уравнением:

$$E_2 - E_1 = h\nu \approx h\nu_c.$$

После поглощения света часть полученной системой энергии расходуется в результате релаксации. Остальная часть энергии может быть испущена в виде фотона определенной энергии.

При взаимодействии с окружающими атомами возбужденный атом может передать им часть энергии и перейти на промежуточный уровень, при излучательном переходе с которого происходит люминесценция, называемая спонтанной. При этих переходах испускание фотонов не зависит от внешних

воздействий на систему, поэтому спонтанное излучение является некогерентным.

Основные закономерности люминесценции состоят в следующем:

1. Каждое вещество в конденсированном состоянии имеет совершенно определенный спектр люминесценции, который не чувствителен к изменению длины волны возбуждающего света.

2. Правило Стокса-Ломмеля: спектр излучения в целом и его максимум всегда сдвинуты по сравнению со спектром поглощения и его максимумом в сторону длинных волн.

3. Энергетический выход люминесценции растет пропорционально длине волны возбуждающего света, затем в некотором спектральном интервале он остается практически постоянным, после чего в области наложения спектров поглощения и люминесценции начинает быстро падать до нуля.

4. Правило симметрии Левшина: спектры поглощения и люминесценции, изображенные как функции от частоты, оказываются зеркально-симметричными относительно прямой, проходящей перпендикулярно оси частот через точку пересечения обоих спектров, т.е. $\nu_n + \nu_l = 2\nu_0$ или $\nu_n - \nu_0 = \nu_0 - \nu_l$. Здесь ν_n – волновое число поглощаемого света; ν_l – симметричная частота люминесценции; ν_0 – волновое число линии симметрии. При этом по оси ординат для спектров люминесценции следует откладывать интенсивность люминесценции $I(\nu)$, выраженную в числе фотонов на единичный интервал частот в единицу времени, а для спектров поглощения – молярный коэффициент поглощения $\varepsilon(\nu)$; максимумы спектров нужно пронормировать к одной и той же величине.

Согласно закону Стокса, длина волны излучения люминесценции всегда больше длины волны света, возбуждившего люминесценцию. Но позднее было установлено, что при фотолюминесценции наблюдается излучение с длиной волны, меньшей длины волны возбуждающего света. Такое излучение называют антистоксовым. При стоксовой люминесценции на уровень E_{01} частота люминесценции вычисляется следующим образом $\omega_l = \frac{E_1 - E_{01}}{\hbar} < \omega_0$. При антистоксовой люминесценции соответственно $\omega_l = \frac{E_1 - E_{01}}{\hbar} > \omega_0$.

Выход люминесценции характеризует эффективность трансформации возбуждающего света в излучение люминесценции в исследуемом веществе. Энергетическим выходом люминесценции называют отношение излучаемой веществом энергии E_l к поглощенной энергии возбуждения E_n : $\eta_{эн} = \frac{E_l}{E_n}$.

Квантовым выходом люминесценции называют отношение числа квантов люминесценции, излученных веществом N_l к числу поглощенных квантов возбуждающего света N_n : $\eta_{\text{кв}} = \frac{N_l}{N_n}$. С.И. Вавиловым было показано, что квантовый выход в растворах не зависит от длины волны возбуждающего света. Это связано с огромной скоростью колебательной релаксации, в ходе которой возбуждённая молекула передаёт избыток энергии молекулам растворителя. Отклонения от закона Вавилова возникают, если при возбуждении в высшие электронные состояния появляются новые пути дезактивации возбужденных молекул, конкурирующие с внутренней конверсией в нижнее возбужденное состояние.

Энергетический выход люминесценции может быть выражен с помощью квантового выхода $\eta_{\text{кв}}$ следующим образом: $\eta_{\text{эн}} = \frac{E_l}{E_n} \neq \eta_{\text{кв}} \frac{\nu_l}{\nu_n}$, так как $E = Nh\nu$; ν_l и ν_n – волновые числа люминесцентного и поглощенного излучения соответственно.

Выход люминесценции очень чувствителен к внешним воздействиям, которые во многих случаях приводят к тушению свечения. Так, известно тушение люминесценции посторонними примесями, возникающее при добавлении к раствору посторонних веществ — тушителей. Тушителями могут служить KI, анилин и другие вещества. В результате взаимодействия возбужденных молекул люминесцентного вещества с молекулами тушителя возникает безызлучательный обмен энергии возбуждения. Безызлучательные переходы развиваются и при увеличении температуры раствора. Закон затухания свечения после прекращения возбуждения может быть различным у разных веществ, что часто позволяет определять по нему природу и кинетику свечения; вместе с тем он может служить и аналитической характеристикой.

Для иллюстрации закономерностей люминесценции можно воспользоваться примером двухатомной молекулы (рис.2.20). Низший энергетический уровень, или основное состояние, описывается кривой S_0 , на которой горизонтальными линиями схематически показаны энергетические подуровни, соответствующие разным колебательным состояниям молекулы. Если молекула получит извне дополнительную порцию энергии, то она перейдёт в состояние с избытком потенциальной энергии и окажется в возбужденном состоянии. Это состояние является неустойчивым, и через некоторое время (10^{-8} с или более), отдав тем или иным способом избыточную энергию, система возвращается в исходное основное состояние.

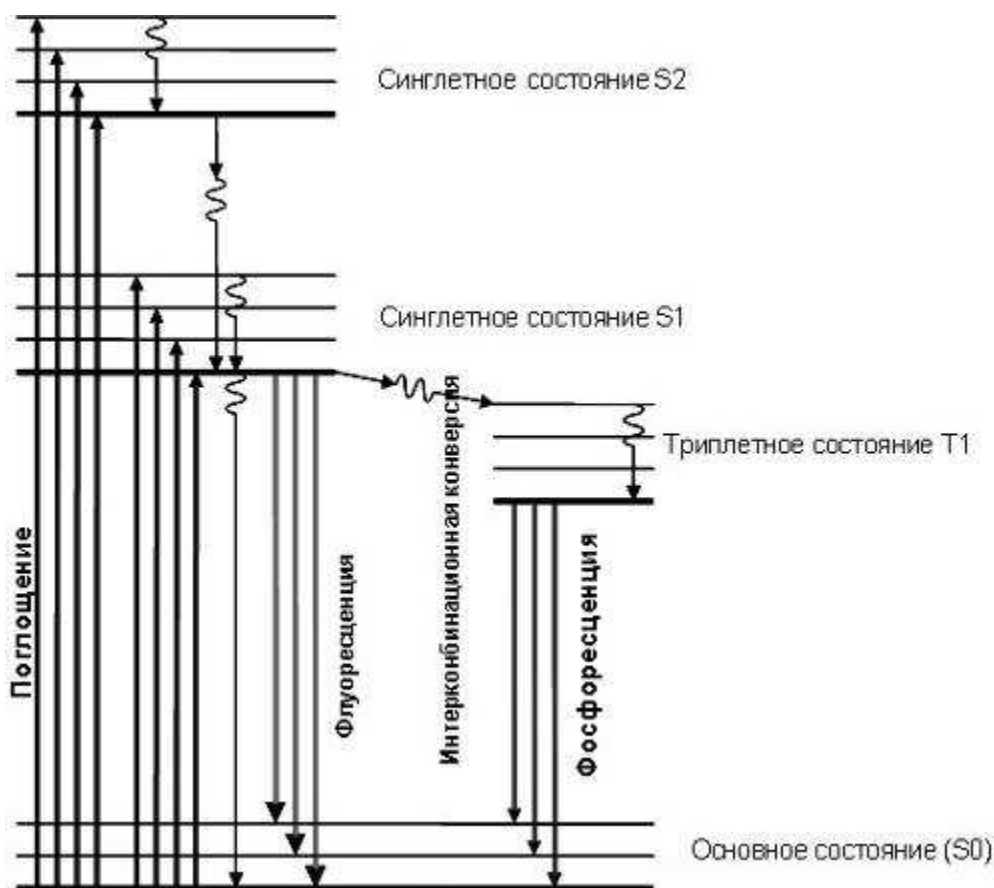


Рис. 2.20. Зависимость потенциальной энергии двухатомной молекулы от расстояния между атомами для разных энергетических уровней (диаграмма Яблонского): основное синглетное состояние (S_0), первое возбужденное синглетное состояние (S_1), второе возбужденное синглетное состояние (S_2), триплетное состояние (T_1) [69]

Излучение света молекулой вещества при ее переходе из возбужденного состояния в основное называется люминесценцией. По способу передачи молекуле дополнительной энергии и ее переводу в возбужденное состояние различают фотолюминесценцию (возбуждение световым излучением), рентгенолюминесценцию (возбуждение рентгеновыми лучами), катодолюминесценцию (возбуждение пучком ускоренных электронов), сонолюминесценцию (возбуждение звуковым излучением) и т. д. Хемилюминесценция характеризуется тем, что молекула оказывается в возбужденном состоянии в результате экзотермической химической реакции. Частным случаем хемилюминесценции является биолюминесценция, наблюдаемая в живой природе. Возможен также случай, когда возбуждение молекулы (A) происходит в результате безызлучательного переноса электронного возбуждения от другой предварительно возбужденной молекулы – донора (D): $D^* + A \rightarrow D + A^*$. Излучение моле-

кулы-акцептора (A^*) в этом случае называется сенсibilизированной люминесценцией. Возвращаясь к рассмотрению основных закономерностей люминесценции, отметим, что поступающая извне избыточная энергия возбуждения может быть поглощена молекулой с переходом в возбужденное состояние только в том случае, если ее величина равна разнице энергий основного (S_0) и одного из возбужденных состояний данной молекулы. В частном случае фотолюминесценции, приведенном на рис.2.20, это означает, что для перехода молекулы с основного уровня S_0 на первый возбужденный уровень S_1 с разницей энергии ΔE_1 необходим квант света с такой же энергией. При соблюдении этих условий молекула может поглотить квант света и за время, равное периоду световых колебаний (10^{-15} с), переходит из основного состояния S_0 в возбужденное состояние S_1 , как это показано вертикальной стрелкой «Поглощение» на рис. 2.20. За столь малый отрезок времени (10^{-15} с) расстояние между составляющими молекулу атомами не успевает существенно измениться.

Согласно известному принципу Франка - Кондона, при этом молекула оказывается на одном из высших колебательных подуровней возбужденного состояния S_1 и требуется определенное время для рассеяния соответствующей порции энергии, чтобы молекула оказалась в низшей точке энергетической кривой S_1 . Как уже упоминалось выше, возбужденное состояние молекулы S_1 является нестабильным. Поэтому через некоторое время ($t \approx 10^{-8}$ с) молекула возвращается в исходное основное состояние S_0 , излучая избыточную энергию ΔE_2 в виде кванта света. При возвращении молекулы в основное состояние она вновь оказывается, в соответствии с принципом Франка - Кондона, на одном из высших колебательных подуровней основного состояния и отдаёт часть энергии, чтобы оказаться в низшей точке энергетической кривой S_0 . Таким образом, излучаемая в виде кванта света энергия ΔE_2 оказывается меньше поглощенной при возбуждении энергии ΔE_1 , и длина волны излучения оказывается больше длины волны возбуждающего кванта. Это характерное для люминесценции соотношение лежит в основе установленного эмпирическим путем закона Стокса. Существуют, однако, случаи, когда за счет внутреннего перераспределения энергии длина волны люминесценции оказывается меньше длины волны возбуждающего кванта. Эта разновидность, как уже упоминалось, носит название антистоксовой люминесценции. Рассмотренные переходы между основным S_0 и возбужденным S_1 состояниями характеризуются одной важной особенностью, а именно – неизменностью состояния спинов электронов в молекуле. Обычно молекулы в основном состоянии содержат четное число электронов со «спаренными» спинами, т.е. число электронов со спином $s = +\frac{1}{2}$ равно числу электронов со спином $s = -\frac{1}{2}$ и, следо-

вательно, суммарный спин S всех электронов молекулы равен 0. В результате мультиплетность молекулы $M = 2S + 1$, где S — суммарный спин молекулы, оказывается равной 1, или, как говорят, молекула находится в синглетном состоянии. Наиболее вероятными энергетическими переходами являются переходы без изменения мультиплетности, т. е. синглет \rightarrow синглетный ($S_0 \rightarrow S_1$) переход при поглощении кванта возбуждения и обратный переход $S_1 \rightarrow S_0$ при дезактивации молекулы. Этот тип люминесценции называется флуоресценцией. Может оказаться, что в результате некоторого внутреннего энергетического перехода спин одного из электронов молекулы изменит знак и в ее составе появятся два неспаренных электрона. Тогда суммарный спин молекулы $S_1 = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$ и мультиплетность $M = 2S + 1 = 3$. Такое состояние молекулы принято называть триплетным. Внутренняя потенциальная энергия первого триплетного состояния (кривая T) ниже энергии первого синглетного состояния (S_1), и поэтому доля энергии ΔE_3 , излучаемой в виде света при переходе молекулы из возбужденного триплетного состояния (T_1) в основное синглетное состояние (S_0), ощутимо уменьшается, а длина волны излучаемого при этом света увеличивается по сравнению с флуоресцентным переходом $S_1 \rightarrow S_0$ (ΔE_2). Этот тип люминесценции (триплет-синглетный переход) называется фосфоресценцией. Помимо большей длины волны излучаемого света, фосфоресценция отличается от флуоресценции и большим временем жизни молекулы в возбужденном состоянии. Это связано с тем обстоятельством, что переходы между энергетическими уровнями с изменением мультиплетности являются «запрещенными», т. е. вероятность их очень мала. Ввиду большой длительности времени жизни возбужденной молекулы в триплетном состоянии (T_1) появляется вероятность того, что за счет поглощения тепловой энергии она может возвратиться на возбужденный синглетный уровень S_1 и уже с него перейти на основной уровень S_0 , излучая квант света. Поскольку разница энергий в этом случае составляет ΔE_2 , длина волны излучения остается такой же, как и в обычном случае флуоресценции, и только время жизни возбужденного состояния оказывается большим (за счет пребывания на триплетном уровне T_1), и этот тип флуоресценции называется замедленной флуоресценцией. Как видно из рис. 2.20, сначала происходит поглощение излучения за крайне короткое время, затем переводит систему в любое из возможных возбужденных электронных состояний. Далее система за счет взаимодействия с окружающей средой теряет часть энергии, претерпевая ряд безызлучательных переходов. Этот процесс называется колебательной релаксацией, он происходит за время порядка 10^{-12} – 10^{-10} с. Колебательная релаксация обычно полностью заканчивается до процесса испускания. Излучение флуоресценции в

большинстве случаев осуществляется уже непосредственно с самого нижнего колебательного подуровня состояния S_0 на различные колебательные подуровни основного состояния. Как следствие, спектр испускания отражает колебательную структуру основного электронного состояния, в отличие от спектра поглощения, отражающего колебательные структуры возбужденных состояний.

В большинстве случаев электронное возбуждение несильно изменяет расположение колебательных уровней энергии, и спектры поглощения и испускания сходны по своему виду. Спектры флуоресценции некоторых соединений, таких, как перилен (см. рис. 2.21), имеют четкую структуру, обусловленную отдельными колебательными уровнями энергии основного состояния. Другие же соединения, подобно хинину (см. рис. 2.21), имеют спектры флуоресценции без колебательной структуры. Характеристическое время флуоресценции составляет порядка 10^{-10} - 10^{-6} с. Сравнительно небольшое время жизни синглетного возбужденного состояния объясняется тем, что переход с S_1 на S_0 уровень относится к разрешенным по спину и происходит с высокой вероятностью. Совсем другая ситуация наблюдается для фосфоресценции. Характеристическое время фосфоресценции составляет значительную величину: от 10^{-6} с до секунд – поскольку переход с T_1 на S_0 уровень относится к запрещенным по спину; он происходит с низкой вероятностью и, соответственно, с низкой скоростью. Именно фосфоресценция является причиной свечения некоторых минералов в темноте после их предварительного облучения солнечным светом.

Безызлучательный переход из синглетного состояния S_1 в триплетное T_1 , из которого происходит фосфоресценция, называется интеркомбинационной конверсией. Этот переход также является запрещенным по спину. Его вероятность повышается заметно лишь в том случае, когда колебательные подуровни состояний S_1 и T_1 частично перекрываются. Интеркомбинационная конверсия характерна для систем, содержащих атомы тяжелых элементов, например, брома и йода, поскольку из-за достаточно высокого спин-орбитального взаимодействия в таких системах триплетное состояние оказывается энергетически выгоднее синглетного.

Переход от флуоресценции к фосфоресценции можно наблюдать в растворах, содержащих парамагнитные добавки, бром- и йодсодержащие соединения, которые могут образовывать комплексы с люминесцирующими соединениями. Характеристическое время интеркомбинационной конверсии может составлять порядка 10^{-10} - 10^{-8} с, то есть быть сопоставимым со временем флуоресценции. Спектр фосфоресценции сдвинут относительно спектра флуоресценции в длинноволновую область.

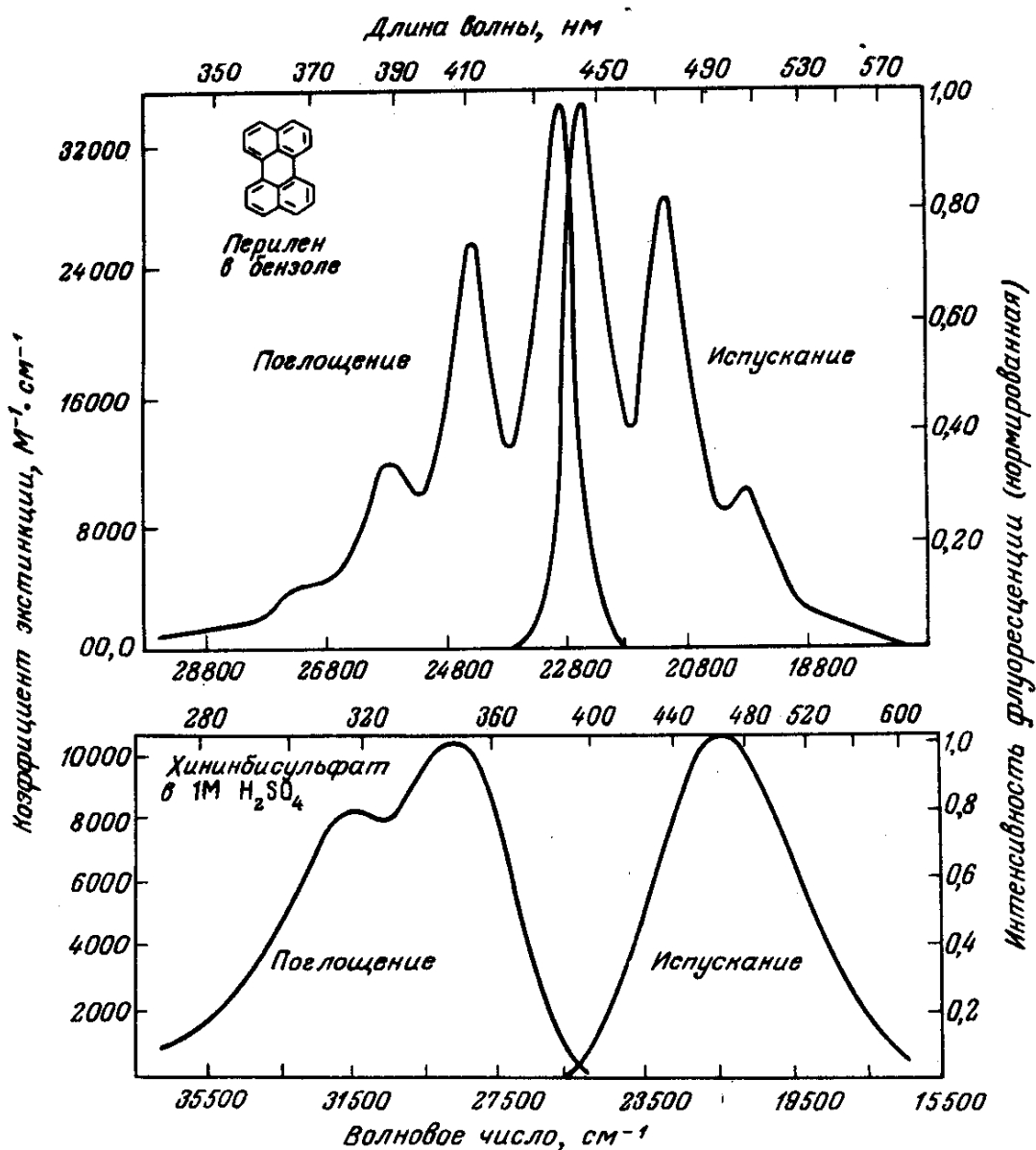


Рис. 2.21. Спектры поглощения и испускания флуоресценции перилена и хинина (по данным [69])

2.3.1.2. Правило зеркальной симметрии

Обычно спектр испускания флуоресценции представляет собой зеркальное отражение спектра поглощения, точнее, того поглощения, которое соответствует переходу из S_0 в S_1 . Это особенно наглядно в случае перилена (рис. 2.21). Симметричная природа этих спектров определяется тем, что и поглощение, и испускание обусловлены одними и теми же переходами, а также сходством колебательных энергетических уровней состояний S_0 и S_1 . Для многих молекул различное распределение электронов в состояниях S_0 и S_1 существен-

но не влияет на эти уровни энергии. Согласно принципу Франка – Кондона [70], все электронные переходы происходят без изменения межъядерного расстояния. В результате, если данная вероятность перехода (фактор Франка – Кондона) между нулевым и вторым колебательными уровнями максимальна при поглощении, соответствующий переход будет наиболее вероятен также и в испускании (рис. 2.22).

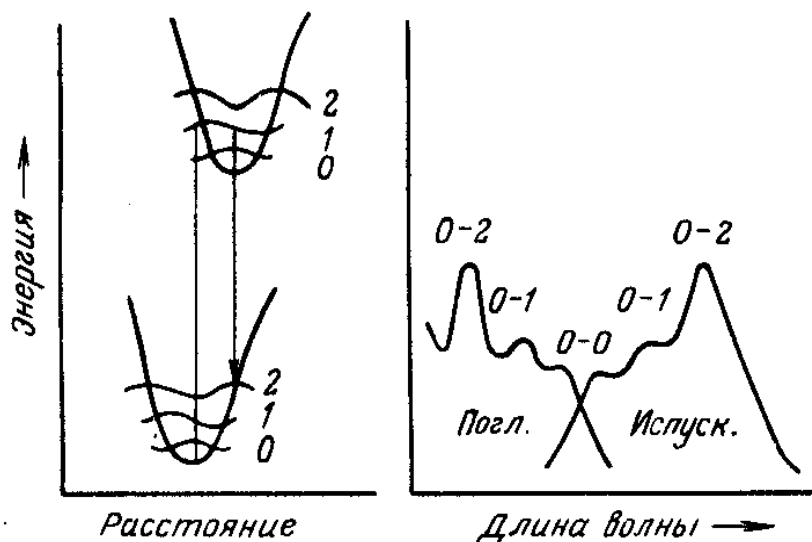


Рис. 2.22. Правило зеркальной симметрии и факторы Франка – Кондона [29]

Необходимым условием для зеркальной симметрии является представление спектров поглощения и испускания в соответствующих единицах. Наилучшая симметрия должна существовать между модифицированными спектрами $\epsilon\tilde{\nu}/\tilde{\nu}$ и $F(\tilde{\nu})\tilde{\nu}^3$, где $\epsilon\tilde{\nu}$ – коэффициент поглощения, соответствующий волновому числу $\tilde{\nu}$, а $F(\tilde{\nu})$ – относительный поток фотонов в интервале волновых чисел $\Delta\tilde{\nu}$ [70]. Соответствие между такими спектрами обычно наблюдается для полиядерных ароматических углеводородов. Несмотря на то, что правило зеркальной симметрии часто выполняется, из него существует множество исключений. В качестве примера на рис. 2.23 приведены спектры флуоресценции дифенила. В спектре испускания видна колебательная структура, которая отсутствует в спектре поглощения. Такое отклонение от правила зеркальной симметрии обычно указывает на различное геометрическое расположение ядер в основном и возбужденном состояниях.

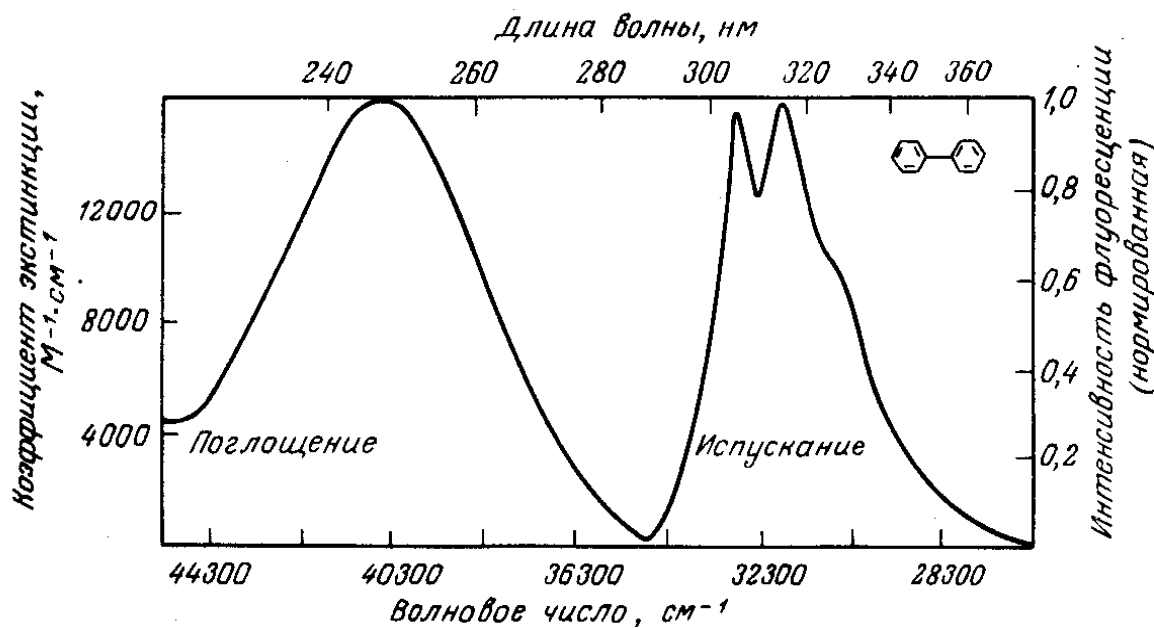


Рис. 2.23. Спектры поглощения и испускания дифенила [29]

Смещение положений ядер может произойти до процесса испускания из-за относительно большого времени жизни состояния S_1 . В случае дифенила, вероятно, отдельные кольца становятся более копланарными в возбужденном состоянии, в результате чего спектр испускания становится более структурированным по сравнению со спектром поглощения. Дифенил не только представляет собой пример отклонения от правила зеркальной симметрии, он необычен еще и тем, что его спектр испускания имеет более четко выраженную колебательную структуру, чем спектр поглощения. Обычно наблюдается противоположная картина.

Кроме геометрических перегруппировок отклонение от правила зеркальной симметрии может вызвать также реакции в возбужденных состояниях. Например, для фенола и тирозина наблюдается по две полосы испускания; при этом длинноволновое испускание более заметно при высоких концентрациях акцепторов протона.

2.3.1.3. Времена затухания и квантовые выходы флуоресценции

Часто измеряют времена затухания и квантовые выходы флуоресцирующих соединений. Смысл этих параметров хорошо виден из модифицированной диаграммы Яблонского (рис. 2.20). На этой диаграмме мы не указываем подробно отдельные процессы релаксации, приводящие к релаксированному состоянию $S1$, а обращаем больше внимание на процессы, которые ответственны за возвращение в основное состояние. В частности, нас интересует константа скорости излучательной дезактивации флуорофора (Γ) и константа скорости безызлучательной дезактивации (k) в состояние $S0$. Квантовый выход флуоресценции – это отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных. Обе константы скорости Γ и k соответствуют процессам уменьшения заселенности возбужденного состояния. Доля молекул флуорофора, которые дезактивируются с испусканием, а, следовательно, и квантовый выход (Q) определяется выражением:

$$Q = \Gamma/(\Gamma+k). \quad (2.26)$$

Квантовый выход близок к единице в том случае, если константа скорости безызлучательной дезактивации много меньше константы скорости испускания, т. е. $k \ll \Gamma$. Заметим, что энергетический выход флуоресценции всегда меньше единицы из-за стоксовых потерь. Для удобства мы сгруппировали все возможные процессы безызлучательной дезактивации в одну константу скорости k (см.рис.2.24). Время жизни возбужденного состояния определяется как среднее время, в течение которого молекула находилась в возбужденном состоянии до того, как вернуться в основное состояние. Обычно время затухания флуоресценции – 10 нс. Для флуорофора, описываемого диаграммой Яблонского (рис. 2.20), время затухания равно

$$\tau = 1/(\Gamma + k). \quad (2.27)$$

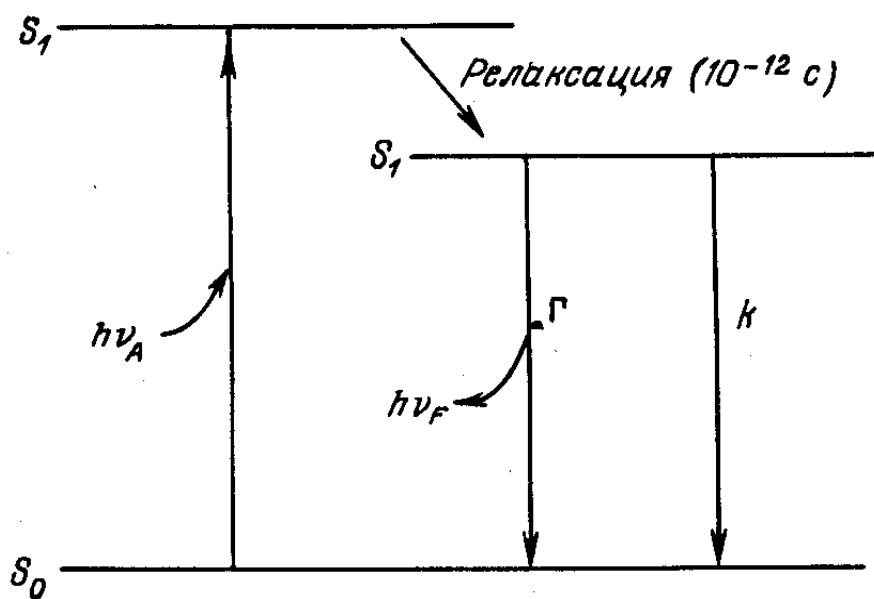


Рис. 2.24. Модифицированная диаграмма Яблонского

Необходимо помнить, что испускание флуоресценции – это случайный процесс, и не все молекулы испускают фотоны при $t = \tau$. Время жизни – это средняя продолжительность пребывания в возбужденном состоянии. Время жизни флуорофора в отсутствие безызлучательных процессов, называемое собственным или радиационным (излучательным) временем жизни (τ_0), равно:

$$\tau_0 = 1/\Gamma. \quad (2.28)$$

Отсюда вытекает обычное соотношение между квантовым выходом и временем жизни:

$$Q = \tau / \tau_0. \quad (2.29)$$

Квантовый выход и время жизни могут изменяться под действием любых факторов, влияющих на константы скорости. Например, молекула может оказаться неспособной флуоресцировать из-за большой скорости внутренней конверсии либо малой скорости испускания. Сцинтилляторы обычно выбирают за их высокие квантовые выходы, которые являются результатом больших значений Γ . Им обычно соответствуют короткие времена жизни, порядка 1 нс. Флуоресценция ароматических соединений, содержащих группы NO_2 , обычно слаба, в первую очередь из-за большой величины k . Переход триплет – синглет запрещен по симметрии, и константы скорости спонтанного испускания составляют $\sim 10^3 \text{ с}^{-1}$ или меньше. Поскольку значения k близки к 10^9 с^{-1} , квантовые выходы фосфоресценции малы при комнатной температуре. Из уравнения (2.10) можно получить квантовые выходы фосфоресценции, равные 10^{-6} .

2.3.1.4. Анизотропия флуоресценции

Флуорофоры преимущественно поглощают те фотоны, электрические векторы которых направлены параллельно моменту перехода флуорофора. Момент перехода имеет определенную ориентацию в молекуле флуорофора. В изотропных растворах молекулы флуорофоров ориентированы случайным образом. При возбуждении поляризованным светом селективно возбуждаются те молекулы флуорофора, для которых дипольный момент перехода при поглощении параллелен электрическому вектору возбуждающего света. Такое селективное возбуждение частично ориентированного набора флуорофоров (фотоселекция) приводит к частично поляризованному испусканию флуоресценции. Для каждого флуорофора моменты перехода для поглощения и испускания имеют фиксированную ориентацию, и угол между ними определяет максимальную измеряемую анизотропию r_0 . Анизотропия (r) и поляризация (P) флуоресценции выражаются следующими уравнениями:

$$r = I_{//} - I_{\perp} / I_{//} - 2 I_{\perp}; \quad P = I_{//} - I_{\perp} / I_{//} + I_{\perp},$$

где $I_{//}$ и I_{\perp} интенсивности флуоресценции вертикально ($//$) и горизонтально (\perp) поляризованного испускания в случае возбуждения образца вертикально поляризованным светом.

Анизотропия и поляризация – это выражения одного и того же явления, поэтому их можно взаимозаменять. Некоторые факторы могут уменьшать измеряемую величину анизотропии до значений ниже максимального. Самый распространенный из них – вращательная диффузия, которая происходит за время жизни возбужденного состояния и смещает испускающий диполь флуорофора. Измерение этого параметра дает информацию об относительном угловом смещении флуорофора в интервале между поглощением и испусканием. Перенос энергии возбуждения между флуорофорами также приводит к уменьшению анизотропии. Предположим, что единственным существенным процессом, приводящим к уменьшению анизотропии, является вращательная диффузия. Тогда измеряемая анизотропия определится выражением:

$$r = \frac{r_0}{1 + \tau / \phi}, \quad (2.30)$$

где r_0 – анизотропия, которая должна была бы измеряться в отсутствие вращательной диффузии, а ϕ – время корреляции для процесса диффузии, определяемое как

$$\varphi = \eta V/kT, \quad (2.31)$$

где η – вязкость раствора; k – константа Больцмана; T – абсолютная температура; V – объем вращающегося фрагмента. Рассмотрим белок с молекулярной массой 50000. Поскольку удельный объем белков составляет 0,73 мл/г, можно легко подсчитать, что при 25°C в водном растворе ($n = 0,00894$ П) ожидаемое время корреляции составляет 13 нс для безводной сферы. Поскольку белки гидратированы, фактическое время корреляции, по-видимому, должно быть больше. Однако существенным является то, что времена вращательной корреляции для большинства белков сравнимы с типичными временами затухания флуоресценции. Поэтому результаты измерения анизотропии флуоресценции зависят от всех факторов, влияющих на скорость вращательной диффузии. По этой причине измерения поляризации флуоресценции широко используют для изучения гидродинамических свойств макромолекул.

2.3.1.5. Временная шкала молекулярных процессов в растворе

Флуоресцентная спектроскопия – эффективный метод исследования динамических процессов в растворах, представляющих интерес для биологов. Такая возможность связана в первую очередь с временем жизни возбужденных состояний. Вследствие принципа Франка – Кондона абсорбционная спектроскопия может дать информацию только об усредненных характеристиках основного состояния молекул, поглотивших свет. Поскольку только те молекулы растворителя, которые непосредственно соседствуют с поглощающими частицами, будут влиять на их спектр поглощения, абсорбционная спектроскопия может дать информацию лишь о некоторой средней сольватной оболочке растворителя, соседствующей с хромофором, и не отражает молекулярную динамику.

В противоположность этому параметры флуоресцентной спектроскопии являются чувствительными функциями всех процессов, протекающих за время жизни возбужденного состояния, причем в этих процессах могут участвовать молекулы, находящиеся в момент возбуждения на расстояниях до 100 Å от флуорофора. Хотя может показаться, что 10 нс – слишком короткий промежуток времени, фактически это большое время по сравнению со временем движения малых молекул в жидком растворе. Вращательная диффузия связанных с белками и мембранами флуорофоров также укладывается в этот временной диапазон. Тушение флуоресценции молекулярным кислородом по механизму столкновений является показательным примером размеров пространственного и временного диапазонов, представляемых временем затухания флуоресценции. Если флуорофор, находящийся в возбужденном состоянии, сталкивается с молекулой кислорода, он возвращается в основное состояние без испускания фотона. Коэффициент диффузии кислорода в воде при 25°C равен $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2/\text{с}$. Среднее расстояние $[(\Delta x^2)^{1/2}]$, на которое может диффундировать молекула кислорода за 10^{-3} с , определяется уравнением Эйнштейна:

$$\Delta x^2 = 2D\tau, \quad (2.32)$$

где D – коэффициент диффузии.

Расстояние $[(\Delta x^2)^{1/2}]$ составляет $\sim 70 \text{ Å}$, что сравнимо с толщиной биологической мембраны или диаметром белка. Для некоторых флуорофоров времена жизни достигают 400 нс, поэтому можно наблюдать диффузию молекул кислорода на расстояния свыше 450 Å. Напротив, измерения поглощения дают сведения лишь о непосредственном окружении флуорофора и, следовательно, о мгновенном усредненном окружении. Влияние молекулярной дина-

мики на спектры флуоресценции также обнаруживается при рассмотрении энергий. Органические молекулы, как правило, поглощают свет в диапазоне длин волн 200 – 500 нм, что соответствует энергиям от 140 до 60 ккал/ моль. Вслед за поглощением у флуорофора изменяется (обычно возрастает) дипольный момент. Если молекулы растворителя также имеют дипольные моменты, они переориентируются вокруг диполя возбужденного состояния, понижая тем самым его энергию. Этот процесс называется релаксацией растворителя и происходит в жидких растворах за 10^{-12} с. Релаксация растворителя может приводить к значительным стоксовым сдвигам. В белках триптофановые остатки поглощают свет с длиной волны 280 нм, а испускают флуоресценцию при – 350 нм. Таким образом, за несколько наносекунд, проходящих до процесса испускания, расходуется 20 ккал/моль. В основе любого эксперимента лежат измерение некоторой величины и корреляция полученных результатов с явлением, представляющим интерес для исследователя. Временной диапазон между поглощением света и последующим его испусканием достаточен для протекания нескольких процессов, каждый из которых приводит к ослаблению наблюдаемых спектральных характеристик флуоресценции. К таким процессам относятся столкновения с тушителями, вращательная и поступательная диффузия, образование комплексов с растворителями или с растворенными веществами и переориентация окружения молекулы в возбужденном состоянии с измененным дипольным моментом. Эти динамические процессы могут влиять на анизотропию флуоресценции, квантовые выходы, времена жизни и спектры испускания. В результате спектральные характеристики флуорофоров могут дать большую информацию о динамических процессах, протекающих за время испускания флуоресценции.

2.3.2. Флуоресцентная флуктуационная спектроскопия

Флуоресцентная флуктуационная спектроскопия (ФФС) – это совокупность методов, позволяющих исследовать физико-химические параметры вещества на основе анализа спонтанных изменений интенсивности флуоресценции $F(t)$. В состоянии термодинамического равновесия флуктуации интенсивности $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ могут происходить вследствие диффузии флуоресцентных молекул через освещенный объем V , определенный предельно сфокусированным лучом лазера. Хотя флуоресценция возбуждается на всем пути распространения лазерного луча, наибольший вклад в регистрируемый сигнал вносят молекулы, находящиеся в фокальной плоскости и в непосредственной

близости от нее. Интенсивность флуоресценции $F(t)$ зависит от следующих параметров [71]:

$$F(t) = I_0 \alpha Q \int_V C(\mathbf{r}, t) I(\mathbf{r}) W(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \eta \int_V C(\mathbf{r}, t) B(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (2.33)$$

где $\eta = I_0 \alpha Q \varepsilon$ – характеристическая яркость, определяемая как количество фотонов, испущенных одной молекулой в единицу времени и равной произведению интенсивности засветки в фокусе I_0 , коэффициента поглощения лазерного излучения молекулами вещества α , квантового выхода флуоресценции Q и эффективности системы регистрации ε ; $B(\mathbf{r}) = I(\mathbf{r})W(\mathbf{r})$ – общая функция пространственного распределения зарегистрированной интенсивности флуоресценции, равная произведению вероятности возбуждения молекул исследуемого вещества лазерным излучением $I(\mathbf{r})$ и передаточной функции собирающей оптики $W(\mathbf{r})$; $C(\mathbf{r}, t)$ – локальная концентрация молекул в точке \mathbf{r} в момент времени t . Наиболее часто $B(\mathbf{r})$ аппроксимируется трехмерным асимметричным распределением Гаусса, вытянутым по оси z [72]:

$$B(\mathbf{r}) = B(x, y, z) = B_0 \exp \{-2[(x^2 + y^2)/i_0^2 + z^2/z_0^2]\}, \quad (2.34)$$

где i_0 и z_0 характеризует падение интенсивности флуоресценции соответственно в поперечном и аксиальном направлении и $B_0 = B(0)$.

Объем наблюдения V не имеет четко очерченных физических границ, но поскольку интенсивность флуоресценции быстро падает с удалением от фокуса и размеры кюветы с веществом много больше, чем размер освещенной области, интегрирование в выражении (2.33) производится в бесконечных пределах. Для определения количества молекул, участвующих в процессе излучения фотонов, используют величину приведенного объема [73]:

$$V = \int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r}. \quad (2.35)$$

Средняя интенсивность флуоресценции определяется следующим образом [74]:

$$\langle F(t) \rangle = \eta \langle C \rangle V. \quad (2.36)$$

Для правильной интерпретации выражения (2.36) необходимо иметь в виду, что V не характеризует закрытый объем с четко очерченными физическими границами, и молекулы, находящиеся в различных частях освещенной области, не излучают равное число фотонов (яркость q определяется как среднее число фотонов, излученных молекулой, находящейся в фокусе засветки). Регистрируемая флуоресценция возникает от большего числа молекул, нахо-

дящихся в большем по размеру объеме, и молекулы, находящиеся на периферии освещенной области, генерируют меньшее число фотонов.

Каждый раз, когда флуоресцентная молекула входит в освещенный объем, регистрируется всплеск интенсивности. Изменение интенсивности регистрируется даже тогда, когда молекула остается в объеме, но изменяет свое местоположение вследствие сильной неоднородности засветки (максимальная в фокусе и быстро спадающая к периферии). Флуктуации интенсивности могут быть также вызваны реверсивными химическими реакциями, конформационными изменениями и другими процессами, влияющими на квантовый выход флуоресценции вещества. Пусть флуктуации интенсивности флуоресценции $F(t)$ возникают только вследствие изменений локальной концентрации $\delta C(\mathbf{r}, t)$, молекул одного вида внутри исследуемого объема V , тогда отклонения интенсивности флуоресценции $\delta F(t)$ от ее среднего значения могут быть записаны в следующем виде [71, 74]:

$$\delta F(t) = \int_V B(\mathbf{r}) \delta(qC(\mathbf{r}, t)) d\mathbf{r} = q \int_V B(\mathbf{r}) \delta C(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r}. \quad (2.37)$$

Флуктуации концентрации в точке \mathbf{r} в момент времени t относительно среднего значения $\langle C \rangle$ являются случайной величиной, зависящей от диффузии и равной:

$$\delta C(\mathbf{r}, t) = C(\mathbf{r}, t) - \langle C \rangle. \quad (2.38)$$

При проведении исследований методами ФФС необходимы сигналы от единичных молекул или от их очень малого количества [75]. Наличие большого числа молекул подавляет эффекты флуктуаций, и мы можем наблюдать только среднее значение их ансамбля. Одномолекулярный режим измерения достигается уменьшением размеров освещенного объема до или даже менее предела, определяемого дифракцией [76], и уменьшением концентрации вещества. Уменьшение концентрации возможно до значений, когда интенсивность рассеянного света и фоновый сигнал детектора не превысит интенсивности флуоресценции исследуемого вещества.

2.3.3. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия

Решение множества проблем биофизики связано с исследованием кинетических процессов, протекающих в системах макромолекул как в растворах, так и в клетках и мембранах. За последние двадцать лет широкое распространение получили импульсные и релаксационные методы исследования, позволяющие изучать быстрые химические реакции в растворах [77]. В течение последнего десятилетия для исследования динамических свойств макромолекул

развертывалось применение корреляционных оптических методов, таких как спектроскопия корреляции фотонов и спектроскопия оптического смешения [78]. В начале 1970-х годов появились новые методы, позволяющие исследовать кинетические свойства молекул в разбавленных растворах – методы концентрационной корреляционной спектроскопии [79]. С их помощью измеряют величину и временное поведение флуктуаций числа наблюдаемых молекул в малом объеме образца. Согласно флуктуационно-диссипационной теореме [80], релаксация этих флуктуаций подчиняется тем же законам, что и релаксация системы после макроскопического возмущения [81-83]. Кинетические параметры разных динамических процессов (диффузия, химические реакции, конформационные изменения и т.д.) связаны с амплитудой и скоростью флуктуаций. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (ФКС) является одной из разновидностей концентрационной корреляционной спектроскопии, в которой для наблюдения флуктуаций числа молекул используют флуоресцентную эмиссию.

Метод ФКС анализирует временную автокорреляционную функцию флуктуации интенсивности флуоресценции [84-90]. Данный метод применяется для измерения коэффициента вращательной и пространственной диффузии, кинетических констант химических реакций, молекулярных весов, концентрации вещества, кинетики перехода в триплетное состояние и реакций гибридизации.

Нормированную АКФ $g(\tau)$ флуктуаций интенсивности флуоресценции $\delta F(t)$ можно определить следующим образом [84]:

$$g(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t+\tau) \rangle - \langle F(t) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle \delta F(t)^2 \rangle} \quad (2.39)$$

Подставляя выражение (2.33) в (2.39), получим

$$g(\tau) = \frac{\iint B(\mathbf{r}) B(\mathbf{r}') g_c(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) d\mathbf{r} d\mathbf{r}'}{\left[\langle \int B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \rangle^2 \right]}, \quad (2.40)$$

где $g_c(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \langle \delta C(\mathbf{r}, t) \delta C(\mathbf{r}', t+\tau) \rangle$ – корреляционная функция флуктуаций концентрации, что следует из предположения стационарности процесса $C(\mathbf{r}, t)$. Для случая свободной диффузии в однородной среде имеем [91]:

$$g_c(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \langle \delta C(\mathbf{r}, t) \delta C(\mathbf{r}', t+\tau) \rangle = \langle \delta C(\mathbf{r}, t) \delta C(\mathbf{r}', t) \rangle^{-1/2} \exp\left(-\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2}{4D\tau}\right). \quad (2.41)$$

Величина D является диффузионным коэффициентом вещества (не зависящим от используемого спектрального прибора) и фактически является основной искомой величиной в методе флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Однако обычно пользуются характеристическим диффузионным временем τ_{diff} , описывающим среднее время пребывания молекулы в освещенной области. Различают поперечное и аксиальное диффузионное время, так как размер освещенного объема различен в этих направлениях. Поперечное диффузионное время в случае применения (2.34) для аппроксимации $B(\mathbf{r})$ определяется как [92]:

$$\tau_{diff} = \frac{\omega_0^2}{4D}. \quad (2.42)$$

Значение ω_0 может быть найдено из калибровочного измерения вещества с хорошо известным D . Основанием для использования выражения (2.34) при разработке модели является то, что для других аппроксимаций профиля засветки аналитический вид автокорреляционной функции найти очень сложно [88, 92, 93].

Значение $g(0)$ характеризуется корреляцией флуктуаций концентрации в точках \mathbf{r} и \mathbf{r}' в один и тот же момент времени. Если не учитывать взаимодействие между молекулами вещества, то

$$g_c(\mathbf{r}, \mathbf{r}', 0) = \langle C \rangle \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}'),$$

где δ есть дельта – функция Дирака. Из последнего выражения и (2.40) получим:

$$g(0) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle}. \quad (2.43)$$

V_{eff} в выражении (2.43) это эффективный объем освещенной области, равный

$$V_{eff} = \frac{\chi_1^2}{\chi_2}, \quad (2.44)$$

где χ_k – интеграл от функции профиля засветки в степени k

$$\chi_k = \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}. \quad (2.45)$$

Для трехмерного гауссовского распределения

$$V_{eff} = \pi^{3/2} \omega_0^2 Z_0. \quad (2.46)$$

Следовательно, амплитуда АКФ определяется средним количеством молекул $N_{eff} = V_{eff} \langle C \rangle$ в эффективном объеме

$$g(0) = 1 + 1/N_{eff}. \quad (2.47)$$

Кроме пересчета концентрации C к среднему числу молекул в эффективном объеме, иногда применяют пересчет к среднему числу молекул в объеме засветки V_{PSF} [93]. Тогда выражение (2.47) примет вид

$$g(\tau) = 1 + \gamma_2/N_{PSF},$$

где $\gamma_2 = \chi_2/\chi_1$ – это так называемый гамма-фактор, равный отношению интегралов от профиля засветки.

Подставляя выражение (2.41) и (2.42) в (2.40), получим

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{N_{eff}} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}\right) \sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff}}}}. \quad (2.48)$$

Для смеси невзаимодействующих молекул двух и более видов выражение (2.37) переписывается в виде

$$\delta F(t) = \sum_{i=1}^M q_i \int \delta(C_i(\mathbf{r}, t)) B(\mathbf{r}) dV, \quad (2.49)$$

где M – количество компонент смеси. Соответственно, выражение АКФ для смеси M веществ примет вид [92]:

$$g(\tau) = 1 + \sum_{i=1}^M \frac{q_i^2 N_{eff i}}{\left(\sum_{j=1}^M q_j N_{eff j}\right)^2} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff i}}\right) \sqrt{1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff i}}}}. \quad (2.50)$$

Таким образом, АКФ смеси невзаимодействующих молекул нескольких типов будет представлять линейную комбинацию АКФ отдельных компонент, взвешенных по квадрату их удельных яркостей.

Вывод формул (2.48) – (2.50) проведен в предположении, что флуктуации интенсивности определяются только свободной диффузией молекул в однородной среде. Однако почти всегда имеют место дополнительные процессы, способные приводить к флуктуациям интенсивности флуоресценции. К ним можно отнести быстрые химические реакции, переход молекул в триплетное состояние и некоторые другие. Когда характеристическое время этих процессов и характеристическое время диффузии различаются на несколько порядков, формула для вычисления АКФ имеет следующий вид [94, 95]:

$$g(\tau) = \frac{1}{N_{eff}} g_{process}(\tau) g_{diff}(\tau), \quad (2.51)$$

где

$$g_{diff}(\tau) = \sum_{i=1}^M \frac{F_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff i}}\right) \sqrt{\left(1 + \left(\frac{\omega_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff i}}\right)}} \quad (2.52)$$

и $g_{process}(\tau)$ – автокорреляционная функция одного из вышеперечисленных процессов. В случае учета перехода молекул в триплетное состояние [96]

$$g_{process}(\tau) = \frac{F_{trip}}{1 - F_{trip}} e^{-\tau/\tau_{trip}}, \quad (2.53)$$

где F_{trip} и τ_{trip} – соответственно фракция и среднее время пребывания молекул в триплетном состоянии. Более полный обзор выражений для АКФ, полученных с учетом различных процессов, можно найти в [92, 97-100].

АКФ измеренных данных рассчитывается либо аппаратным, либо программным способом. Для расширения временного диапазона АКФ вычисляют, используя квазилогарифмическую шкалу [101-103]. Анализ данных в ФКС производится путем подгонки теоретической модели (2.51) к измеренной АКФ по методу наименьших квадратов (МНК) [104]. В качестве критерия качества подгонки применяют взвешенный (приведенный к единице) критерий χ^2 [104] и визуальную оценку взвешенных остатков. При невозможности вычисления среднеквадратических отклонений экспериментальных точек применяют невзвешенный критерий χ^2 .

2.3.4. Использование флуоресцентных методов для исследования структуры и состава биоактивных препаратов

В современных биомедицинских исследованиях широко применяются флуоресцентные методы. Методы исследования флуоресценции конкретных биоактивных веществ обладают высокой чувствительностью, а также удобным временным диапазоном, так как испускание флуоресценции происходит через 10^{-8} с после поглощения света. За это время происходит множество различных молекулярных процессов, которые влияют на спектральные характеристики флуоресцирующего соединения. Кроме того, исследование флуоресценции позволяет получить информацию о структурах биоактивных препаратов и состоянии живых систем, не повреждая их, и не требует большого количества биологического материала. Имея такие преимущества, флуоресцентные

методы позволяют просто и экономично решить многие задачи фармацевтики, клинической диагностики, экологического контроля и физико-химического анализа и все шире применяются в медицинских и биофизических исследованиях.

Многие молекулы биологических веществ являются природными или естественными флуорофорами. Основными флуоресцирующими компонентами белков являются ароматические аминокислоты: триптофан, тирозин, фенилаланин (рис. 2.25-2.27).

Особый интерес представляет флуоресценция триптофана. Во-первых, такая флуоресценция характеризуется большой интенсивностью. Во-вторых, она наиболее изучена и находит разнообразные применения. Характеристики триптофана, входящего в состав белка, изменяются в широких пределах. Максимум флуоресценции триптофана расположен в диапазоне от 331 нм (химотрипсिनоген, актин) до 350 нм (папаин), а квантовый выход ФЛ этого соединения изменяется от нуля до 50%. Анализ характеристик флуоресценции триптофана во многих белках, а также исследования производных индола в различных средах позволили установить большую чувствительность флуоресценции триптофана к окружению [105].

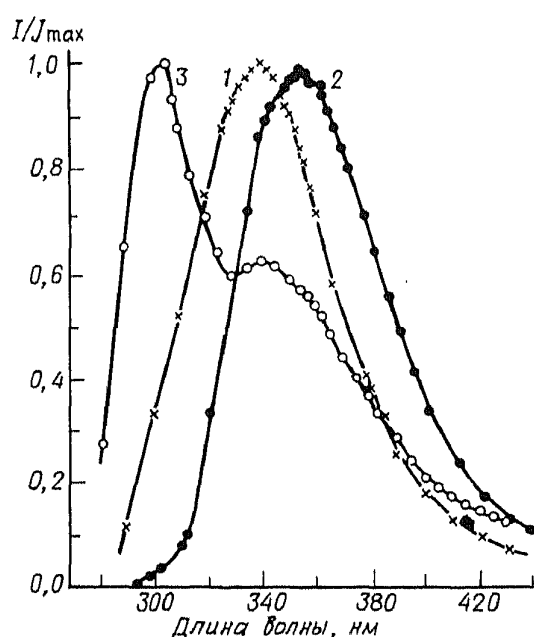


Рис. 2.25. Флуоресцентный спектр испускания человеческого сывороточного альбумина (HSA) и ароматических аминокислот:

- 1 – спектры испускания HSA;
- 2 – триптофана; 3 – смеси тирозина и триптофана, эквивалентной той, которая найдена для HSA [68]

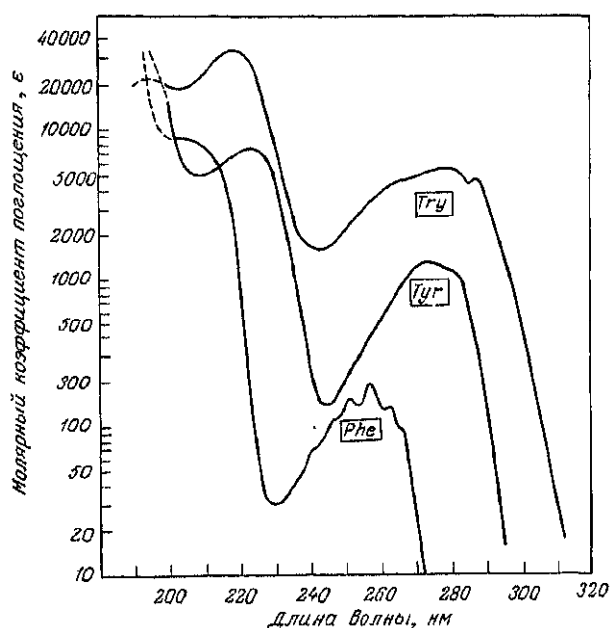


Рис. 2.26. Спектры поглощения ароматических аминокислот [68]

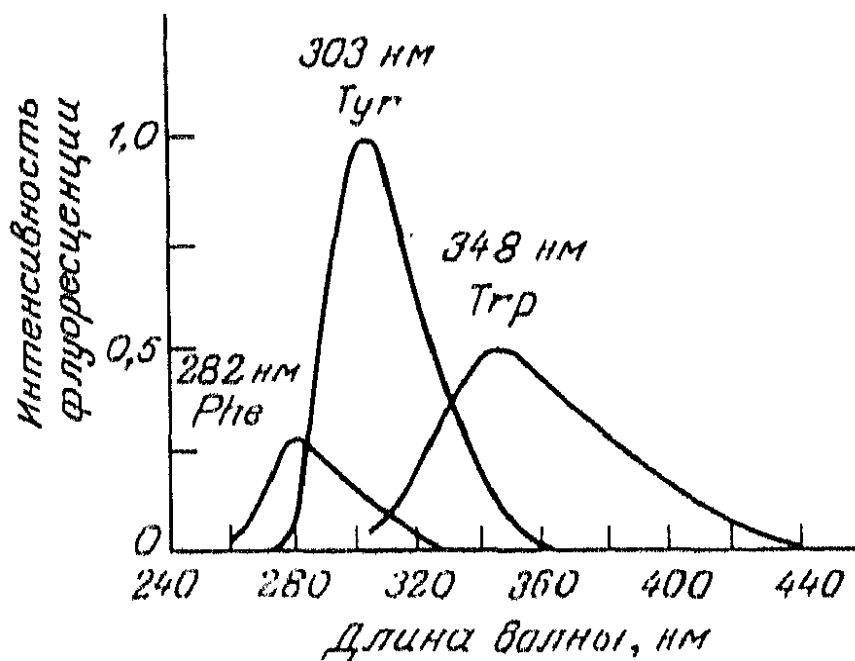


Рис. 2.27. Флуоресцентные спектры испускания ароматических аминокислот[68]

Тирозин и фенилаланин флуоресцируют слабее, чем триптофан. В воде флуоресценция тирозина имеет максимум при 303 нм (рис.2.25-2.27) и квантовый выход 0,21. При включении тирозина в белок квантовый выход уменьшается в 8-10 раз. Фенилаланин имеет самую слабую флуоресценцию из ароматических аминокислот: максимум флуоресценции около 282 нм (рис. 2.25-2.27), квантовый выход в белке выше (0.061), чем в водном растворе (0.038) [105].

Если в состав белка входят все три аминокислоты, то в спектре флуоресценции проявляется только один триптофановый максимум. Даже в сывороточном альбумине человека, содержащем 17 остатков тирозина и только один остаток триптофана, свечение тирозина проявляется лишь в виде «плеча» на коротковолновом склоне полосы флуоресценции триптофана. Оказывается, что значительная доля энергии возбуждения, полученная тирозиновыми остатками, может мигрировать на триптофанилы и высвечиваться в качестве триптофанового компонента [106,107].

К природным флуорофорам относятся также нуклеиновые кислоты, коферменты и витамины, продукты окисления и пигменты. При обычных условиях водные растворы флуоресцируют слабо, с низким квантовым выходом. Например, для растворов нуклеиновых кислот свечение усиливается в кислой среде. Положение максимума флуоресценции различно для разных веществ, например для ДНК составляет 358 нм и совпадает с максимумом гуанина.

Увеличение интенсивности флуоресценции оснований нуклеиновых кислот происходит также при низкой температуре. Исследование собственной флуоресценции биологических материалов не всегда позволяет получить желаемую информацию об объекте. В таком случае используют искусственные флуорофоры, т.е. специально синтезированные вещества, в том числе лекарственные препараты, имеющие специфический спектр флуоресценции либо в свободном состоянии, либо при связывании с тем или иным объектом исследования. Флуоресценция таких веществ (зондов), как правило, обладает высоким квантовым выходом и достаточно большим временем жизни. Поскольку флуоресцентный метод является очень чувствительным, то для его применения необходимы не менее чувствительные приборы.

Для получения полной информации о спектрах ФЛ необходимо использовать приборы, оснащённые высокочувствительными приёмниками излучения. В лабораторной и научно-исследовательской практике для регистрации спектров флуоресценции применяют специальные приборы, называемые спектрофлуориметрами. Основными узлами этих приборов являются источники возбуждающего света, монохроматоры для выделения как возбуждающего, так и испускаемого света, фотоумножители или многоэлементные приёмники излучения и анализирующие сигнал вторичного излучения компьютеры. Спектрофлуориметр должен быть снабжен универсальными и надёжными оптическими деталями – затворами, системой расщепления светового пучка, поляризаторами, дифракционными решетками, оптическими фильтрами и др. В свою очередь, каждый из узлов спектрофлуориметра должен соответствовать максимальным требованиям, предъявляемым к работе [3]: 1) источник света должен соответствовать полосе возбуждения фотолюминесценции; 2) монохроматор должен пропускать фотоны различных длин волн в области спектра люминесценции; 3) эффективность монохроматора должна несущественным образом зависеть от поляризации анализируемого вторичного излучения; 4) приемник излучения должен характеризоваться достаточно высокой чувствительностью.

III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

3.1. Основные оптические элементы, используемые в спектроскопии КР

В обычном эксперименте КР на образце или внутри его фокусируется лазерное монохроматическое излучение достаточно высокой интенсивности. Часть рассеянного излучения с помощью конденсора направляется в диспергирующую систему (обычно двойной монохроматор). В двойном монохроматоре происходит пространственное разделение рассеянного света с разными частотами. На выходе монохроматора возникает изображение спектра КР, состоящее из ряда очень слабых линий. Для эксперимента КР важное значение имеет оптическая система на входе в спектрометр, которая схематически изображена на рис. 3.1 [108].

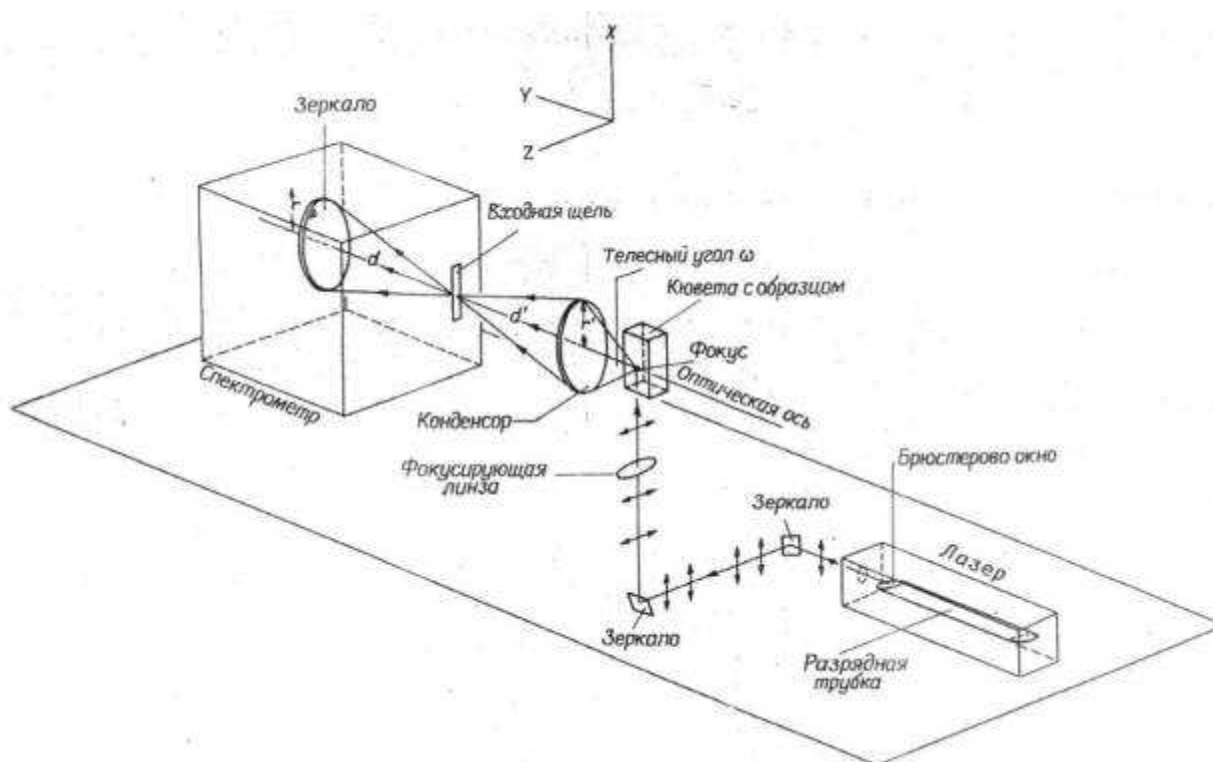


Рис.3.1. Типовая экспериментальная схема для анализа спектров КР [108]

Лазер (оптический квантовый генератор) – это устройство, которое является источником монохроматического направленного излучения. В течение многих лет в спектроскопии КР в качестве источника возбуждающего излучения применялся аргоновый лазер. Рабочей активной средой этого лазера явля-

ется газообразный аргон, находящийся внутри в вакуумированной стеклянной газоразрядной трубке. Генерация лазерного излучения обеспечивается присутствием резонатора в виде двух зеркал с диэлектрическими многослойными покрытиями. При электрическом разряде через газ часть молекул аргона возбуждается с образованием ионов Ar^+ ; эти ионы затем спонтанно испускают кванты электромагнитного излучения. Испущенные кванты света начинают перемещаться вдоль трубки, отражаясь от торцевых зеркал и индуцируя при этом испускание квантов другими атомами аргона. Происходит лавинообразный рост числа квантов одной и той же частоты, перемещающихся между зеркалами резонатора. Интенсивность индуцированного излучения быстро нарастает, и оно может быть выведено наружу, для чего одно из зеркал сделано полупрозрачным. В большинстве случаев в спектроскопии КР используются непрерывные лазеры, которые испускают свет постоянно. При этом чаще всего используются непрерывные лазеры на ионах аргона и криптона. При необходимости плавного изменения частоты лазерного излучения можно использовать лазеры на красителях. Конструктивно лазер на красителях включает исходный лазерный источник света (например, аргоновый или криптоновый лазер), который «накачивает» флуоресцентные переходы красителя. Узкие спектральные участки в спектре флуоресценции могут усиливаться в резонаторе лазера. Так как полоса флуоресценции является довольно широкой (обычно около 50 нм), возможна плавная перестройка длины волны лазерного излучения в этом диапазоне.

В спектроскопии КР используются также импульсные лазеры, которые испускают серию световых импульсов небольшой длительности, но достаточно высокой мощности. Достоинством импульсных лазеров является то, что частоту их излучения можно удвоить, если пропустить излучение через нецентросимметричные кристаллы определенных неорганических веществ. Эффективность удвоения частоты исходного лазерного излучения обычно пропорциональна квадрату интенсивности этого излучения. Таким образом, удвоение частоты излучения можно эффективно осуществить лишь для импульсных лазеров, поскольку их пиковая интенсивность достаточно велика.

Благодаря фокусирующей линзе плотность светового потока, падающего на образец, увеличивается, и, таким образом, растет сигнал рассеянного излучения. Линзы с фокусным расстоянием 30 - 70 мм обычно дают в образце приемлемый фокальный объем. Как видно из рис.3.1, точка, где сфокусирован лазерный луч в образце, и центр собирающей линзы (конденсора) должны лежать на оптической оси спектрометра. Обычно образец помещают на двойном фокусном расстоянии от фокусирующей линзы, расположенной на этом же

расстоянии от щели спектрометра. При этом изображение светящейся области в образце переносится на щель спектрометра в неизменённом масштабе.

Для регистрации низкочастотных спектров комбинационного рассеяния, расположенных в непосредственной близости от положения возбуждающего излучения, а также для получения информации о спектрах КР микрообъектов может быть использована экспериментальная установка с тройным монохроматором типа T64000(фирма "Horiba - Jobin Yvon"), снабжённая микроскопом (см. рис. 3.2).

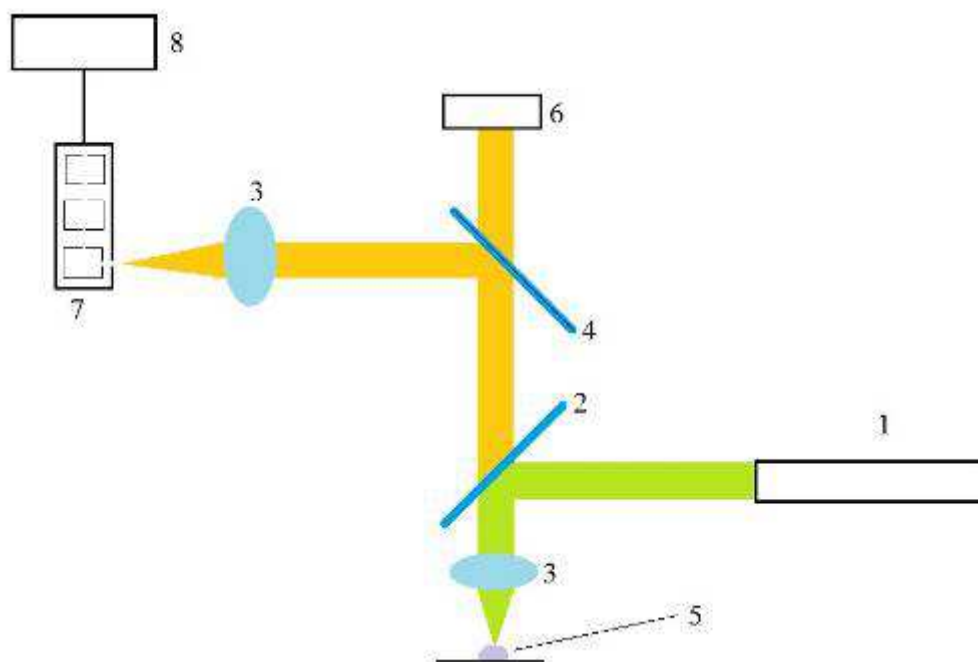


Рис. 3.2. Схема экспериментальной установки для регистрации спектров КР с использованием спектрометра T64000:

- 1 – аргонный лазер, 2 - полупрозрачное зеркало, 3 - собирающая линза,
4 - зеркало, 5 -исследуемое вещество, 6 - микроскоп,
7 - тройной монохроматор T64000, 8 -компьютер*

Установка включает в себя источник возбуждающего излучения - аргонный лазер с длиной волны возбуждения 514,5 нм и мощностью 15 mW, микроскоп, тройной монохроматор и компьютер. Технические характеристики используемого при этом монохроматора приведены в таблице 3.1. Оптическая схема установки с тройным монохроматором T64000 и микроскопом приведена на рис. 3.2. Использование такой установки позволяет получать информацию о спектрах комбинационного рассеяния от микропроб вещества в широком спектральном диапазоне частот ($5\text{-}4000\text{см}^{-1}$) с пространственным разрешением до нескольких микрометров.

Основные технические характеристики тройного монохроматора Т64000

Фокусное расстояние зеркал	640 мм
Апертура	$f / 7.5$
Дисперсия	$2,3\text{\AA} / \text{мм}$
Решетки	$76 \times 76 \text{ мм}^2$
Привод	Синусная линейка
Спектральный сдвиг	$0,0066\text{\AA}$

3.2. Подготовка образцов для регистрации спектров КР и ФЛ

В настоящее время требования к образцам, используемым при исследованиях спектров КР, существенно упростились. В качестве объектов исследования могут быть использованы прозрачные жидкости, мелкокристаллические порошки, монокристаллы, взвеси, плёнки, квазиодномерные структуры и т.д. Лазерный луч фокусируется на поверхности образца или внутри него. Благодаря особенностям лазерного луча (узкий пучок с ничтожно малым углом расхождения) его можно использовать при облучении образца или ячейки различной конструкции или конфигурации. Большое преимущество эксперимента КР, связанное с геометрической простотой конструкции и расположения элементов, состоит в том, что можно исследовать образцы, находящиеся в любом агрегатном состоянии. Для изучения жидкостей применяется такая же ячейка с длиной светового пути 1 см, как во флуориметре. Правда, дно ячейки должно быть прозрачным. Поскольку чистые биологические объекты доступны обычно в очень небольших количествах, можно использовать ячейки объемом порядка 1 мкл. Для этой цели разработаны капиллярные ячейки. Раствор вводится в капилляр с помощью микропипетки, заполнение осуществляется таким же движением, как при встряхивании медицинского термометра. С момента открытия явления комбинационного рассеяния света Г. С. Ландсбергом и Л. И. Мандельштамом (при исследовании рассеяния света в кристаллах) и одновременно Ч. В. Раманом и К. С. Кришнаном (при исследовании в жидкостях) прошло более 80 лет. Несмотря на большие успехи современной лазерной спектроскопии КР до сих пор остаются трудности, связанные с методами увеличения эффективности преобразования возбуждающего излучения в сигнал КР.

Отношение интенсивности КР I_{RS} в спектре вторичного излучения к интенсивности падающего излучения I_0 в однородной среде можно записать в виде:

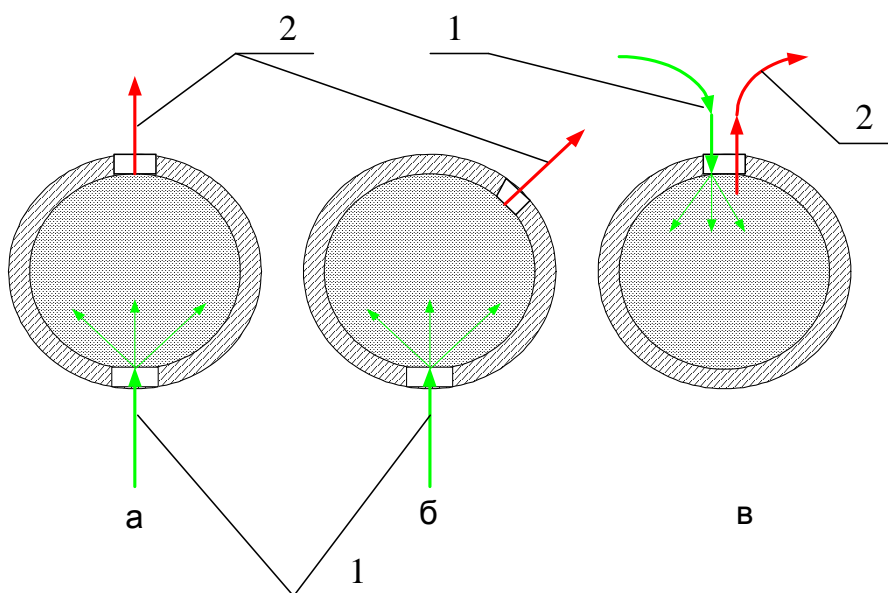
$$\frac{I_{RS}}{I_0} = \sigma N \mathcal{L} \Omega , \quad (3.1)$$

где σ – эффективное сечение КР ($\sigma \sim 10^{-28} \text{ см}^2$), N – концентрация частиц, L – путь, пройденный фотоном возбуждающего излучения в веществе, $\delta\Omega$ – телесный угол, в котором анализируется исследуемое излучение. Таким образом, при исследовании веществ в обычных кюветах длиной ~ 1 см отношение интенсивности КР I_{RS} в спектре вторичного излучения к интенсивности возбуждающего излучения I_0 при концентрации частиц $N \approx 10^{22} \text{ см}^{-3}$ и угле сбора рассеянного излучения ≈ 1 ср составляет

$$\frac{I_{RS}}{I_0} \approx 10^{-6}. \quad (3.2)$$

В результате на выходе из кюветы с однородной средой интенсивность КР в миллион раз оказывается слабее возбуждающего излучения.

В последнее время был разработан новый тип резонаторных кювет – фотонных ловушек (рис. 3.3), состоящий из резонаторной полости, имеющей отверстия для ввода и вывода светового излучения.



*Рис. 3.3. Принципиальные схемы фотонных ловушек:
а - схема «на просвет»; б - схема «рассеяние под углом»;
в - схема «рассеяние назад»; 1- возбуждающее (первичное) излучение;
2- вторичное излучение*

Эти кюветы позволяют осуществить условия, при которых на выходе из кюветы наблюдается многократное увеличение интенсивности КР.

При использовании фотонной ловушки интенсивность КР на выходе из ловушки удовлетворяет соотношению

$$\frac{I_{RS}}{I_0} \approx 10^{-1}. \quad (3.3)$$

Таким образом, в результате использования фотонной ловушки контрастность КР на выходе из кюветы с веществом возрастает на 4- 5 порядков.

3.3. Волоконно-оптические системы регистрации спектров вторичного излучения в биоактивных препаратах

Для возбуждения и регистрации спектров вторичного излучения в настоящее время весьма удобной становится волоконно-оптическая методика. Принципиальная схема для анализа спектров вторичного излучения с использованием такой методики приведена на рис.3.4. В качестве источника возбуждающего излучения использовался диод, генерирующий ультрафиолетовое излучение с длиной волны 280 нм. При этом мощность возбуждающего излучения составляла 1 мВт. Схема экспериментальной установки показана на рис.3.4.

На рис.3.5 представлена волоконно-оптическая схема для регистрации спектров вторичного излучения при геометриях «на просвет» или «на отражение», позволяющая использовать в качестве источников возбуждающего излучения, как лазеры, так и полупроводниковые светодиоды, характеризующиеся широким набором линий возбуждающего излучения: от инфракрасной области до ультрафиолетового диапазона.

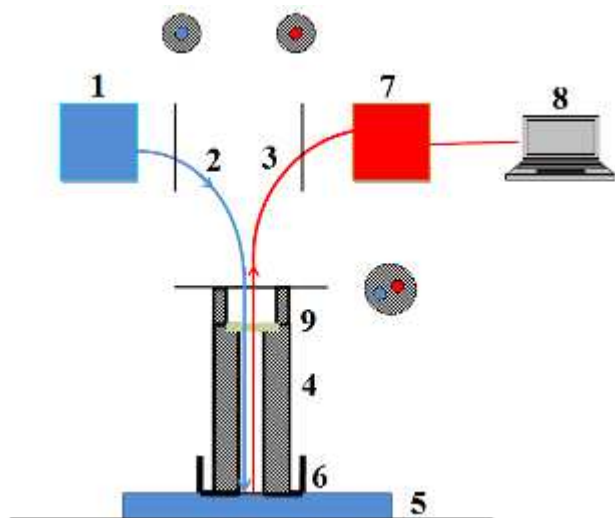


Рис. 3.4. Схема волоконно-оптической установки «на отражение» с Y-образным зондом с контактной регистрацией спектров:
1 – источник излучения,
2,3 – световоды, 4 – зонд, 5 – образец,
6 – диафрагма, 7 – спектрометр,
8 – компьютер, 9 – иммерсионная жидкость

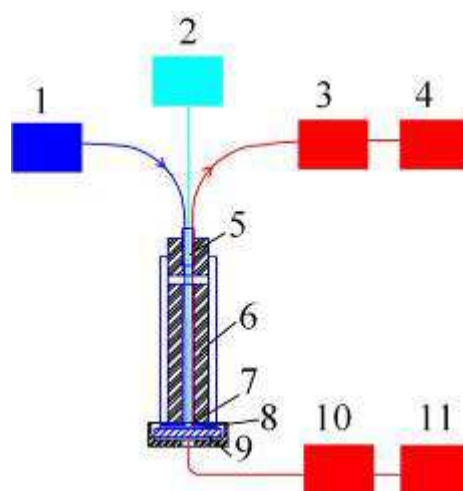


Рис.3.5. Волоконно-оптический микроскоп вторичного излучения в схеме ближнего поля «на отражение» и «на просвет»:
1,2-источники возбуждающего излучения, 3, 10-спектрометры,
4,11-компьютеры, 5-зонд, 6-насадка,
7-диафрагма,8-вещество для анализа,
9-подложка

Миниспектрометр (см. рис.3.6) FSD-8, используемый для регистрации спектров вторичного излучения, имеет цифровой выход, через который он подключен к компьютеру.

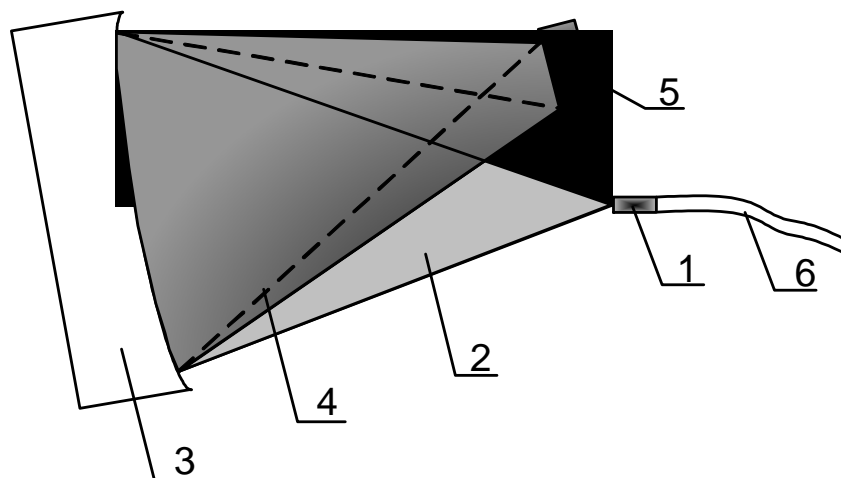


Рис. 3.6. Внешний вид миниспектрометра FSD-8

Миниспектрометр обладает малыми габаритами и оснащен высокоскоростным портом обмена информацией USB (Универсальный Последовательный Порт), служащим для его совместной работы с персональным компьютером (или ноутбуком). В качестве входной оптической щели измерительной схемы служит оптическое волокно диаметром 50 мкм, снабженное оптическим разъемом, установленным на стенке прибора и позволяющим подключать внешний оптоволоконный кабель для доставки оптического излучения. Следует отметить, что мобильность прибора ограничена только длинами оптоволоконного и USB кабелей. Оптическая схема миниспектрометра приведена на рис.3.7.

Входное отверстие 1, являющееся полированным торцом оптоволоконна, находится в фокальной плоскости сферической дифракционной решетки 3. Вогнутая дифракционная решетка разлагает световой сигнал на монохромати-

ческие составляющие и создает в своей фокальной плоскости изображение спектра. В этой фокальной плоскости установлен оптический датчик с линейно расположенными светочувствительными элементами (пикселями) 5.



*Рис. 3.7. Оптическая схема миниспектрометра FSD-8:
1 – входная щель миниспектрометра; 2 – исследуемое излучение;
3 – сферическая дифракционная решетка; 4 – спектральный состав;
5 – плоскость оптического датчика; 6 – световод*

Полученные в ходе эксперимента спектрометрические данные посредством специального программного обеспечения переводились в табличную форму и заносились в память компьютера для последующего хранения и обработки. Миниспектрометр имеет характеристики, представленные в таблице 3.2. Полученный с оптического датчика видеосигнал усиливается и нормализуется по уровню. Нормализующий усилитель также демпфирует выходные цепи оптического датчика. Далее сигнал поступает на АЦП, управление которым осуществляется микропроцессором синхронно с управлением оптическим датчиком, т. е. оцифровка уровня видеосигнала происходит только в моменты последовательного выбора светочувствительной ячейки датчика.

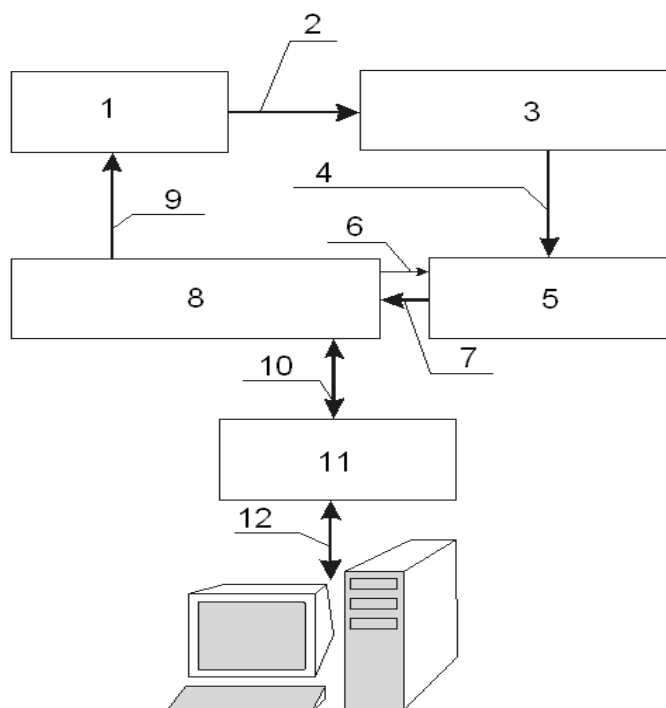
На рис. 3.8 приведена электрическая диаграмма миниспектрометра FSD-8. Полученный с оптического датчика 1 видеосигнал 2 усиливается и нормализуется по уровню. Нормализующий усилитель 3 также демпфирует выходные цепи оптического датчика. Далее сигнал поступает на АЦП 5, управление которым осуществляется микропроцессором 8 синхронно с управлением оптическим датчиком, т.е. оцифровка уровня видеосигнала происходит только в моменты последовательного выбора светочувствительной ячейки датчика. Передача оцифрованных данных осуществляется посредством контроллера USB 11 непосредственно в управляющую программу “FSD Soft” персонального компьютера по стандартному кабелю 12.

Технические характеристики миниспектрометра FSD-8

№	Технические характеристики	Значение
1	Спектральный диапазон	240-1000 нм
2	Дифракционная решетка	300 штр/мм
3	Спектральное разрешение	0,5 нм
4	Чувствительность	0,1-0,2 нВт (для длины волны 632,8нм)
5	Дисперсия по длине волны	2-4 нм
6	Оптический детектор	TCD1304AP (или TCD1304DJ)
7	Число пикселей детектора	3648
8	Размер пикселя CCD	0,008 x 0,2 мм
9	Минимальное время экспозиции	100 мкс
10	Максимальное время экспозиции	32 с
11	Разрядность АЦП	14 бит (16384 квантов)
12	Время преобразования АЦП	5 мкс
13	Время измерения одного полного спектра	20 мс
14	Синхронизация	внешняя, импульс положительный 5-10 В (5-20мкс)
15	Оптический разъем	SMA адаптер (для SMA-905)
16	Источник питания	питание осуществляется через шину USB
17	Потребляемый ток	не более 40 мА
18	Габаритные размеры	170 x 85 x 37 мм
19	Вес	не более 350 г

Рис. 3.8. Электрическая диаграмма миниспектрометра FSD-8:

- 1 – оптический датчик;
 2 – видеосигнал;
 3 – нормализующий усилитель;
 4 – нормализованный видеосигнал; 5 – АЦП (14 разрядов); 6 – видеоданные;
 7 – сигнал управления;
 8 – микропроцессор с видеопрограммой;
 9 – синхропоследовательность;
 10 – данные для обмена с компьютером;
 11 – контроллер USB;
 12 – связь с компьютером



Существует несколько способов сравнения спектров вторичного излучения веществ, например метод наименьших квадратов [109] или исследование функции корреляции спектров [110-113]. Современная вычислительная техника позволяет использовать различные способы сравнения спектров. Остановимся на описании простого способа, основанного на построении разностных спектров, задаваемых с помощью компьютера в нормированном цифровом виде. Построим разностные спектры вторичного излучения [114-118] на основе следующего соотношения:

$$K_X^B(\lambda) = 1 - |I_X(\lambda) - I_B(\lambda)|. \quad (3.4)$$

Здесь $I_X(\lambda)$, $I_B(\lambda)$ – нормированные спектры вторичного излучения анализируемого вещества (X) и эталонного вещества (Б). Для анализа спектров необходимо также учитывать усреднённый коэффициент, называемый коэффициентом соответствия. Этот коэффициент вычисляется по формуле:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^N (1 - |I_X(\lambda_i) - I_B(\lambda_i)|)}{N}. \quad (3.5)$$

3.4. Лазерная спектроскопия КР органических и неорганических соединений с использованием компактных волоконно-оптических схем регистрации

Создание компактных твердотельных лазеров, в частности YAG:Nd³⁺ – лазера с волоконно-оптическим выходом и волоконно-оптических мини спектрометров, оснащённых узкополосными фильтрами («нотч-фильтрами»), обеспечило возможность для реализации компактных приборов, обеспечивающих получение спектров КР от малых количеств вещества за предельно малые экспозиции (0,1-10 с). Для анализа спектров КР необходимо использование мини-спектрометров с высоким спектральным разрешением (1-5 см⁻¹) в сравнительно небольшом спектральном диапазоне вблизи лазерной линии (1-3000 см⁻¹). Это обеспечивается использованием дифракционных решёток с большим числом штрихов на миллиметр: 2400-3600. Нотч – фильтр, устанавливаемый в волоконно-оптическом тракте может обеспечить существенное подавление возбуждающего излучения на расстоянии 100-300 см⁻¹. Таким образом, для выполнения аналитических исследований в оперативном режиме отпадает необходимость использования дорогостоящих двойных и тройных монохроматоров.

Рисунки 3.9-3.15 иллюстрируют результаты анализа спектров КР органических и неорганических веществ с использованием компактного волоконно-оптического спектрометра. В качестве возбуждающего излучения при регистрации таких спектров применялась вторая оптическая гармоника лазера YAG:Nd³⁺ с длиной волны 532 нм.

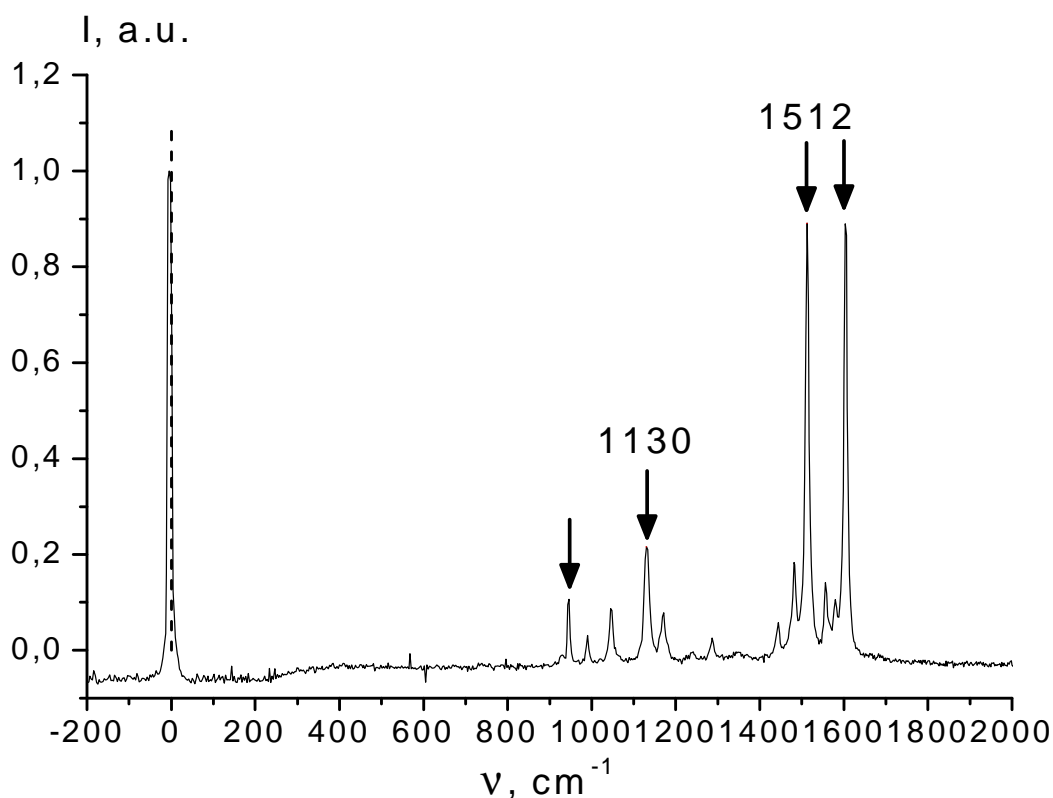


Рис. 3.9. Спектр КР органического порошка - POPOP

Использование разностного метода анализа спектров позволяет провести сопоставление исследуемого вещества с эталоном и установить присутствие в исследуемом объекте посторонних компонентов

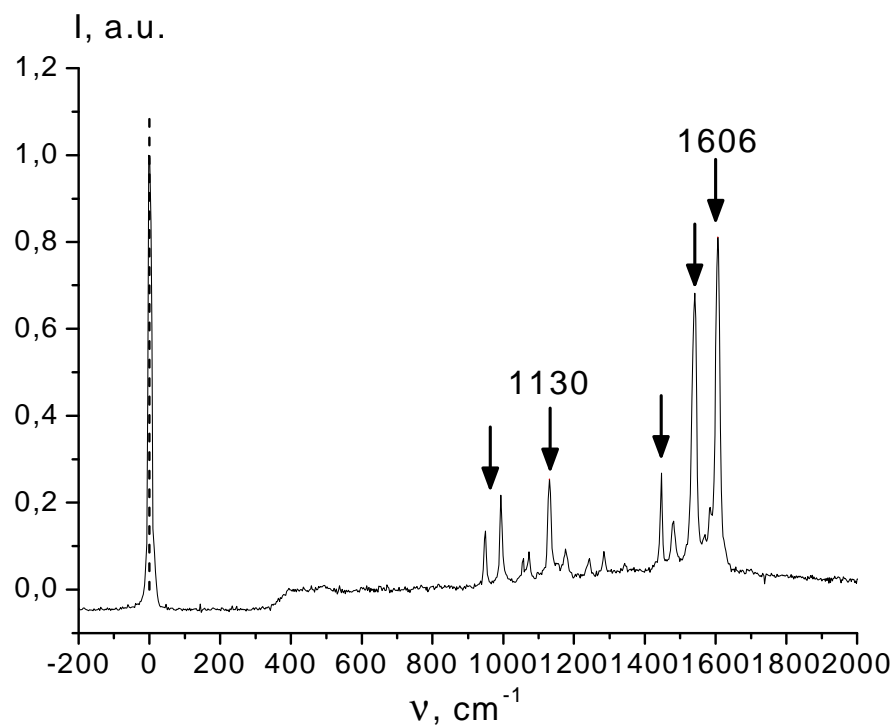


Рис. 3.10. Спектр КР твердотельного органического соединения - PPO

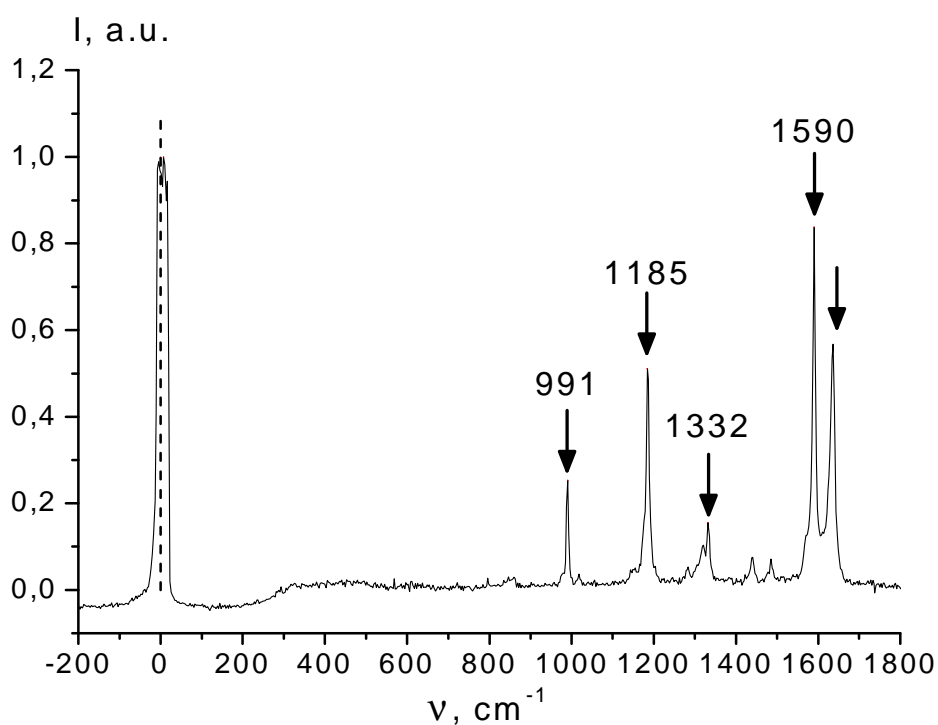


Рис. 3. 11. Спектр КР твердотельного органического соединения - стилибена

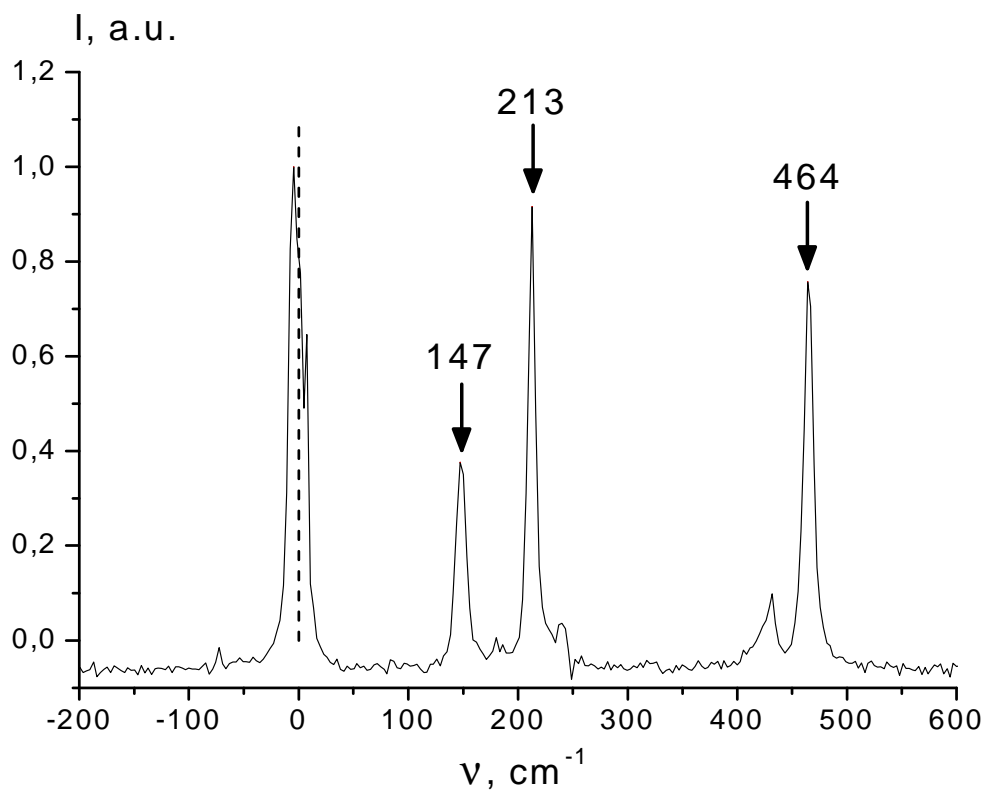


Рис. 3.12. Спектр КР неорганического соединения – поликристаллической серы

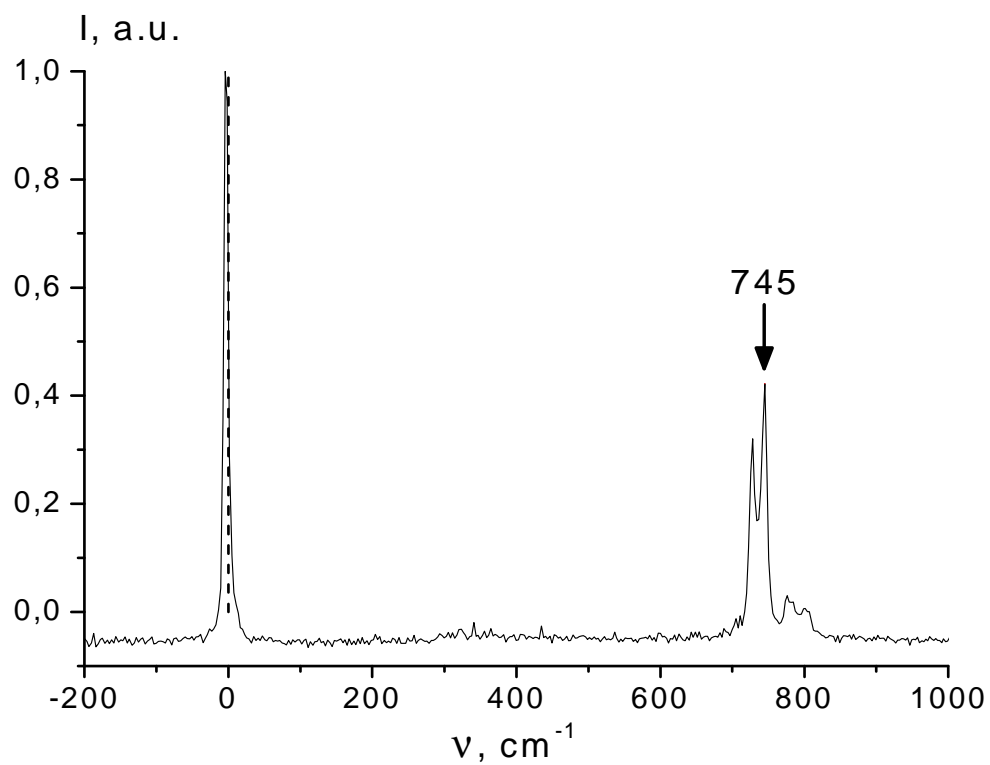


Рис. 3.13. Спектр КР твердотельного неорганического соединения KIO_3

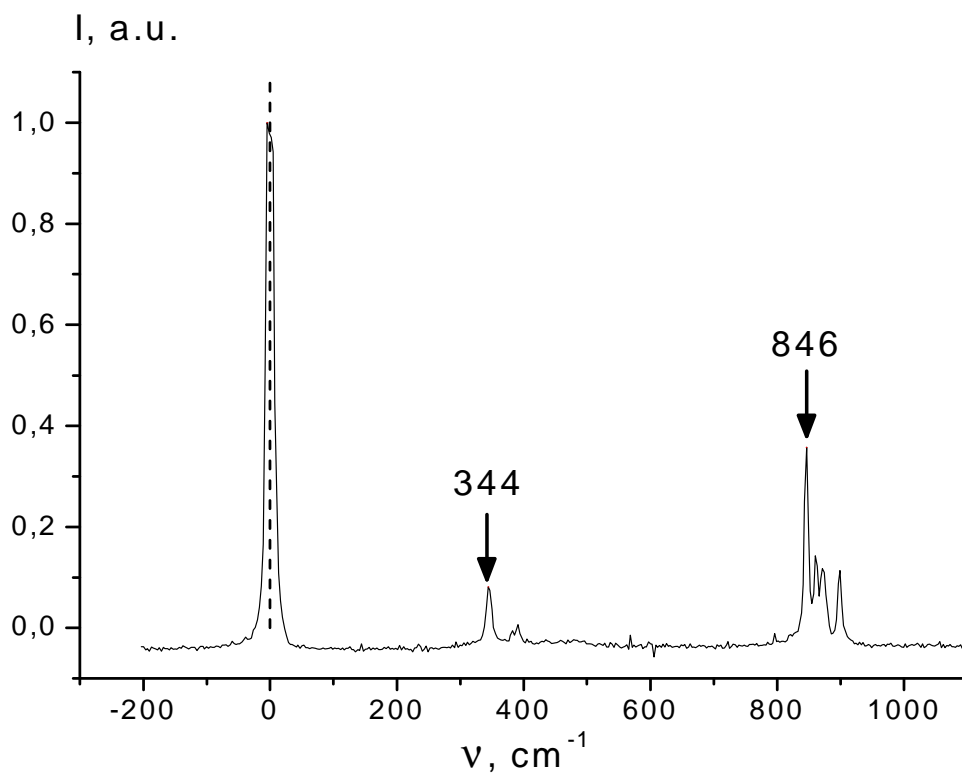


Рис. 3.14. Спектр КР твердотельного неорганического соединения K_2CrO_4

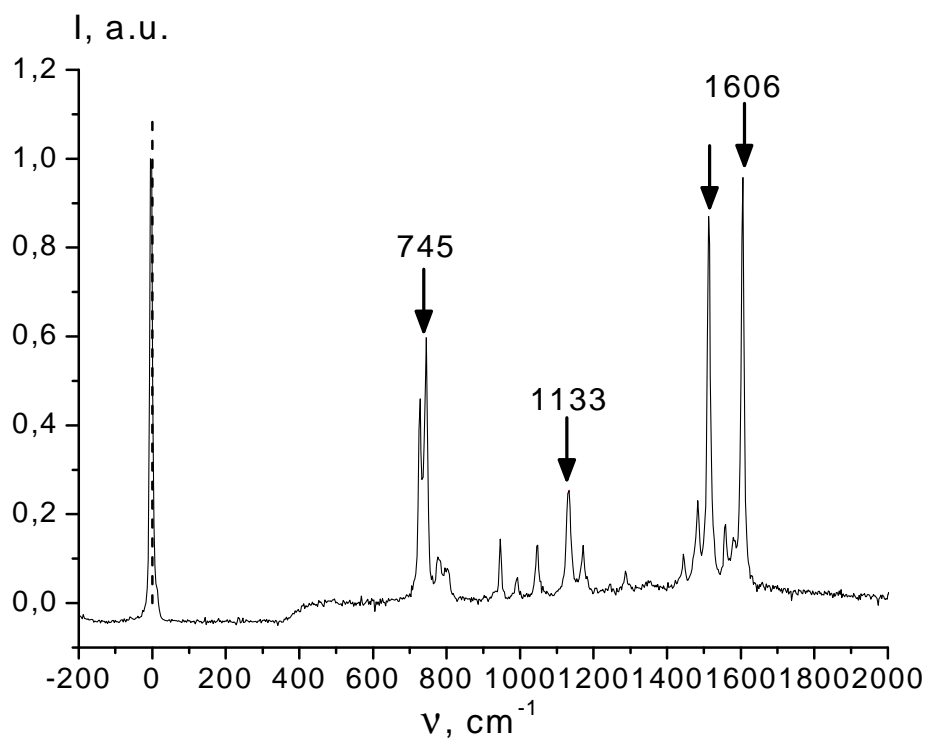


Рис. 3.15. Спектр КР смеси веществ $POPOP$ и KIO_3

3.5. Математическая обработка экспериментов и их обсуждение.

Прилагаемое к мини-спектрометру FSD-8 программное обеспечение “FSD Soft” предназначено для совместной работы мини-спектрометра с компьютером в среде Windows XP, Windows 2007. Данное программное обеспечение позволяет непосредственно из окна программы выбрать режим сканирования (дискретный или непрерывный); установить время засветки оптического датчика, что определяет чувствительность прибора; а также усреднить измеренный спектр в случае сильного зашумления измеряемого излучения.

Внешний вид окна программы с подключенным прибором FSD-8 показан на рис 3.16.

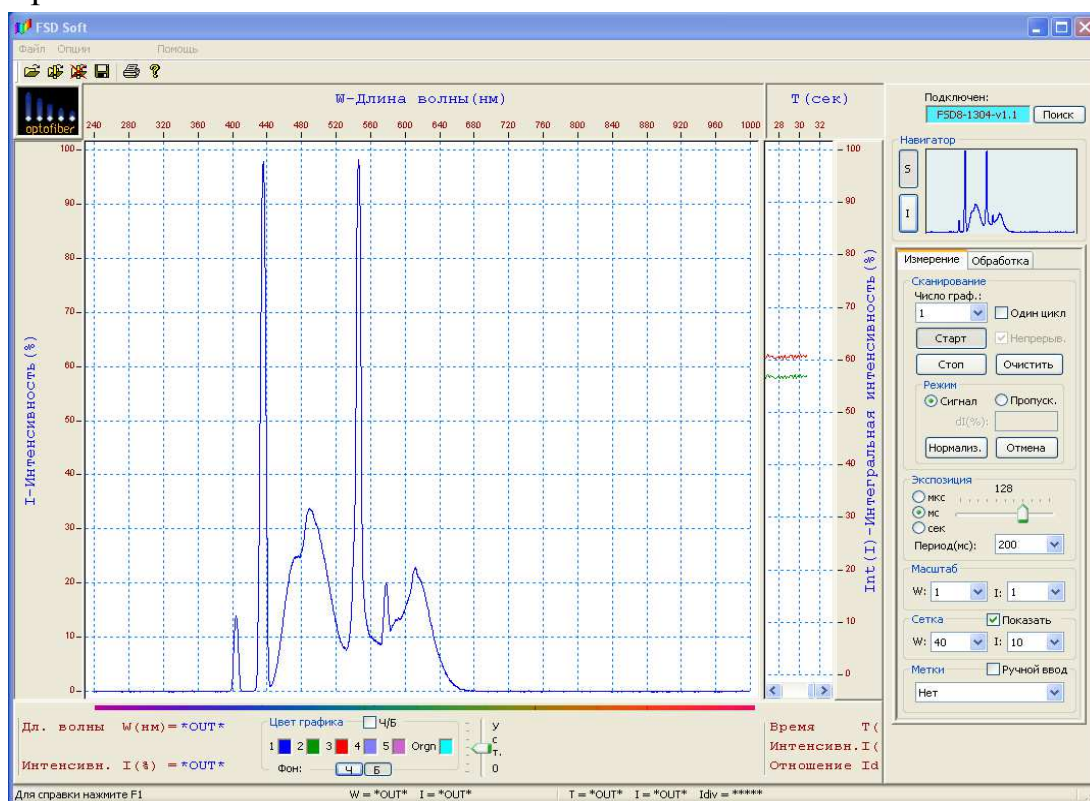


Рис. 3.16. Внешний вид окна программы FSD-Soft

Программа имеет два рабочих окна. Первое – для отображения графиков спектра, и второе – для вывода графиков интегральных составляющих спектральной характеристики. В самой верхней части окна расположено «Меню программы», ниже расположена «Панель инструментов», имеющая стандартные кнопки: “Открыть файл”, “Заккрыть файл”, ”Сохранить в файл”, ”Печать” и ”О Программе”. Перемещение мышки по рабочей области окна указывает на соответствующие координаты внутри графической информации. В верхней рабочей части окна отображения графиков спектра размещена ось длины волны (W), проградуированная в нанометрах (nm); в левой части – ось интенсивности (I) исследуемого излучения, проградуированная по выбору пользовате-

ля либо в относительных единицах (%), либо в абсолютных единицах (в квантах используемого 14 разрядного АЦП от 0 до 16383). В нижней части расположен монитор перемещений и оперативный контроль цветов исследуемых графиков.

В правой части всего окна размещена панель управления (ПУ) процессом измерений, имеющая несколько органов управления. В самой верхней части ПУ находится индикатор подключенного устройства. Слева от поля «Подключен» расположено изображение светодиода, имитирующего соединение с компьютером: когда идет обмен данными между прибором и компьютером, он «зажигается» зеленым цветом. Ниже на панели расположены закладки «Измерение» и «Обработка».

Закладка «Измерение» используется непосредственно для процесса измерения. На поле «Сканирование» расположены: кнопка «Старт», которая начинает работу прибора; кнопка «Стоп», которая заканчивает работу прибора; кнопка «Очистить», которая очищает экран от графика предыдущего измерения. Если отметить галочкой «Непрерыв.», сканирование будет продолжаться до тех пор, пока не будет нажата кнопка «Стоп». Если же «Непрерыв.» не отмечен, будет произведено только одно измерение. Поле «Число граф.:

» отображает число одновременно выводимых графиков измерений.

Поле «Экспозиция» служит для установки времени засветки оптического датчика, что определяет чувствительность прибора. Минимальное значение составляет 100 мкс, максимальное – 32 с. Выбор значения экспозиции производится выбором переключателей «мкс», «мс» и «сек» и перемещением ползунка справа.

Поле «Масштаб» служит для установки масштаба просмотра графика по осям длины волны и интенсивности. Выбор масштаба осуществляется в индикаторах “W:” и “I:” соответственно.

В процессе измерений есть вероятность появления сильно зашумленного сигнала. Например, это может иметь место при очень слабом сигнале и большом времени экспозиции. Для сглаживания характеристики отображаемого графика спектра исследуемого сигнала введена опция динамического осреднения измеренных значений (пункт главного меню «Опции» – «Осреднение»). Т.е. осреднение происходит в момент считывания информации с датчика. В то же время в программе присутствует отдельный инструмент с одноименным названием, который работает исключительно с последним статическим графиком. Для этого пользователю необходимо зайти в закладку «Обработка» – «Осреднение/Относительные характеристики».

Работа с инструментом «Осреднение» производится следующим образом. Необходимо выбрать график и число точек графика, по которым будет производиться осреднение. Далее, после нажатия кнопки «Применить», производится осреднение графиков и их отображение. Группа «Относительные характеристики» служит для выполнения таких действий, как вычитание и деление между двумя графиками.

Для сохранения графического изображения измеренных спектров, а также в текстовых и табличных форматах необходимо выбрать команду «Сохранить...», далее указать имя вновь сохраняемого файла в поле «Имя файла» и его расширение.

Спектры обрабатывались на компьютере при помощи программы Origin-7. Это пакет программ компании Origin Lab для обработки и численного анализа данных и научной графики, работающей на компьютере под управлением операционной системы Microsoft Windows [119].

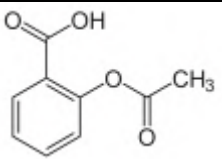
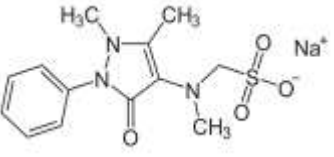
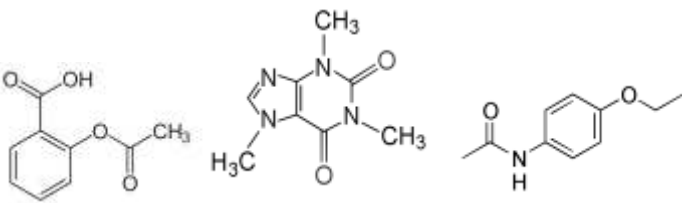
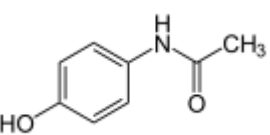
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ СПЕКТРОВ КР И ФЛ БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

4.1. Спектры фотолюминесценции фармацевтических препаратов, находящихся в фотонных ловушках

В качестве объектов исследования были выбраны типичные фармацевтические препараты (цитрамон, анальгин, аспирин и парацетамол). В сводной таблице 4.1 приведены химические и структурные формулы исследованных фармацевтических препаратов. Как видно из этой таблицы, в структуре всех исследованных веществ присутствуют ароматические кольца, что приводит к фундаментальному электронному поглощению этих соединений в среднем ультрафиолетовом диапазоне. Соответственно в этих веществах наблюдается флуоресценция в фиолетово-красном диапазоне при возбуждении флуоресценции коротковолновым (266 нм) электромагнитным излучением. Измерения проводились при комнатной температуре.

Таблица 4.1

Структурные формулы фармацевтических препаратов

Фармацевтический препарат	Химическая формула	Структурная формула
Аспирин	$C_9H_8O_4$	
Анальгин	$C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$	
Цитрамон (аспирин, кофеин, фенацетин)	$C_9H_8O_4 + C_8H_{10}N_4O_2 + C_{10}H_{13}NO_2$	
Парацетамол	$C_8H_9NO_2$	

В таблице 4.2 приводятся производители исследуемых фармацевтических препаратов.

Таблица 4.2

Наименование производителей различных фармацевтических препаратов

Название вещества	№ образца	Производитель
Цитрамон-П	1	ОАО «Фармстандарт-Лексредства» 305022, Россия, г. Курск, ул.2-я Агрегатная, 1а/18; тел.: (4172)34-03-13.
	2	ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод» 305022, Россия, г. Курск, ул.2-я Агрегатная, 1а/18; тел.: (4172)34-03-13.
	3	ОАО «УРАЛБИОФАРМ» 620026, Россия, г. Екатеринбург, ул. Куйбышева, 60; тел.: (343)254-01-83.
	4	ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм» 634009, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 211; тел.: (3822) 40-32-43.
Аспирин	1	ОАО «УРАЛБИОФАРМ» 620026, Россия, г. Екатеринбург, ул. Куйбышева, 60; тел.: (343)254-01-83.
	2	ЗАО «Производственная фармацевтическая компания Обновление». 630071, Россия, г. Новосибирск, ул. Станционная, 80; тел.: (383) 359-11-99.
	3	ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм» 634009, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 211.

Парацетамол	1	ЗАО «МЕДИСОРБ» 614113, Россия, г. Пермь, ул. Гальперина, 6; тел.: (342)255-10-31.
	2	ООО «АСФАРМА» 652473, Россия, г. Анжеро-Судженск, ул. Герцена, 7; тел.: (38453)5-23-51.
	3	ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод» 305022, Россия, г. Курск, ул.2-я Агрегатная, 1а/18; тел.: (4172)34-03-13.
Анальгин	1	ООО «АСФАРМА» 652473, Россия, г. Анжеро-Судженск, ул. Герцена, 7; тел.: (38453)5-23-51.
	2	ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод» 625005, Россия, г. Тюмень, ул. Береговая, 24; тел.: (3452)46-23-50.
	3	ОАО «Фармстандарт-Лексредства» 305022, Россия, г. Курск, ул.2-я Агрегатная, 1а/18; тел.: (4172)34-03-13.

Спектры ФЛ фармацевтических препаратов были получены при возбуждении излучением четвёртой оптической гармоники ($\lambda=266$ нм) лазера на алюмоиттриевом гранате. При этом были использованы волоконно-оптические схемы экспериментов, приведенные на рис. 4.1 и 4.2.

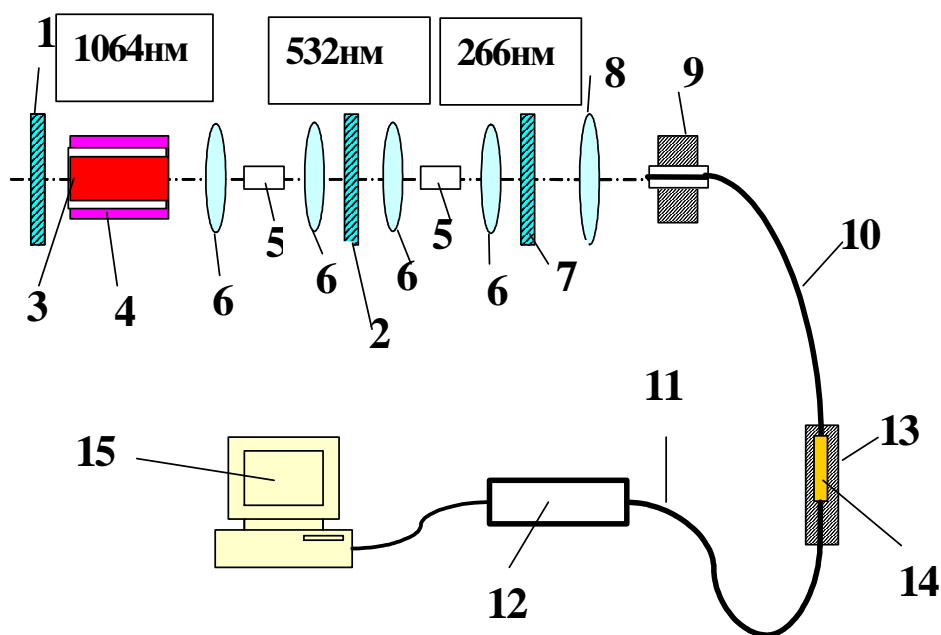


Рис. 4.1. Схема "на просвет" экспериментальной установки для анализа биоактивных препаратов с использованием четвёртой оптической гармоники (266 нм) лазера YAG:Nd³⁺:

1,2,7 – зеркала; 3 – активный элемент; 4 – накачка; 5 – нелинейный кристалл; 6 – линза; 8 – конденсор; 9 – фиксатор световода; 10, 11 – световод; 12 – спектрограф; 13 – кембрик; 14 – измеряемый образец; 15 – компьютер

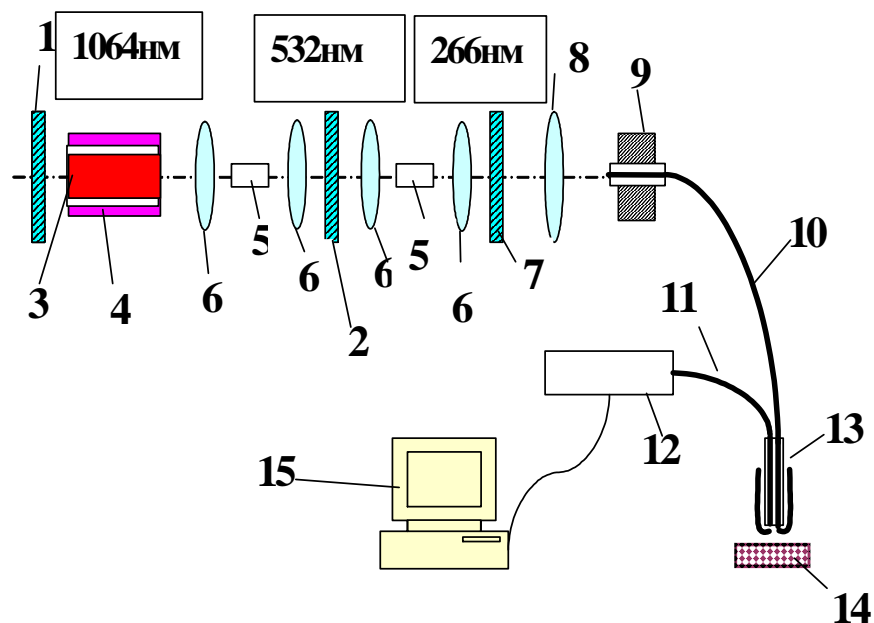


Рис. 4.2. Схема "на отражение" экспериментальной установки для анализа биоактивных препаратов с использованием четвёртой оптической гармоники (266 нм) лазера YAG:Nd³⁺:
 1, 2, 7 – зеркала; 3 – активный элемент; 4 – накачка;
 5 – нелинейный кристалл; 6 – линза; 8 – конденсор;
 9 – фиксатор световода; 10, 11 – световод; 12 – спектрограф;
 13 – кембрик; 14 – измеряемый образец; 15 – компьютер

После компьютерной обработки были построены нормированные спектры ФЛ исследуемых фармацевтических препаратов. На рис. 4.3 (а, б) приводятся спектры вторичного излучения двух образцов аспирина при толщине слоя 1 мм, полученные от двух фирм – производителей. Из рис. 4.3 (а, б) видно, что в спектрах фотолюминесценции образцов аспирина наблюдаются небольшие различия в областях 400-500 нм и 600-750 нм.

На рис. 4.4 (а-д) приведены спектры вторичного излучения, полученные от четырех образцов цитрамона. При этом толщина слоя вещества составляла 1 мм.

Как видно из рис. 4.4 (а-д), наблюдаемые спектры фотолюминесценции цитрамона существенным образом отличаются от спектров аспирина. Такое различие обусловлено тем, что в составе цитрамона, наряду с аспирином, присутствуют другие компоненты (табл. 4.1), которые приводят к появлению дополнительной полосы в области 400-550 нм. Наблюдаемые спектры фотолюминесценции всех четырех образцов цитрамона отличаются несущественно [120, 121].

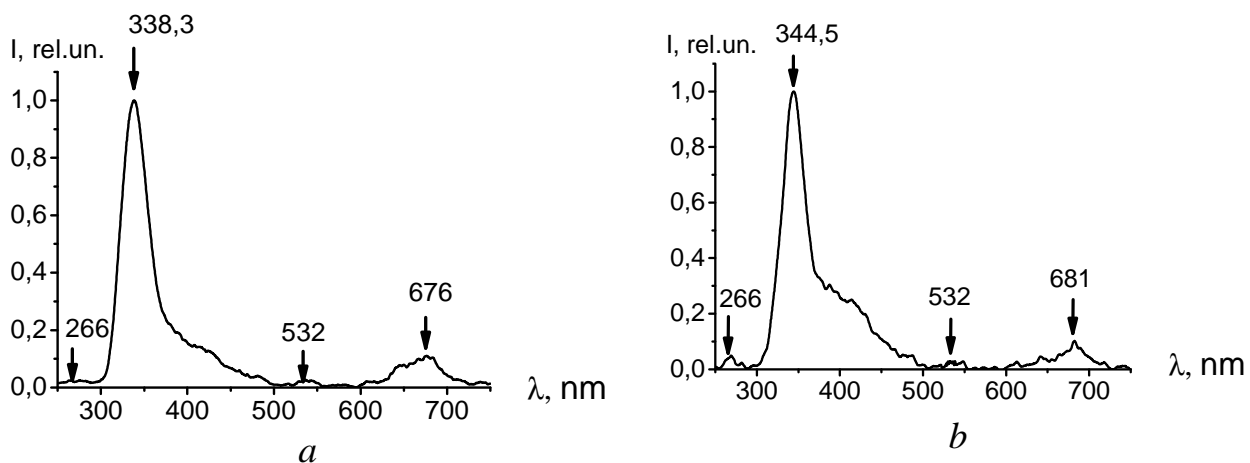


Рис. 4.3. Нормированные спектры фотолюминесценции двух твердых образцов аспирина: *a* – аспирин № 1, *b* – аспирин № 2

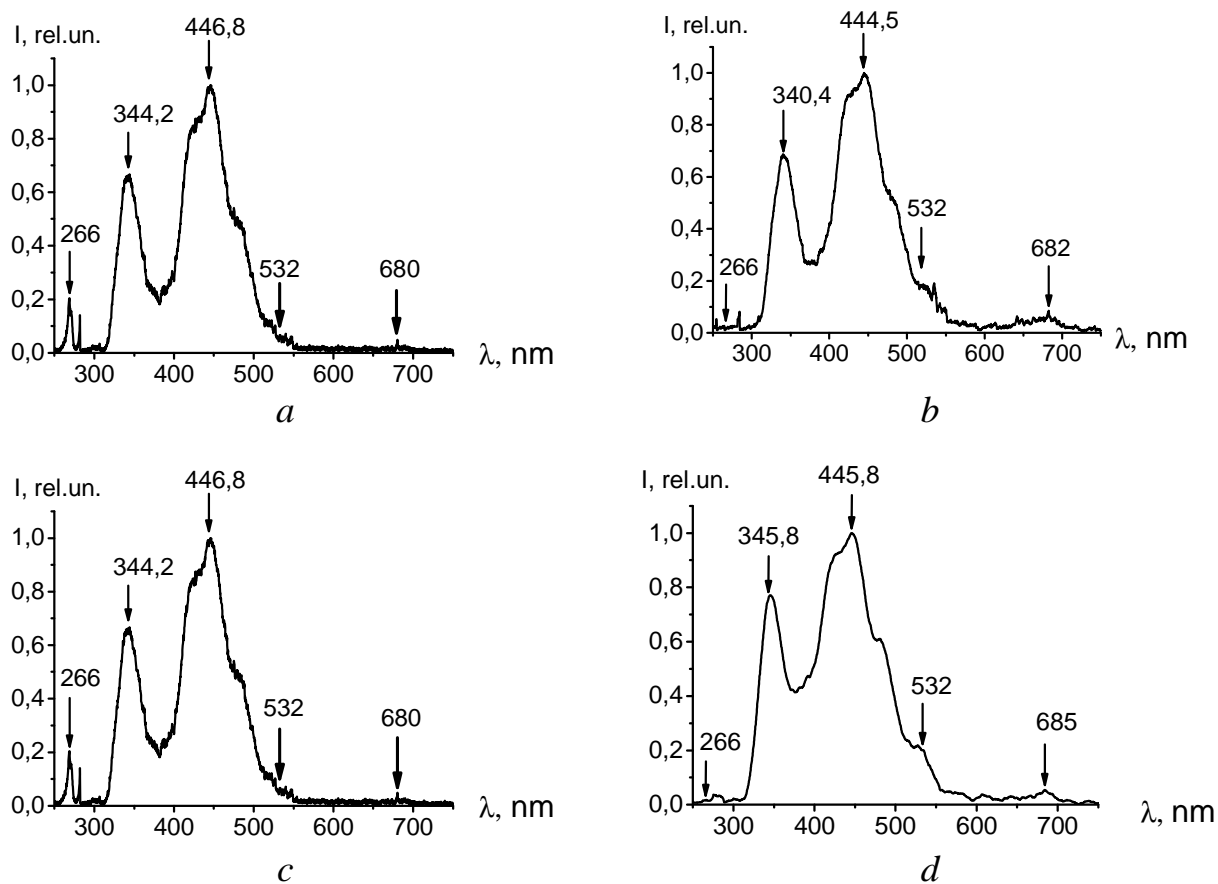


Рис. 4.4. Нормированные спектры фотолюминесценции твердых фаз цитрамона: *a* - цитрамон № 1, *b* - цитрамон № 2, *c* - цитрамон № 3, *d* - цитрамон № 4; слой 1 мм

При уменьшении толщины слоя вещества в кювете до 0,1 мм вид спектров фотолюминесценции цитрамона существенно изменяется: наблюдается

резкое возрастание полосы фотолюминесценции в коротковолновой области спектра (см. рис. 4.5 (а - d)).

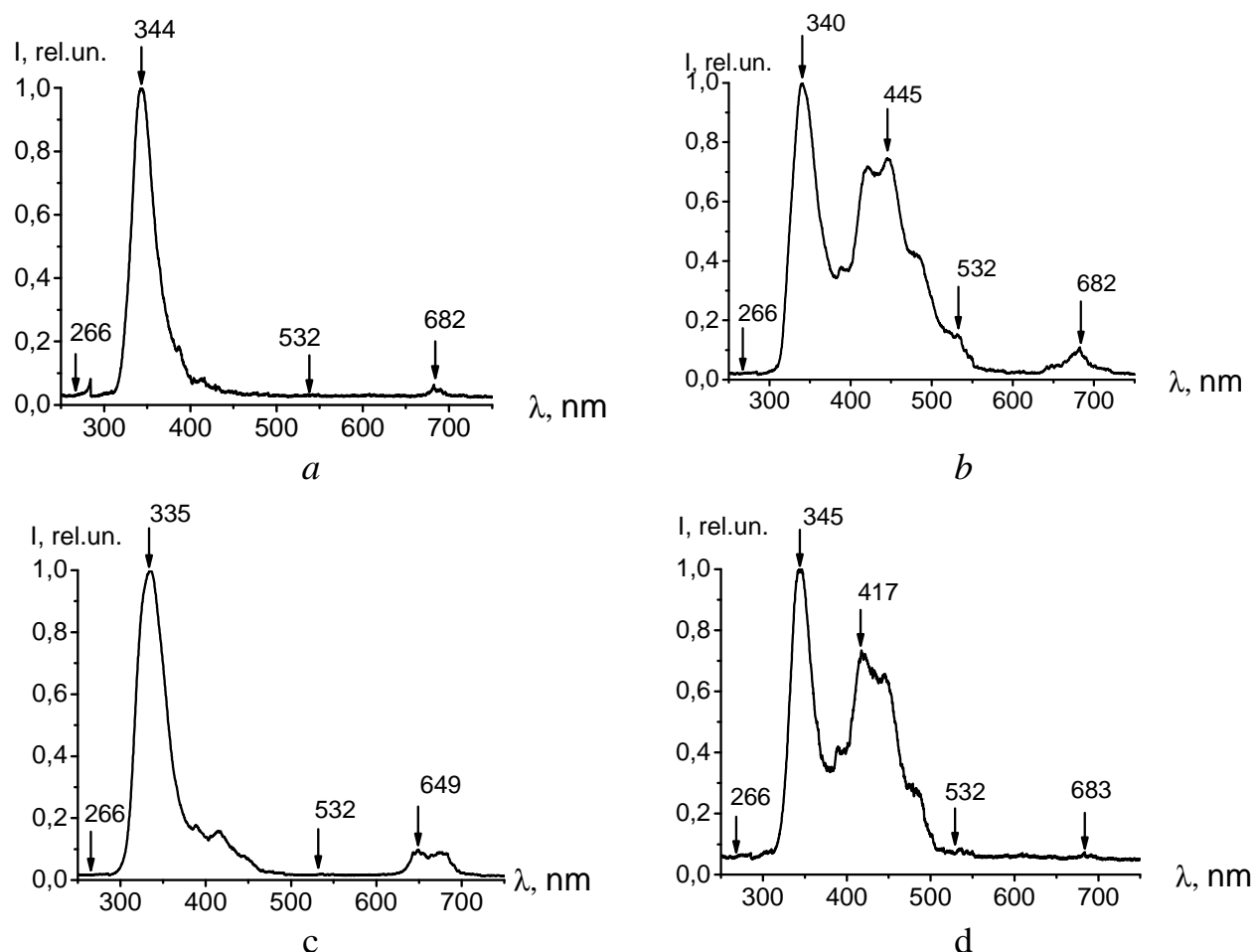


Рис. 4.5. Нормированные спектры фотолюминесценции твердотельных фаз тонкого слоя цитрамона: а - цитрамон № 1, б - цитрамон № 2, с - цитрамон № 3, d - цитрамон № 4; толщина слоя - 0,1 мм (№ образца соответствуют номерам в таблице 4.2)

В наибольшей степени такой эффект обнаруживается для образцов № 1 и № 3, для которых полоса фотолюминесценции в синей области спектра практически отсутствует.

На рис. 4.6 (а, б) приведены спектры вторичного излучения, полученные от насыщенных водных растворов двух образцов аспирина.

Из сравнения рис. 4.1 и 4.6 видно, что при переходе от твердотельных образцов к насыщенным водным растворам происходит возрастание интенсивности фотолюминесценции в коротковолновой области спектра и её спадание в фиолетово - синей области.

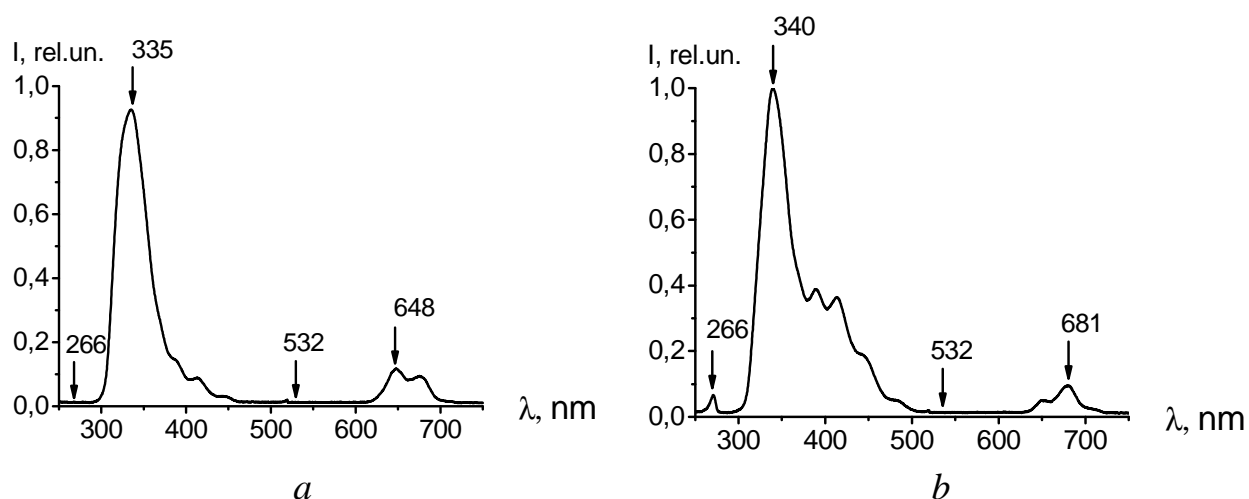


Рис. 4.6. Нормированные спектры фотолюминесценции водных растворов образцов фармацевтических препаратов: а – аспирин № 1, б – аспирин № 3. (№ образца соответствуют номерам в таблице 4.2)

На рис. 4.7 (а - d) приведены соответствующие спектры вторичного излучения, полученные от водных растворов четырех образцов цитрамона. При этом наблюдается аналогичный эффект, наиболее чётко выраженный для образцов № 1 и № 3: в спектрах обнаруживается интенсивная узкая полоса с максимумом 330 и 338 нм соответственно.

Таким образом, нормированные спектры фотолюминесценции водных растворов цитрамона (рис. 4.7) существенно отличаются от спектров фотолюминесценции твердотельной фазы цитрамона (рис. 4.5).

На рис. 4.8 и 4.9 приведены спектры вторичного излучения, полученные от водных растворов парацетамола и анальгина. В случае парацетамола наблюдается интенсивная узкая полоса в коротковолновой области (307 нм), а также широкая интенсивная полоса в красной области спектра (648 нм). В случае анальгина в спектре обнаруживается интенсивное люминесцентное излучение с максимумом 650 нм и дополнительная полоса в синей области спектра (454 нм).

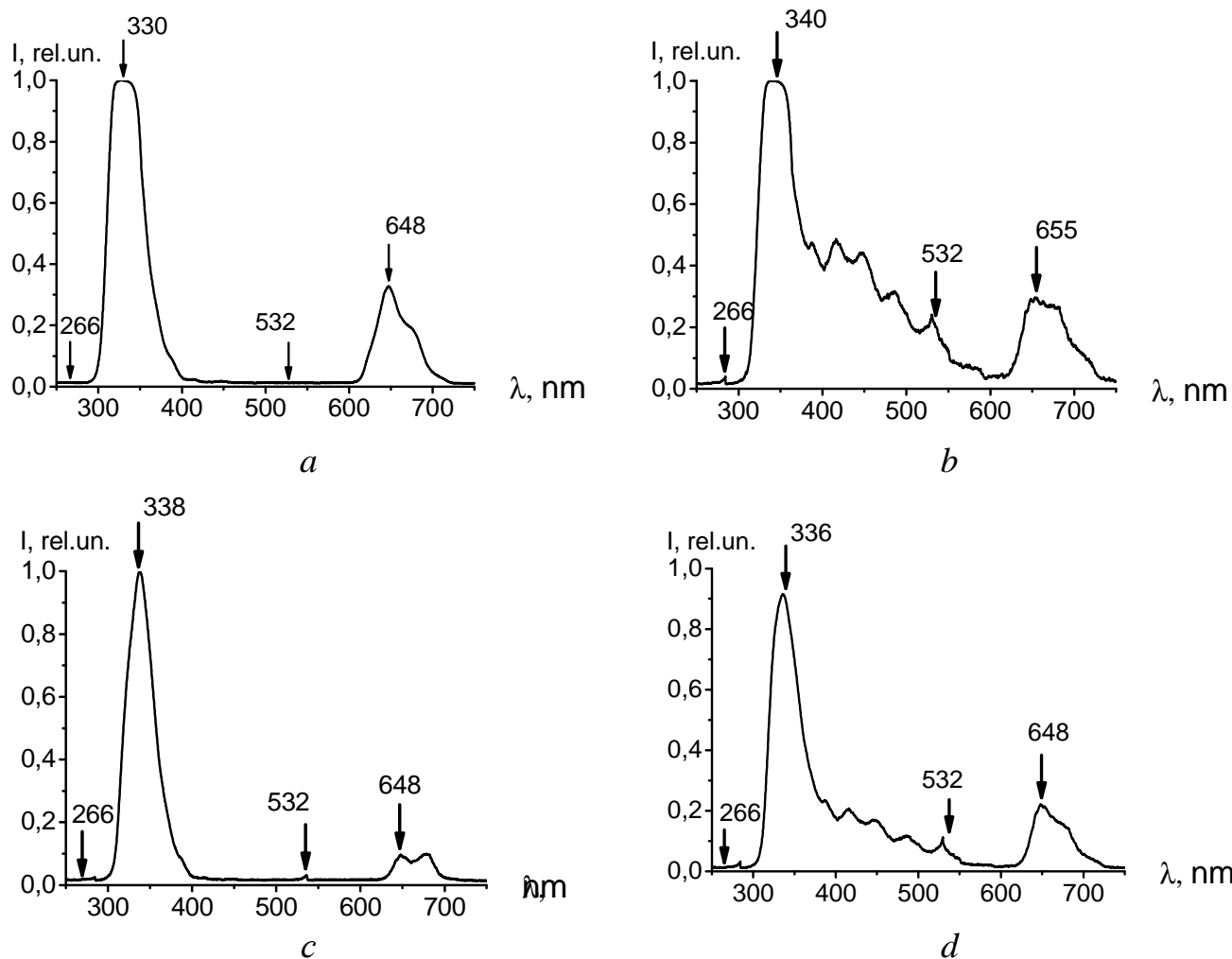


Рис. 4.7. Нормированные спектры фотолуминесценции водных растворов фармацевтических препаратов: а – цитрамон № 1, б – цитрамон № 2, с – цитрамон № 3, d – цитрамон № 4

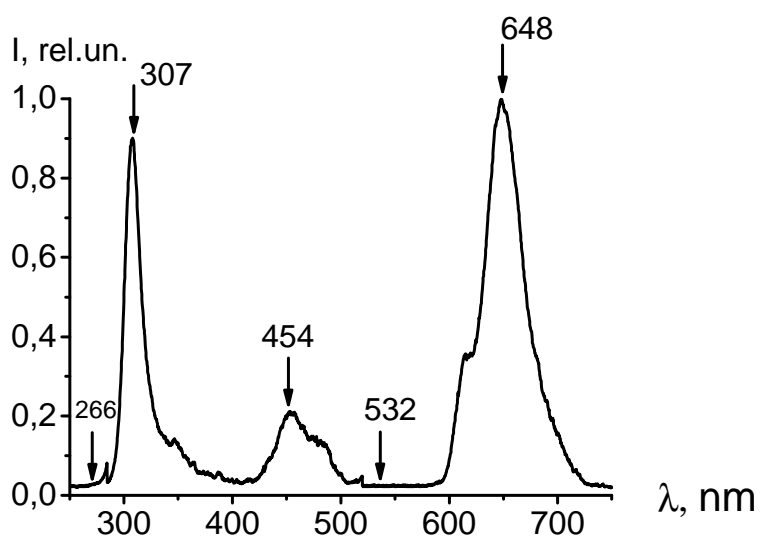


Рис. 4.8. Нормированный спектр водного раствора парацетамола

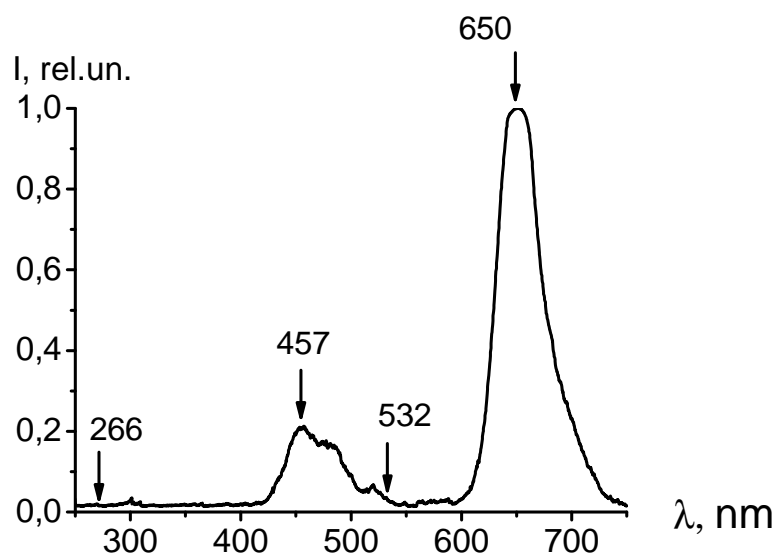


Рис. 4.9. Нормированный спектр фотолюминесценции водного раствора аналгина

Наблюдаемые эффекты перераспределения интенсивности в спектрах вторичного излучения исследуемых ароматических соединений можно объяснить переходом от режима спонтанной фотолюминесценции к режиму суперлюминесценции. Это обусловлено эффективным заселением возбуждённого синглетного терма ароматической молекулы под действием интенсивного импульсного ультрафиолетового лазерного излучения. Природа усиления в этом случае аналогична известному механизму в лазерах на красителях [122]. Коэффициент усиления при этом имеет вид:

$$K = \sigma \left(N_{s1} - N_{s0} \right) \cdot \sigma N_{s1} . \quad (4.3)$$

При условии, что величина эффективного сечения $\sigma \sim 10^{-16} \text{ см}^2$, а концентрация молекул в водном растворе $N_{s1} \sim 10^{17} - 10^{18} \text{ см}^{-3}$, получаем, что коэффициент усиления $K \sim 10 - 100 \text{ см}^{-1}$. В соответствии с законом Бутгера для активной среды ($L \sim 0,1 \div 1 \text{ мм}$) имеем:

$$I(L) = I_0 \cdot e^{K \cdot L} \sim (10^2 - 10^3) I_0 . \quad (4.4)$$

Выполненные оценки объясняют вид спектра фотолюминесценции в тонких слоях твердотельной фазы и в водных растворах анализируемых соединений. Особенностью наблюдаемого эффекта является проявление суперлюминесценции в ультрафиолетовой области спектра, соответствующей положению первого возбуждённого электронного синглетного терма в исследуемых ароматических веществах.

Наблюдаемый эффект суперлюминесценции в обсуждаемых ароматических соединениях может быть использован для создания новых типов лазеров с перестраиваемой частотой генерации в ультрафиолетовой области спектра.

В таблице 4.3 приводятся коэффициенты соответствия фармацевтических препаратов для различных производителей, полученные на основе данных о спектрах ФЛ, соответствующих спонтанному режиму вторичного излучения.

Таблица 4.3

Коэффициенты соответствия фармацевтических препаратов

Название вещества	№ образца *	Коэффициент соответствия K_X^A
Цитрамон П	1	0,872
	2	0,861
	3	0,879
	4	0,883
Парацетамол	1	0,451
	2	0,446
	3	0,438
Анальгин	1	0,478
	2	0,485
	3	0,492

* - № образца в данной таблице соответствуют номерам в таблице 4.2.

Как видно из данной таблицы, коэффициенты соответствия исследуемых фармацевтических препаратов каждого исследуемого производителя существенно отличаются. В связи с этим можно полагать, что разностная методика сравнения спектров ФЛ позволяет установить соответствие различных фармацевтических препаратов проверенному номиналу.

4.2. Результаты исследований твердотельных хиральных фаз триптофана

На рис. 4.10-4.12 приведены спектры ФЛ, соответственно, L-, D- и DL-триптофана при возбуждении четвертой гармоники (266 нм) импульсно-периодического лазера на алюмоиттриевом гранате. Образцы имели вид мелкодисперсного порошка, изготовленного фирмой «Roanal» (Венгрия). Средняя мощность ультрафиолетового излучения составляла 5 мВт при частоте следования наносекундных (10нс) импульсов генерации с частотой 6 кГц.

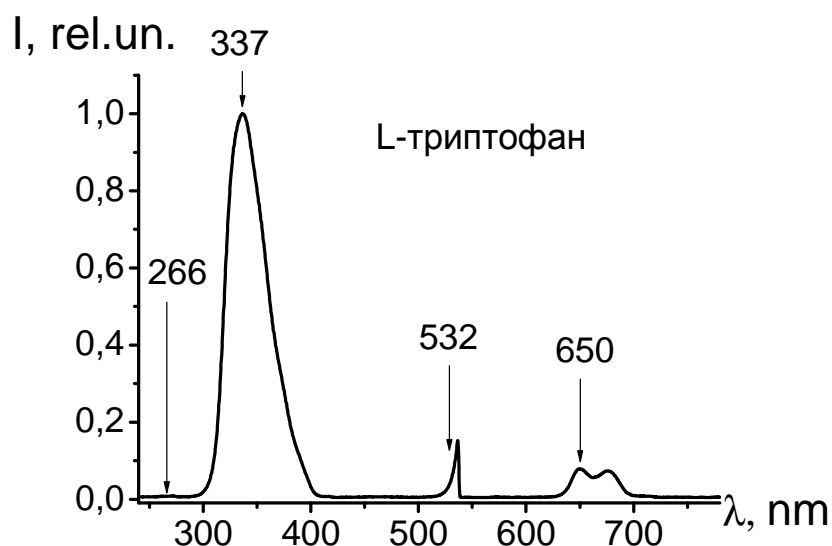


Рис. 4.10. Спектр фотолюминесценции твердотельного L-триптофана при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены спектральные положения максимумов ФЛ и линий генерации лазера 266 и 532 нм

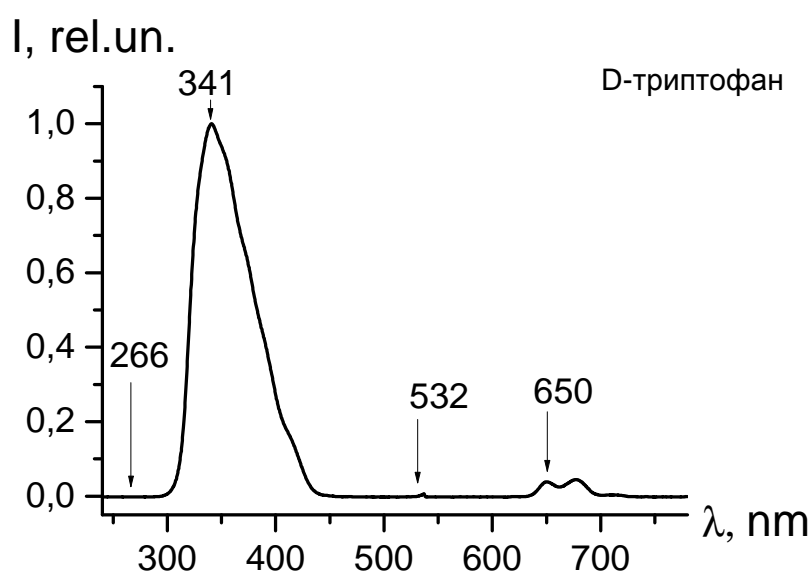


Рис. 4.11. Спектр фотолюминесценции твердотельного D-триптофана при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены спектральные положения максимумов ФЛ и линий генерации лазера 266 и 532 нм

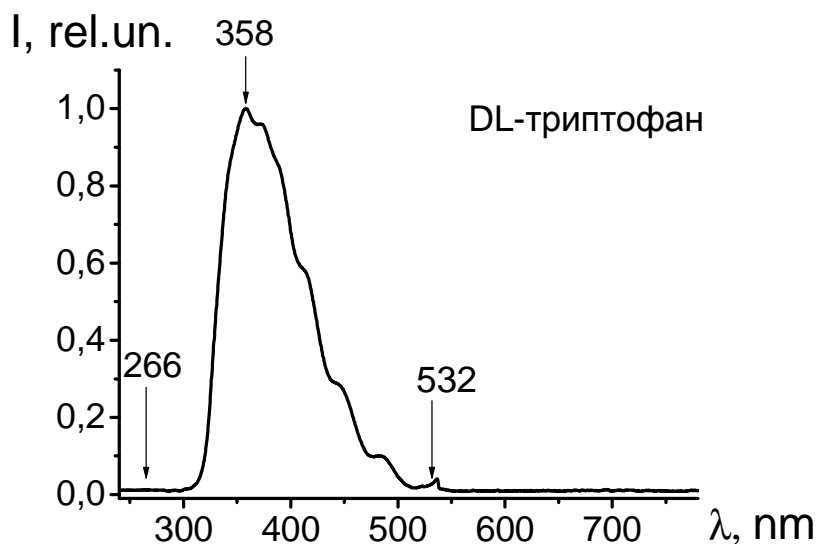


Рис. 4.12. Спектр фотолюминесценции твердотельного DL-триптофана при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены спектральные положения максимумов ФЛ и линий генерации лазера 266 и 532 нм.

Как видно из сравнения спектров фотолюминесценции (ФЛ), представленных на рис.4.10 и 4.11, спектры ФЛ L- и D-триптофана отличаются: в наблюдаемом спектре максимум интенсивности ФЛ для L-триптофана соответствует 337 нм, а соответствующий максимум интенсивности для D-триптофана – 343 нм. Наблюдаемая спектральная полуширина полосы ФЛ L-триптофана составляет 46 нм, а соответствующая спектральная полуширина полосы ФЛ D-триптофана составляет 63 нм. В красной области спектра как для L-, так и для D-триптофана наблюдается дополнительная полоса ФЛ, форма которой практически не отличается для обеих фаз (L- и D-). Относительная интенсивность этой полосы в сравнении с основным максимумом в случае L-триптофана составляет 1:15, в то время как для D-триптофана составляет 1:25.

Как видно из сравнения спектров ФЛ, представленных на рис. 4.10-4.12, спектр ФЛ DL-триптофана существенным образом отличается от соответствующего спектра хирально чистых фаз. В наблюдаемом спектре (рис. 4.12) максимум интенсивности ФЛ для DL-триптофана соответствует 358 нм, т.е. полоса ФЛ DL-триптофана сдвинута в сторону больших длин волн на 22 нм по отношению к L-триптофану и на 17 нм по отношению к D-триптофану. Наблюдаемая спектральная полуширина полосы ФЛ для DL-триптофана составляет 94 нм, т.е. на 48 нм больше соответствующего значения для L-

триптофана, и на 31 нм больше соответствующего значения для D-триптофана. В красной области спектра для DL-триптофана наблюдается широкая полоса ФЛ в том же спектральном диапазоне, что и для хирально чистых фаз, однако её относительная интенсивность не превышает 1:100. Форма этой полосы слегка отличается от формы соответствующей полосы для хирально чистых фаз. Наблюдаемое отличие параметров спектров хирально чистых фаз и рацемата триптофана можно объяснить тем, что centrosymmetric кристаллическая структура DL-триптофана существенным образом отличается от неcentrosymmetric кристаллической структуры D- и L-триптофана. Молекулярное взаимодействие между зеркально симметричными молекулами в рацемической фазе приводит к деформации электронных спектров и изменению времени релаксации электронных возбуждений. Это может быть причиной наблюдаемых в спектрах ФЛ сдвигов положений максимумов полос, а также соответствующих уширений.

Наблюдаемые отличия спектров ФЛ хирально чистых фаз можно объяснить недостаточной степенью чистоты применявшихся веществ, т.е. присутствием в порошке, как чистой фазы, так и примеси рацемата, или иных примесей. Таким образом, на основе анализа спектров фотолюминесценции твердотельных ароматических аминокислот может быть установлена степень их хиральной чистоты на количественном уровне. При наличии рацемата спектр ФЛ существенно сдвигается в длинноволновую область и уширяется. С другой стороны, наблюдаемый эффект различия в спектрах хирально чистых фаз и рацемата может быть использован для анализа хиральной чистоты промышленных препаратов, широко используемых в настоящее время для ускорения роста биомассы животных. Присутствие в пище правых изомеров триптофана, а также рацематов, входящих в состав белков и биологически активных сред, может приводить к патологии потребителей таких продуктов.

Для аналитического сравнения спектров фотолюминесценции L-, D- и DL-триптофана были построены корреляционные функции с использованием соотношения (3.4). Соответствующие спектры приведены на рис.4.13 – 4.15. Корреляционные спектры строились в диапазоне длин волн $\Delta\lambda = 300 - 425$ нм с интервалом разбиения $\Delta\lambda_i = 0,25$ нм. Кроме того, были вычислены соответствующие коэффициенты соответствия (приведены на рис. 4.13 – 4.15) по формуле (3.5).

Как видно из рис. 4.13 – 4.15, разностные спектры и коэффициенты соответствия позволяют наиболее точно установить степень сходства между различными модификациями аминокислоты триптофана. У идентичных структур коэффициент соответствия близок к единице. Чем выше сходство между образцами, тем ближе этот коэффициент стремится к единице (см. рис.4.15).

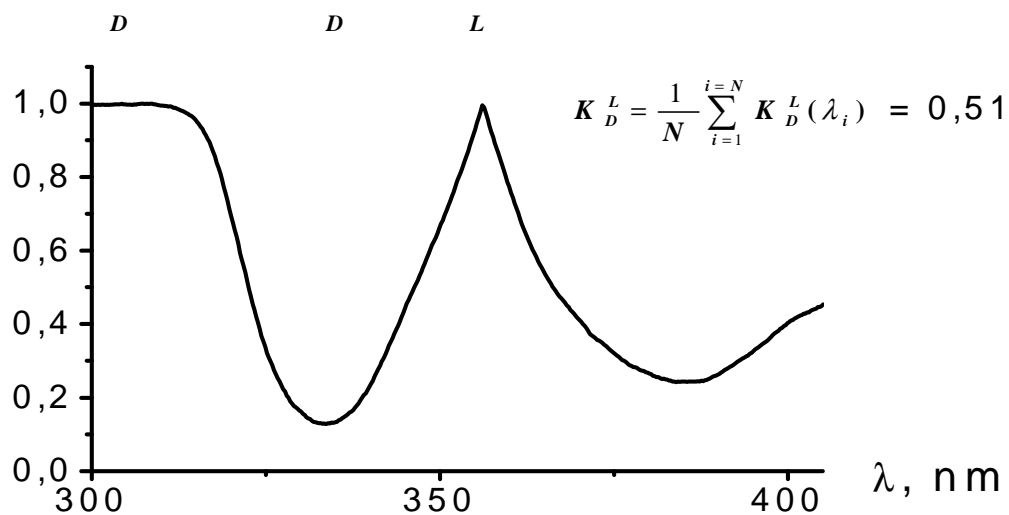


Рис. 4.13. Разностные спектры L-триптофана при сравнении с D-триптофаном (коэффициент соответствия $K_D^L=0,51$)

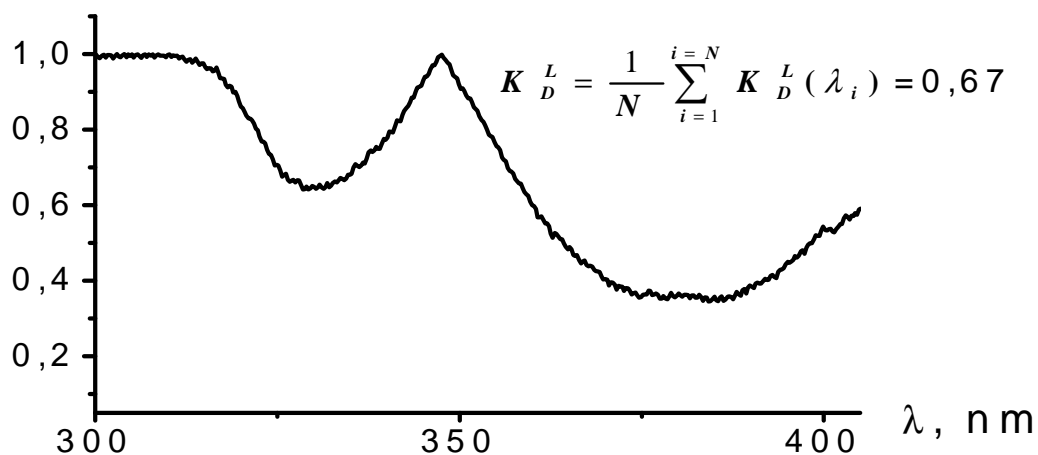


Рис. 4.14. Разностные спектры L-триптофана при сравнении с DL-триптофаном (коэффициент соответствия $K_{DL}^L=0,67$)

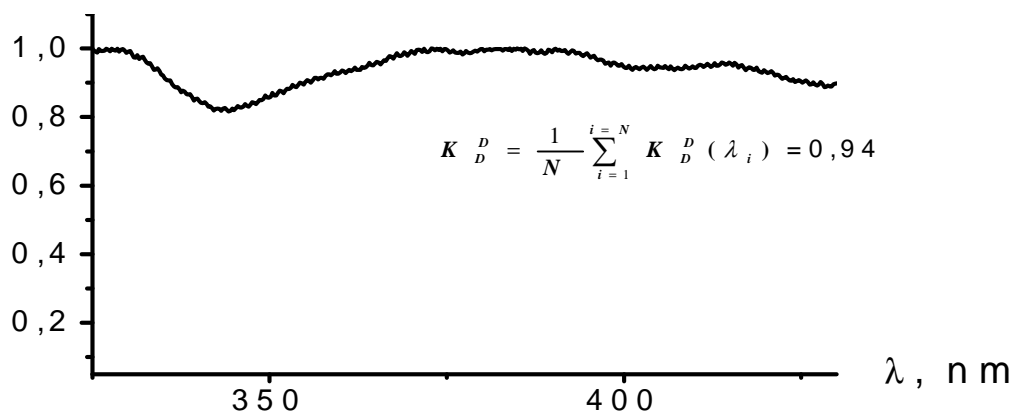


Рис. 4.15. Разностные спектры D-триптофана при сравнении с различными образцами D-триптофана (коэффициент соответствия $K_D^D=0,94$)

4.3. Спектры фотолюминесценции альбумина

Альбумин – природный белок, являющийся составной частью белковой фракции крови человека. Альбумин в организме выполняет ряд функций. Основная его функция – поддержание коллоидно-онкотического давления крови. Альбумин представляет собой полипептидную цепь, содержащую необходимые для жизнедеятельности организма аминокислоты: глицин, цистеин, лизин, лейцин, валин, фенилаланин, триптофан.

Рис. 4.16 иллюстрирует вид спектра фотолюминесценции альбумина при возбуждении четвёртой гармоникой лазера YAG (266 нм).

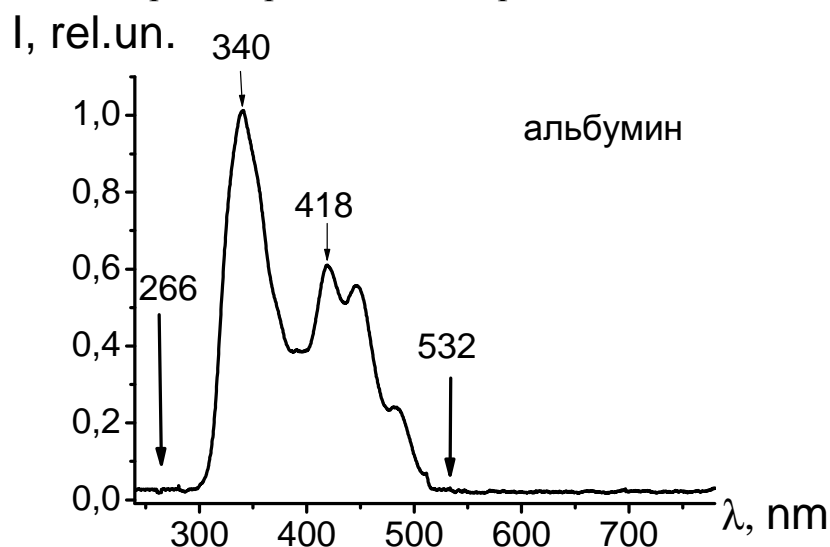


Рис. 4.16. Спектр фотолюминесценции твердотельного альбумина при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены спектральные положения максимумов ФЛ и линий генерации лазера 266 и 532 нм

Как видно из сравнения рис. 4.16 (спектр ФЛ твердотельного альбумина) и рис. 4.10 и 4.11 (спектры ФЛ хирально чистых фаз триптофана) в спектре фотолюминесценции альбумина обнаруживается интенсивный максимум с длиной волны 340 нм, коррелирующий с соответствующим максимумом (337 нм для L-триптофана и 341 нм для D-триптофана). Кроме того, в спектре ФЛ твердотельного альбумина присутствует широкая полоса в области 400-500 нм. Таким образом, можно сделать вывод о том, что спектр фотолюминесценции альбумина обусловлен главным образом вкладом хирально чистых фаз триптофана. Присутствие дополнительной полосы в области 400-500 нм может быть связано с проявлением фосфоресценции ароматических аминокислот или присутствием дополнительных ароматических компонентов.

4.4. Спектры ФЛ нуклеиновых оснований и ДНК

На рис. 4.17-4.21 приведены зарегистрированные при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм спектры ФЛ твердотельных порошков аденина, гуанина, тимина, цитозина и урацила при комнатной температуре и экспозиции ~1с.

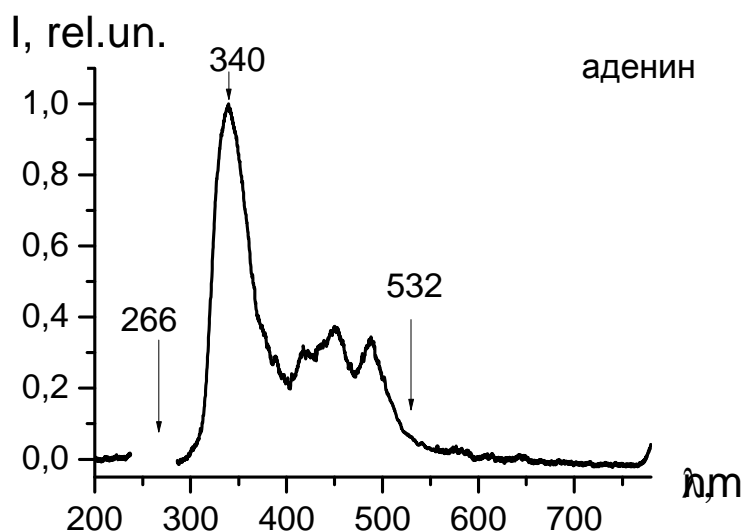


Рис. 4.17. Спектр люминесценции твердотельного аденина при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены линии лазера YAG (266 и 532 нм)

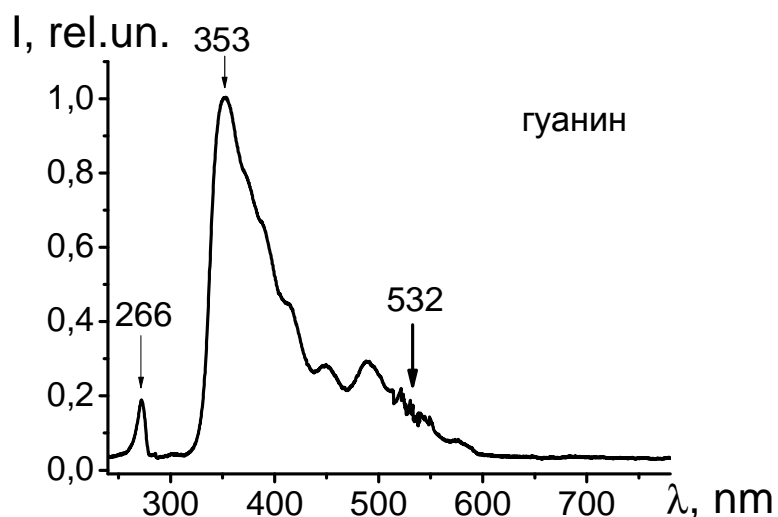


Рис. 4.18. Спектр люминесценции твердотельного гуанина при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены линии лазера YAG (266 и 532 нм)

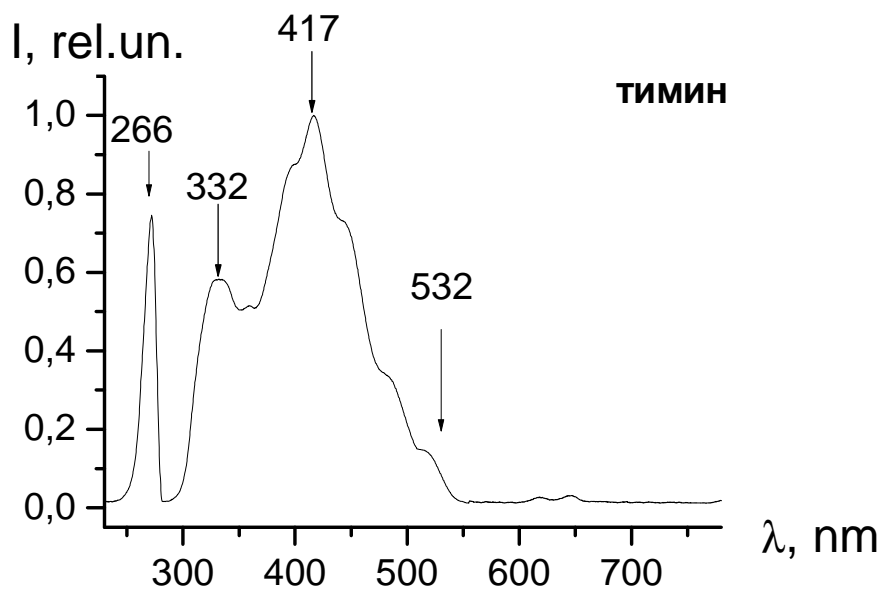


Рис. 4.19. Спектр люминесценции твердотельного тимина при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены линии лазера YAG (266 и 532 нм)

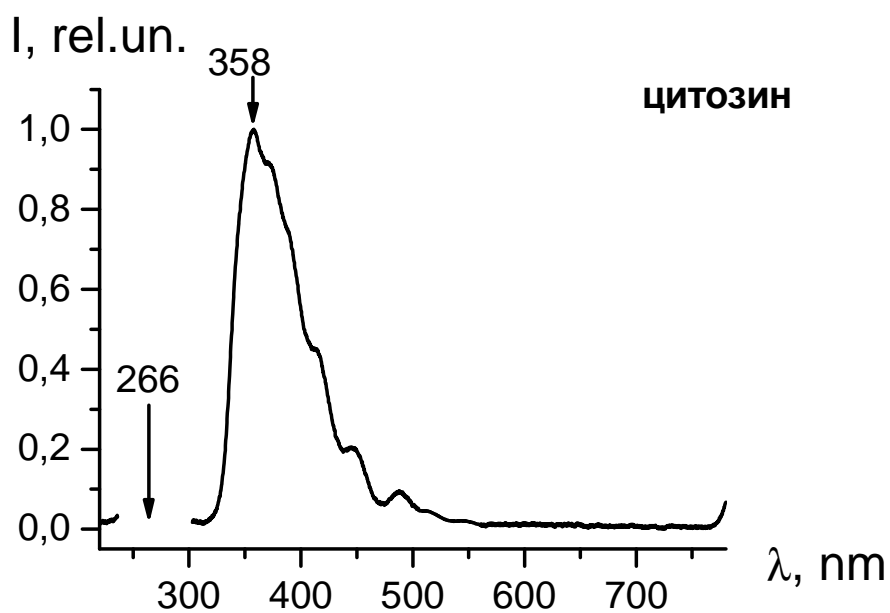


Рис. 4.20. Спектр люминесценции твердотельного цитозина при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены линии лазера YAG (266 и 532 нм)

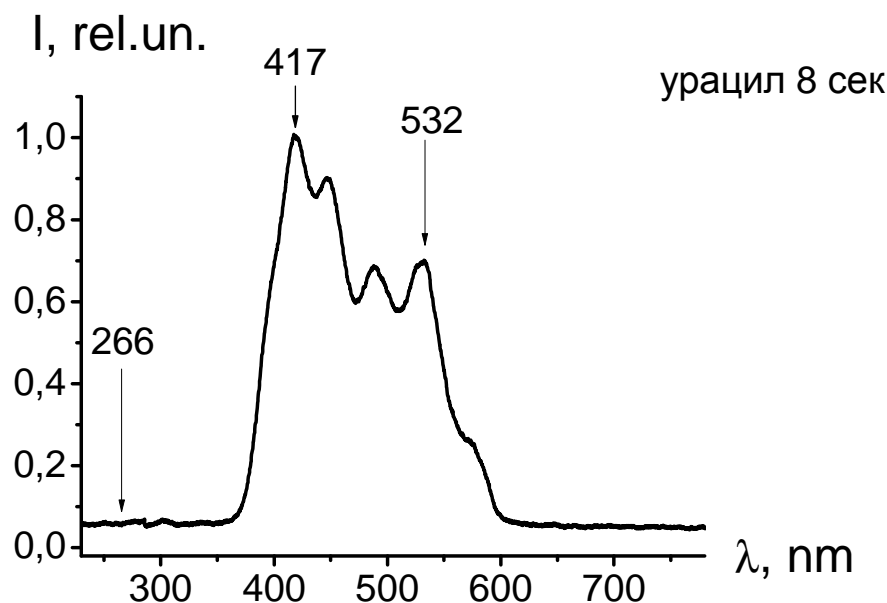


Рис. 4.21. Спектр люминесценции твердотельного урацила при возбуждении импульсно-периодическим лазерным излучением с длиной волны 266 нм при комнатной температуре. Стрелками отмечены линии лазера YAG (266 и 532 нм)

На рис. 4.22-4.26 приводятся спектры ФЛ биоактивных препаратов, полученные при возбуждении четвертой оптической гармоникой (266 нм) лазера YAG:Nd³⁺ или квазимонохроматическим ультрафиолетовым излучением полупроводникового светодиода (280 нм). Образцы для исследования помещались в фотонные ловушки с поперечным и продольным размерами около 1 мм и анализировались методом «на просвет». Спектры приведены для следующих веществ: АТФ и АДФ (рис. 4.22), твердотельных фаз ДНК теленка (рис. 4.23) и цыпленка (рис. 4.24), а также аспирина (рис. 4.25) и парацетамола (рис. 4.26). На всех этих рисунках пунктиром показан спектр возбуждающего излучения (четвертой оптической гармоникой 266 нм или полупроводникового светодиода - 280 нм). Как видно из сравнения спектров ФЛ нуклеиновых оснований (см. рис. 4.17-4.21) со спектрами АТФ, АДФ и ДНК (рис. 4.22-4.24), для всех этих спектров присутствует интенсивная полоса флуоресценции, соответствующая синглет-синглетному переходу с первого возбужденного электронного состояния в основное состояние молекулы [123]. При этом возбуждение полупроводниковым светодиодом, длина волны излучения которого приближается к краю фундаментального поглощения препарата, приводит к коротковолновому сдвигу полосы флуоресценции. Кроме того, в этих спектрах проявляются полосы фосфоресценции в длинноволновой области спектра. Аналогичный эффект коротковолнового сдвига обнаруживается также для аспирина и парацетамола.

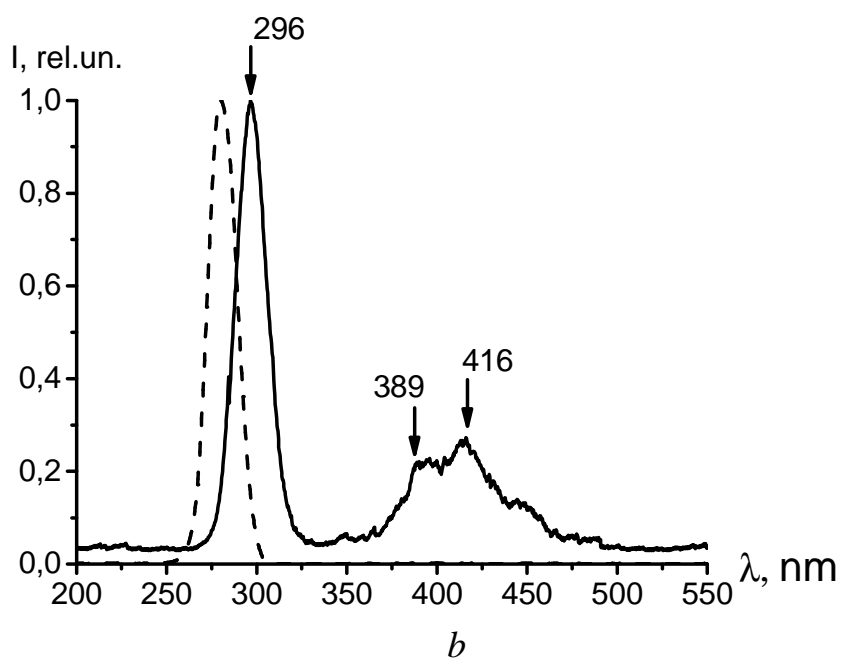
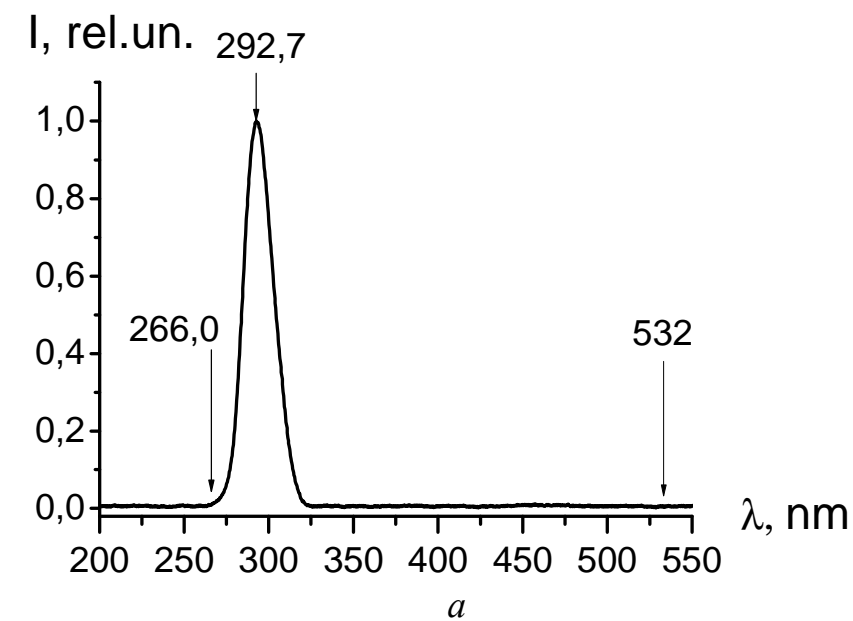


Рис. 4.22. Спектры фотолюминесценции АТФ (а) и АДФ(б), помещённых в фотонную ловушку. Стрелки показывают положения максимумов интенсивности наблюдаемых полос ФЛ

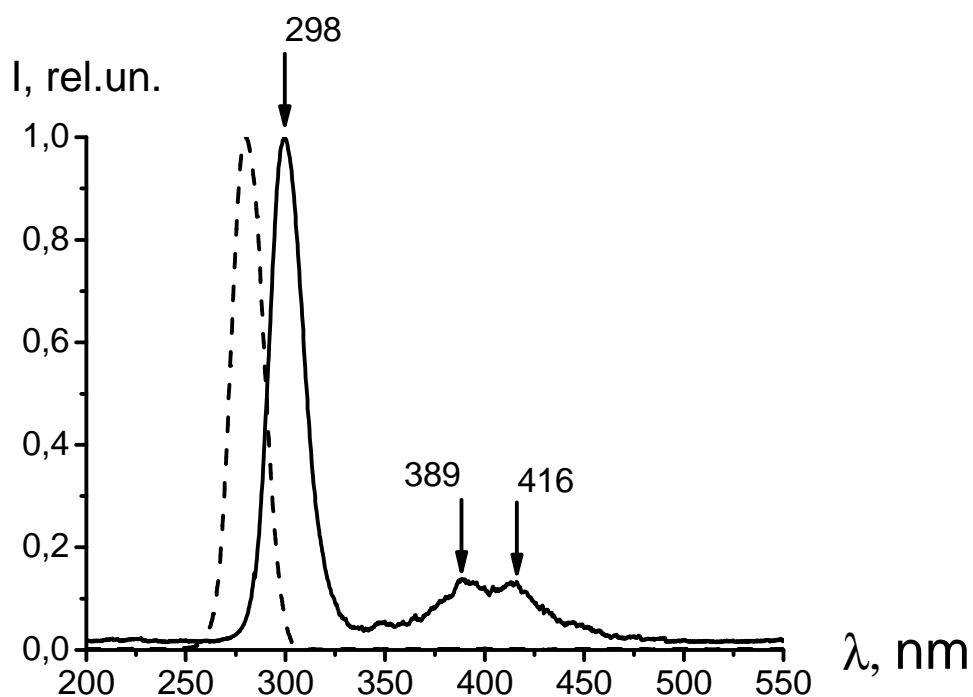


Рис. 4.23. Спектр фотолюминесценции сухой ДНК теленка, помещённой в фотонную ловушку. Стрелки показывают положения максимумов интенсивности наблюдаемых полос ФЛ

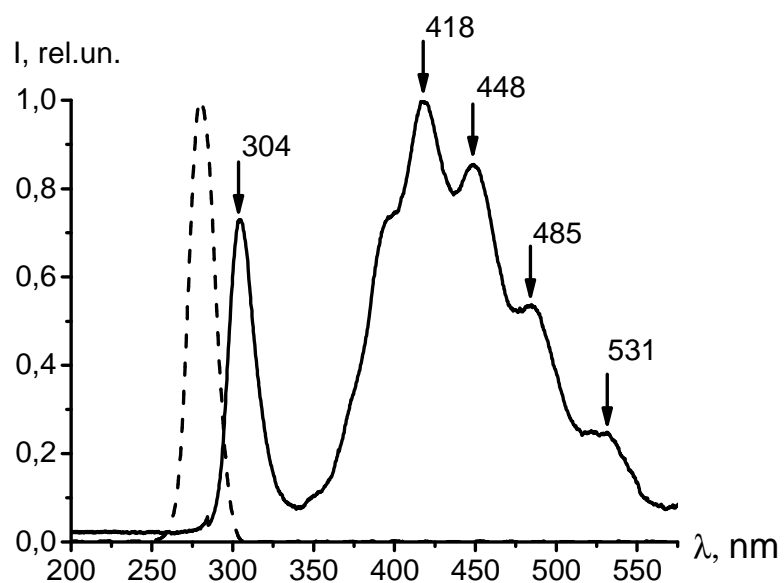


Рис. 4.24. Спектр фотолюминесценции сухой ДНК цыплёнка, помещённой в фотонную ловушку. Стрелки показывают положения максимумов интенсивности наблюдаемых полос ФЛ

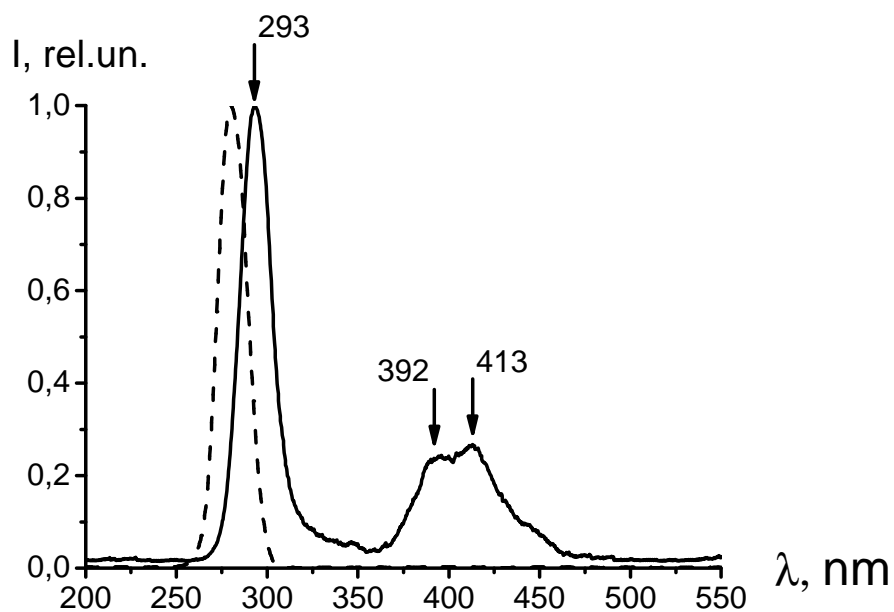


Рис. 4.25. Спектр фотолюминесценции твердотельного аспирина, помещённого в фотонную ловушку. Стрелки показывают положения максимумов интенсивности наблюдаемых полос ФЛ

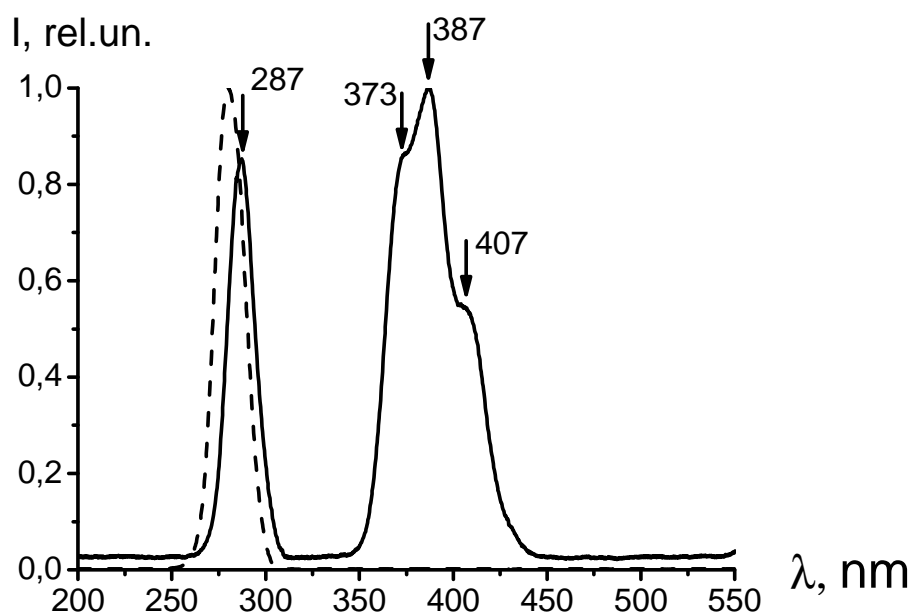


Рис. 4.26. Спектр фотолюминесценции парацетамола, помещённого в фотонную ловушку. Стрелки показывают положения максимумов интенсивности наблюдаемых полос ФЛ

Применение ультрафиолетовых источников возбуждающего излучения оказалось перспективным для анализа не только биопрепаратов, но оказалось возможным для анализа микроорганизмов. Рис. 4.27-4.29 иллюстрируют спек-

тры ФЛ водной взвеси микроорганизмов при возбуждении ультрафиолетовым излучением лазера на парах меди.

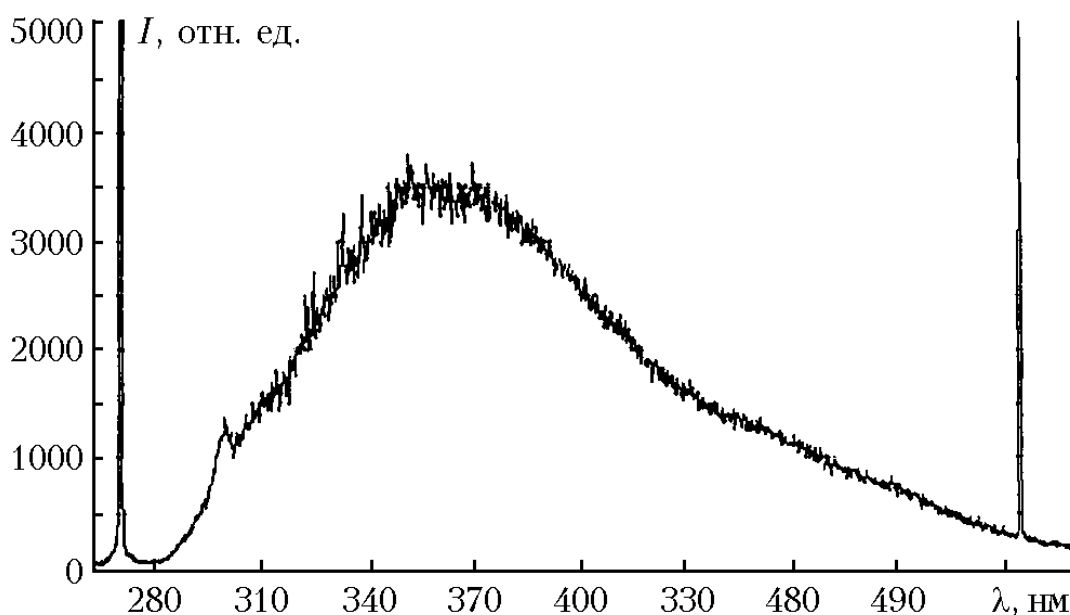


Рис. 4.27. Спектр фотолюминесценции бактерии *Bacillus thuringiensis* при концентрации 10^3 мл^{-1} (*in vivo*). Возбуждение линией 271,2 нм лазера на парах меди

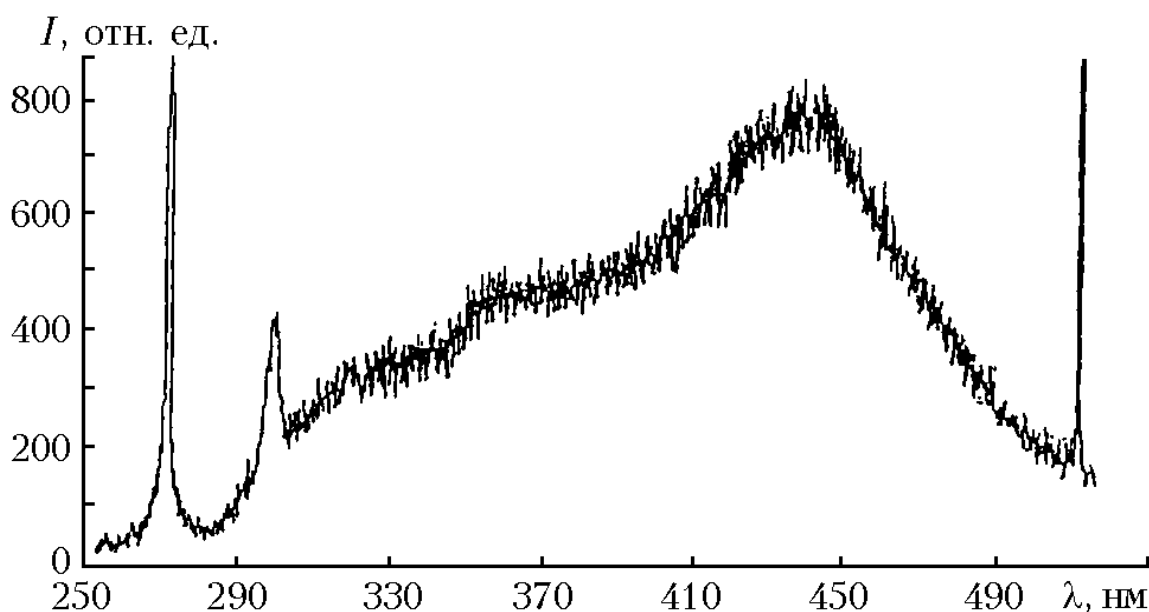


Рис. 4.28. Спектр фотолюминесценции бактерии *Bacillus thuringiensis*, подвергнутой воздействию жесткого ультрафиолетового облучения в течение 30 мин. Концентрация бактерий в водной взвеси – 10^3 мл^{-1} . Возбуждение линией генерации лазера на парах меди 271,2 нм

Как видно из сопоставления спектров ФЛ, приведенных на рис. 4.27 и 4.28, в результате воздействия жёсткого ультрафиолетового излучения на бак-

терию *Bacillus thuringiensis* спектр вторичного излучения этой бактерии существенно видоизменяется: происходит перераспределение интенсивности в спектре с образованием интенсивной длинноволновой полосы. Резкий максимум интенсивности в области 300 нм соответствует резонансному КР на валентном колебании воды.

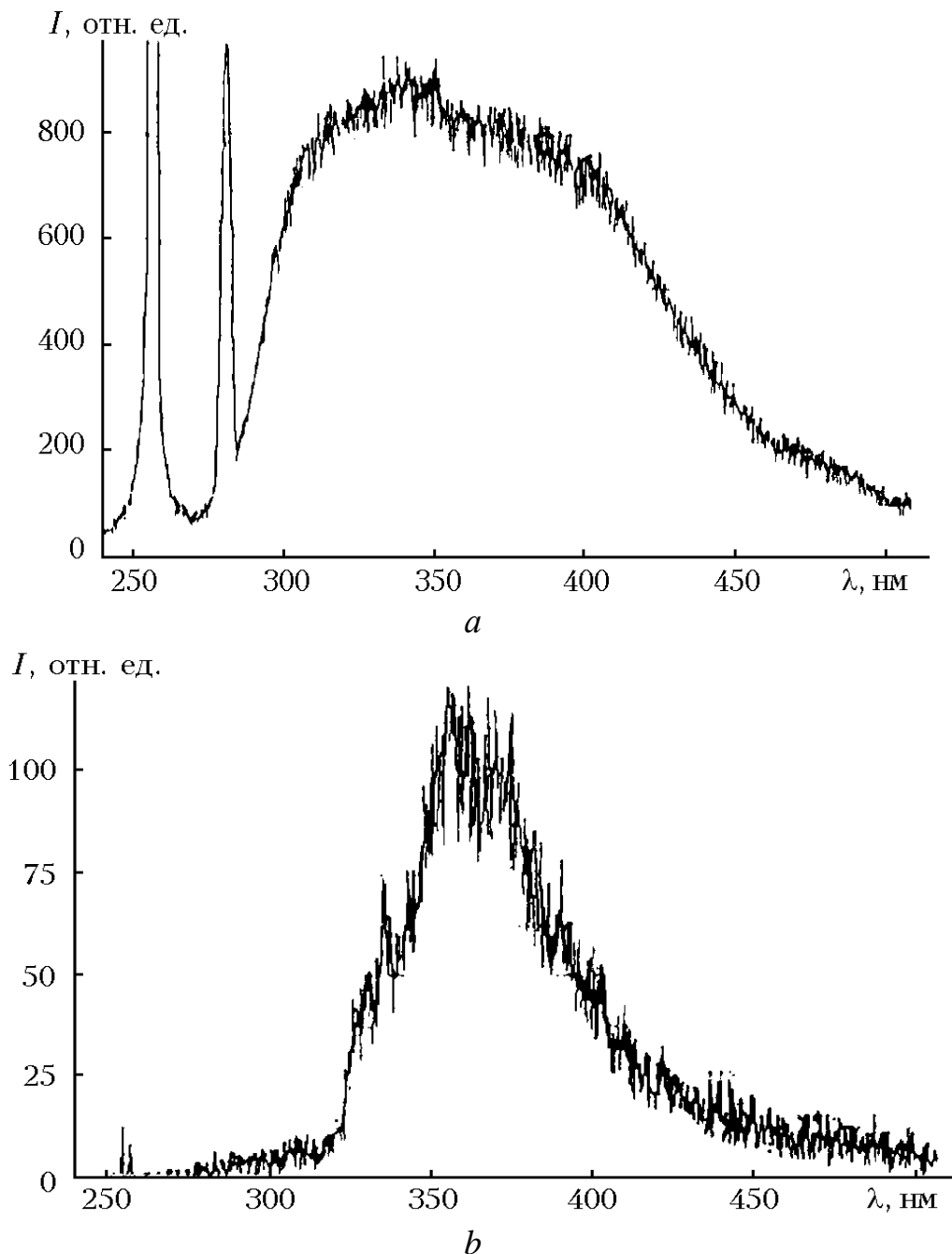


Рис.4.29. Спектры фотолюминесценции микроорганизма *Bacillus thuringiensis* при концентрации 10^5 мл^{-1} в воде: a – при нулевой задержке ($\tau = 0$); b – с задержкой $\tau = 50 \text{ нс}$. Возбуждение линией 255,3 нм

Рис. 4.29 (а) иллюстрирует вид спектров вторичного излучения для этой же бактерии при возрастании концентрации в водной взвеси. При этом интенсивность резонансного КР (резкий пик вблизи 300 нм) становится сравнимым по интенсивности с полосой фотолюминесценции. Рис 4.29 (b) соответствует спектру вторичного излучения, зарегистрированному при временной задержке сигнала вторичного излучения по отношению к импульсу первичного излучения. В результате линия, соответствующая КР, полностью пропадает, а полоса ФЛ существенно сужается.

На рис. 4.30 и 4. 31 приводятся спектры ФЛ бактерии *Bacillus subtilis* в исходном состоянии в водной взвеси и этой же бактерии, подвергнутой кипячению. Как видно из сравнения обсуждаемых спектров, как и в результате воздействия жёсткого ультрафиолетового излучения, после кипячения спектр ФЛ бактерии существенно деформируется с образованием интенсивной полосы в синей области спектра. Таким образом, при деструкции микроорганизмов (при переходе от состояния «in vivo» к «in vitro») спектры ФЛ существенно видоизменяются и характеризуются появлением полосы в синем спектральном диапазоне.

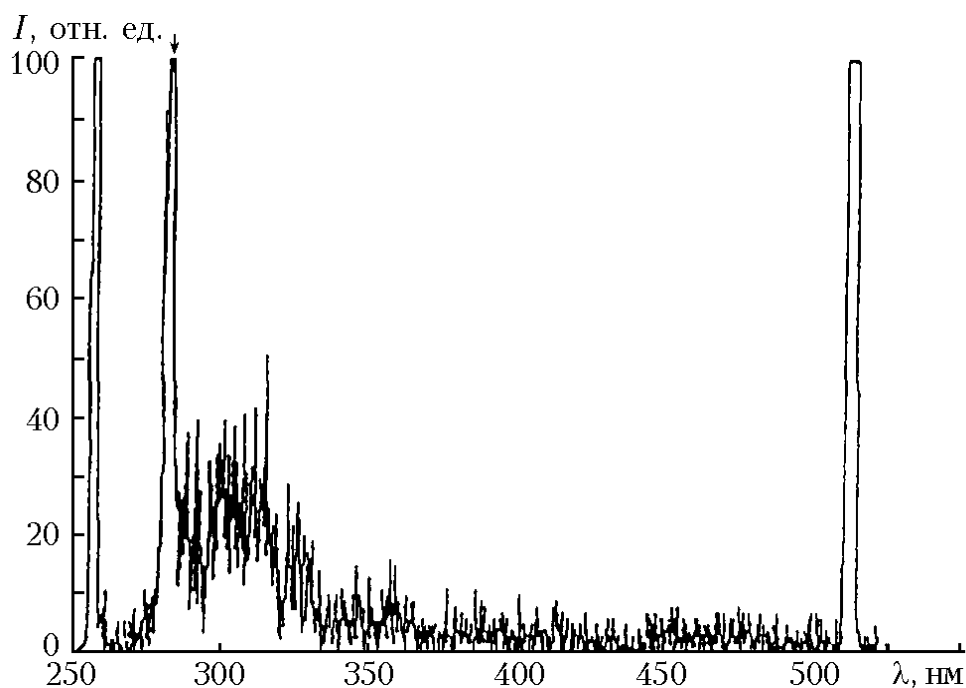


Рис. 4.30. Спектр фотолюминесценции водной взвеси бактерий *Bacillus subtilis* при концентрации 10^2 мл^{-1} (in vivo). Возбуждение линией 255,3 нм. Стрелка соответствует положению линии КР в воде

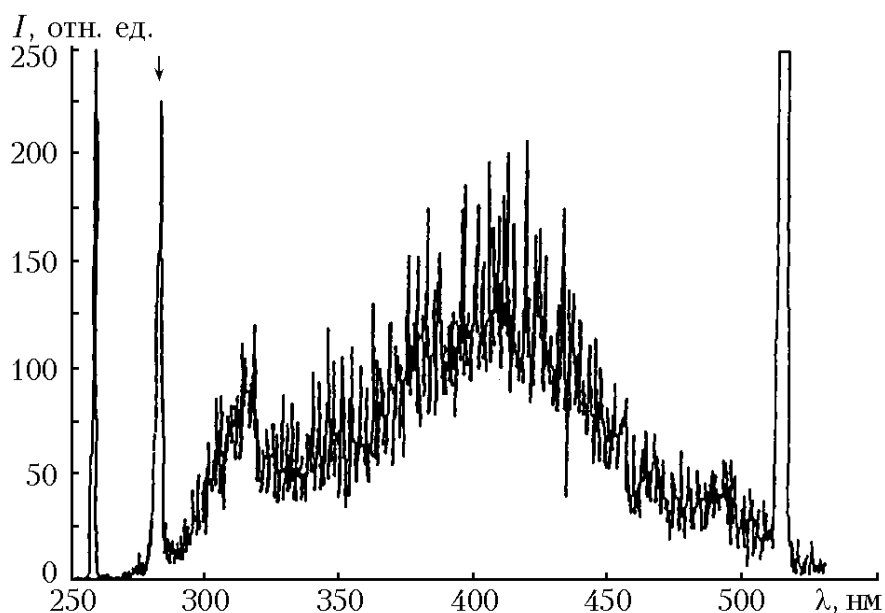


Рис. 4.31. Спектр фотолюминесценции водной взвеси бактерий *Bacillus subtilis* при концентрации 10^2 мл^{-1} , подвергнутой кипячению в течение 30 мин. Возбуждение линией 255,3 нм. Стрелка соответствует положению линии КР в воде

4.5. Спектры КР аминокислот и ДНК

На рис. 4.32 приведены спектры КР кристаллического триптофана для левой (L-), правой (D-) и рацемической (DL-) форм в области низкочастотных колебаний ($0\text{-}150 \text{ см}^{-1}$), измеренные на двойном монохроматоре при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 510,6 нм [124].

Как видно из приведенных спектров (см. рис. 4.32), спектры КР левой (L-) и правой (D-) модификации триптофана имеют практически идентичный вид; в то же время спектр КР рацемата (DL-триптофан) существенно отличается от спектров хирально чистых модификаций. В спектре КР для L- и D- форм триптофана наблюдается интенсивный низкочастотный пик с максимумом на частоте 15 см^{-1} . В спектре КР рацемической (DL-) формы триптофана такой линии не наблюдается. Существенно отличаются также спектры КР для хирально чистых и рацемической фаз в области $20\text{-}100 \text{ см}^{-1}$. В частности, в спектре КР DL-триптофана наблюдается резкий низкочастотный пик с максимумом на частоте 35 см^{-1} . Однако для области $100\text{-}150 \text{ см}^{-1}$ появляется некоторое сходство: как в спектрах хирально чистых форм, так и в спектре рацемата проявляются две широкие полосы КР. Тожественность спектров КР для правой и левой форм триптофана согласуется с тем, что теория предсказывает полную идентичность энергетических спектров зеркально

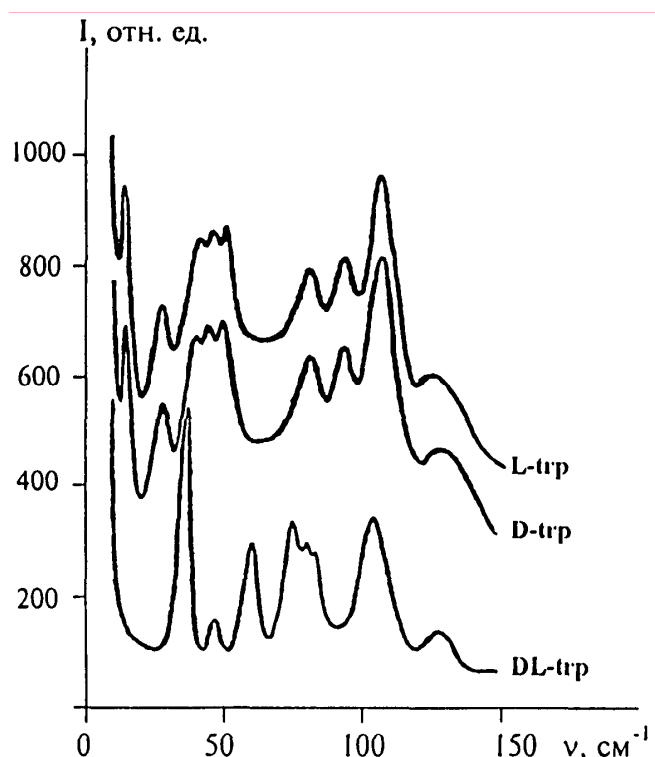


Рис. 4.32. Спектры комбинационного рассеяния в области низкочастотных колебаний кристаллического триптофана для левой (L-), правой (D-) и рацемической (DL-) форм при комнатной температуре

симметричных фаз. В то же время наблюдаемое отличие вида спектров КР хирально чистых и рацемата вполне объяснимо, так как кристаллическая структура рацемической фазы должна отличаться от соответствующей кристаллической решётки L- и D- форм триптофана.

Следует отметить, что присутствие интенсивной низкочастотной линии в спектрах протеиногенных аминокислот оказалось общей закономерностью и свидетельствует о важной роли такого рода колебаний для обеспечения процессов, происходящих в биосис-

темах. Аналогичные низкочастотные моды в биоструктурах были выявлены при анализе спектров инфракрасного излучения в миллиметровом и субмиллиметровом диапазонах. Важная роль микроволнового излучения в процессах жизнедеятельности была выявлена и при непосредственном воздействии такого рода излучения на живые организмы.

В связи с этим большое значение приобретает анализ спектров комбинационного рассеяния в ДНК, исследования которых проводились ранее и интенсивно осуществляются вплоть до настоящего времени. Остановимся в связи с этим на последних результатах исследования спектров КР высушенной ДНК. Исследования проводились с использованием тройного монохроматора, оснащённого микроскопом. На рис. 4.33 приводится изображение исследуемого участка высушенной ДНК телёнка, полученное с помощью микроскопа. Исследуемая высушенная ДНК имела вид тонких сплетённых волосков, хорошо различимых с помощью микроскопа.



Рис. 4.33. Изображение участка ДНК в микроскопе.
Светлое пятно соответствует области
анализируемого спектра КР

На рис. 4.34 приведен полученный при этом спектр КР ДНК в широком диапазоне частот $6\text{--}4000\text{ см}^{-1}$.

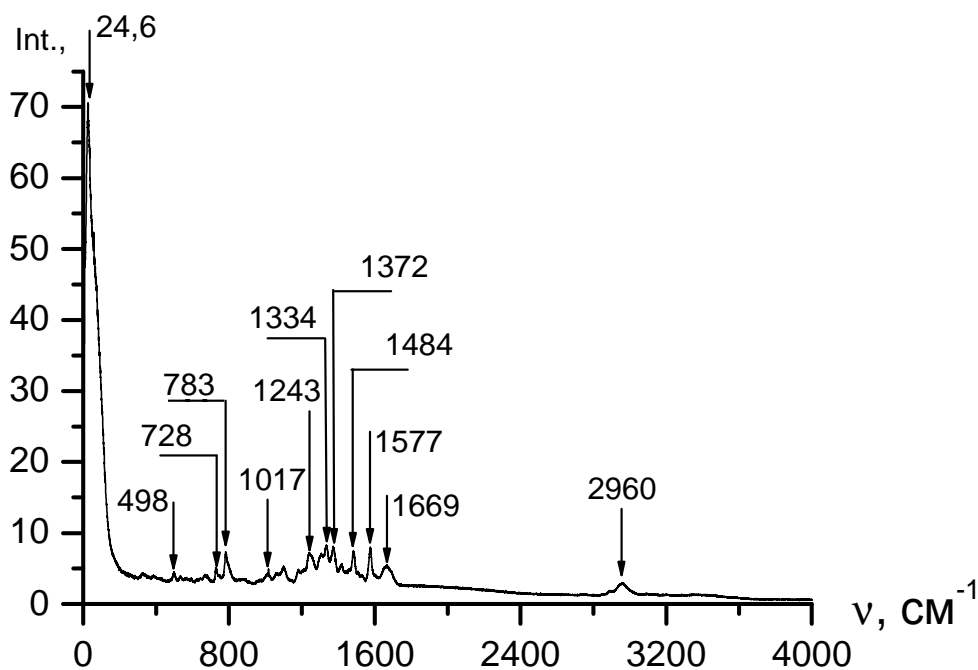


Рис. 4.34. Спектр КР ДНК в области частот $6\text{--}4000\text{ см}^{-1}$

Условно наблюдаемый спектр КР можно разбить на три диапазона. В области низких частот наблюдается очень интенсивный пик КР, максимум интенсивности которого приходится на $24,6\text{ см}^{-1}$. Интенсивность этого пика почти на порядок превышает интенсивность полос КР, наблюдаемых в облас-

ти частот внутримолекулярных колебаний (спектральный диапазон 500-1700 см^{-1}), а также в области частоты колебания гидроксильных групп (3000 см^{-1}). На рис. 4.35 приведен спектр КР высушенной ДНК телёнка в области частот 6-1000 см^{-1} при комнатной температуре и температуре жидкого азота.

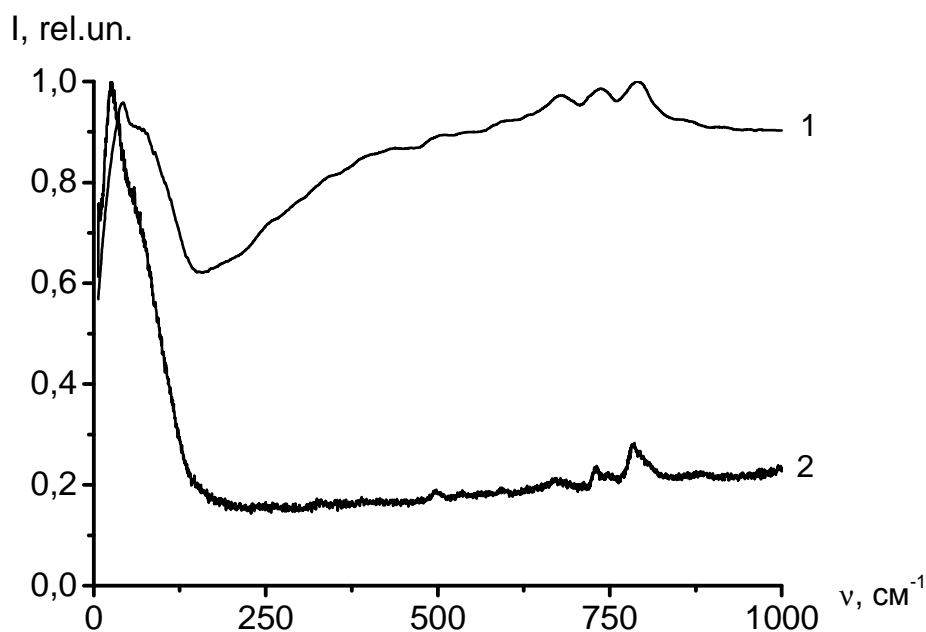


Рис. 4.35. Нормированный спектр КР ДНК при комнатной температуре (кривая 2) и температуре жидкого азота (кривая 1), в диапазоне частот 6÷1000 см^{-1}

Как видно из этого рисунка с понижением температуры происходит смещение низкочастотного пика КР в область более высоких частот. Кроме того, при этом происходит небольшое уширение низкочастотной полосы и возрастание интенсивности в спектре внутримолекулярных мод, что может быть связано также с возрастанием фона ФЛ при понижении температуры образца.

На рис. 4.36 (a-c) приводятся спектры КР, полученные от трех различных областей молекулы ДНК, иллюстрируемых рисунками 4.37 (a-c), при возбуждении аргоновым лазером. Как видно из сравнения этих спектров, наблюдаются лишь небольшие отличия в анализируемых спектрах в основном в области высоких частот. Для более детального сопоставления наблюдаемых спектров были построены разностные спектры с использованием изложенной ранее методики. Как видно из этих рисунков, разностная методика анализа спектров КР позволяет выявить даже небольшие отличия в анализируемых спектрах. В случае спектроскопии ДНК это представляется крайне важным, так как позволяет подойти к количественной оценке состояния генетической информации в различных участках ДНК и установить роль дефектов, приводящих к патологиям.

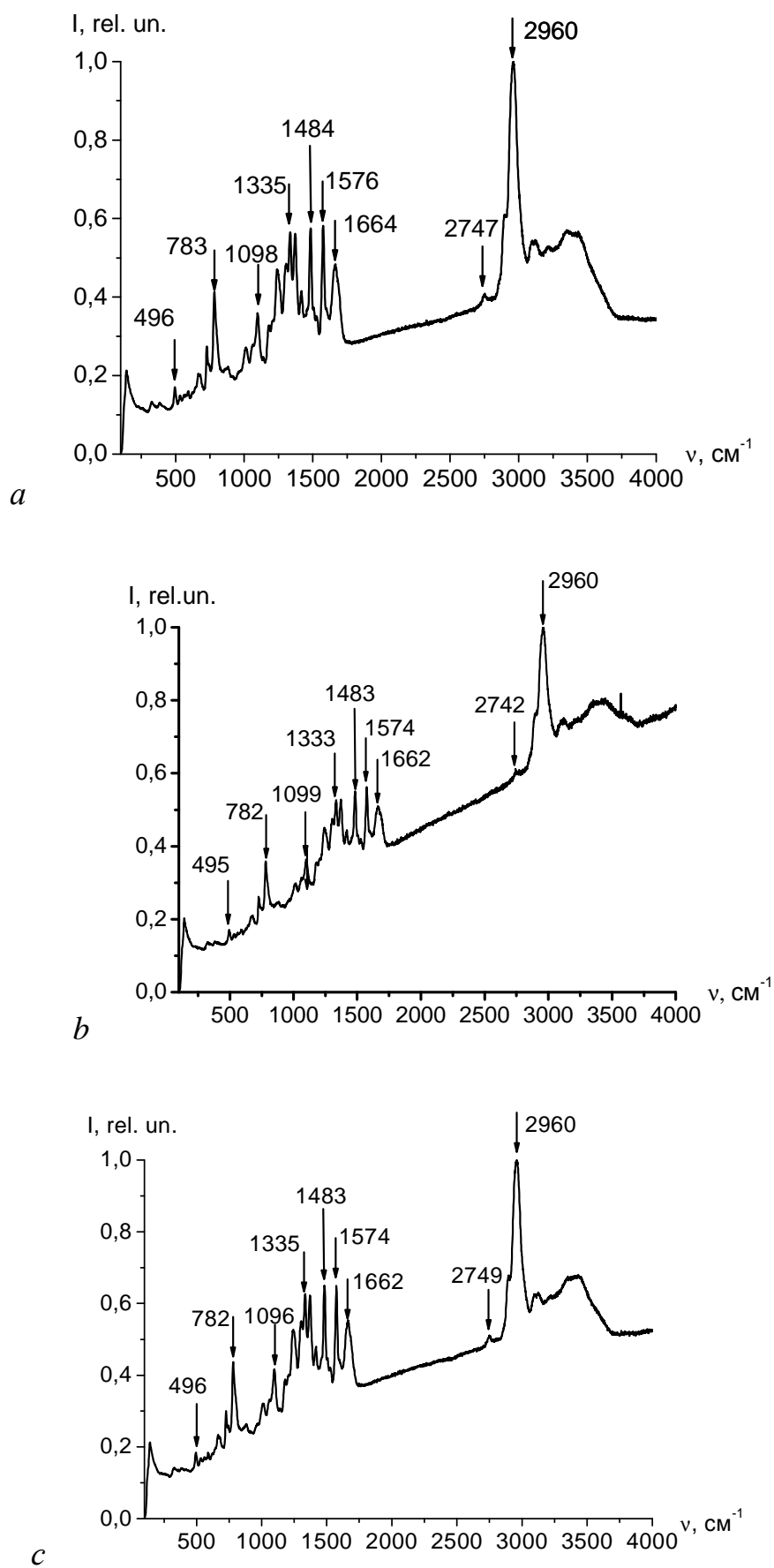


Рис. 4.36. Спектры КР, полученные от различных областей (а-с), высушенной молекулы ДНК

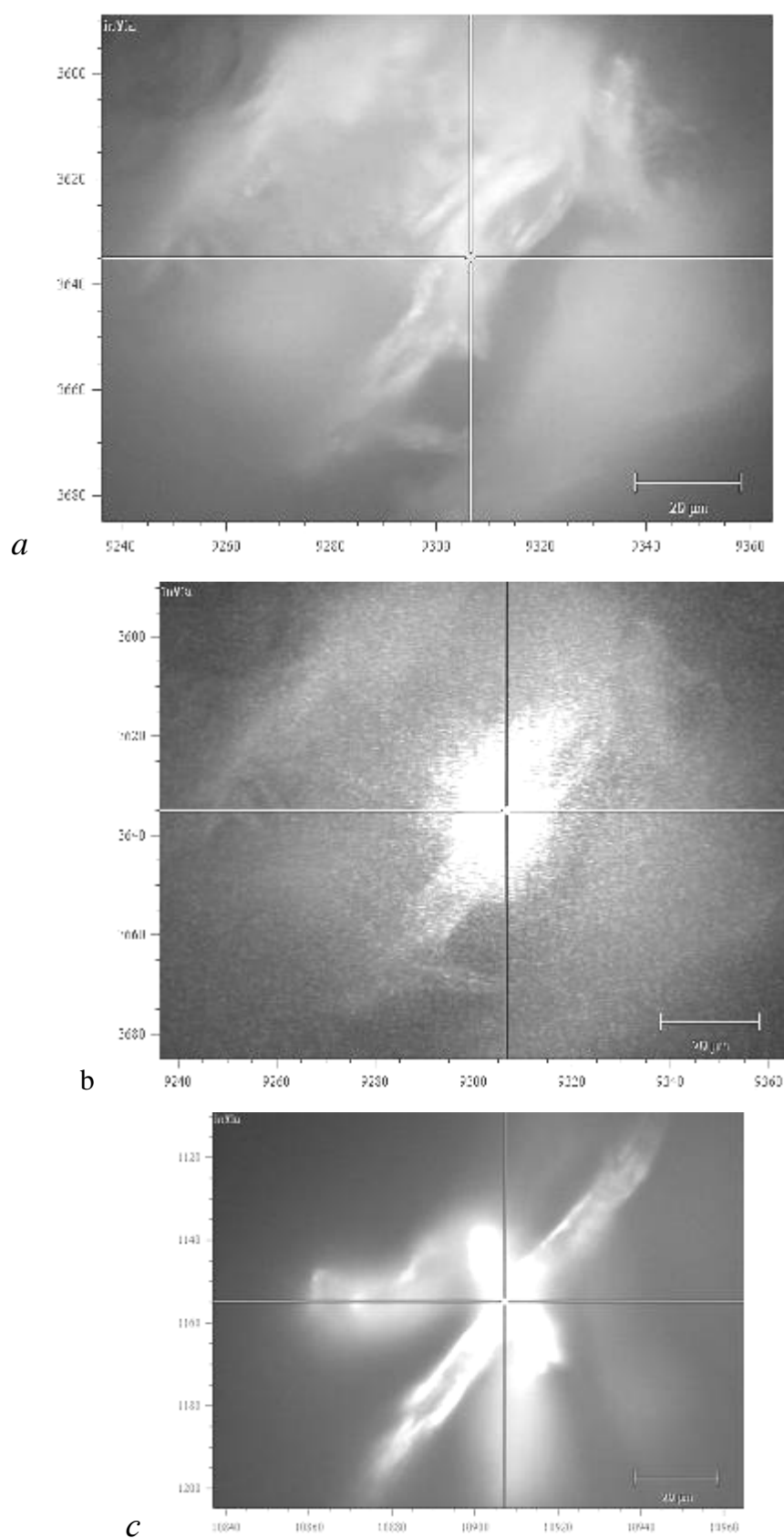


Рис. 4.37. Изображения трех различных областей ДНК в микроскопе: а соответствует первой области, б-второй, с-третьей

На рис. 4.38 приведен спектр КР в диапазоне $100\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ влажной ДНК, полученный при возбуждении аргоновым лазером. Как видно из этого рисунка, спектр КР влажной ДНК существенно отличается от приведенных ранее спектров высушенных образцов, что объясняется формированием новых молекулярных связей в присутствии воды.

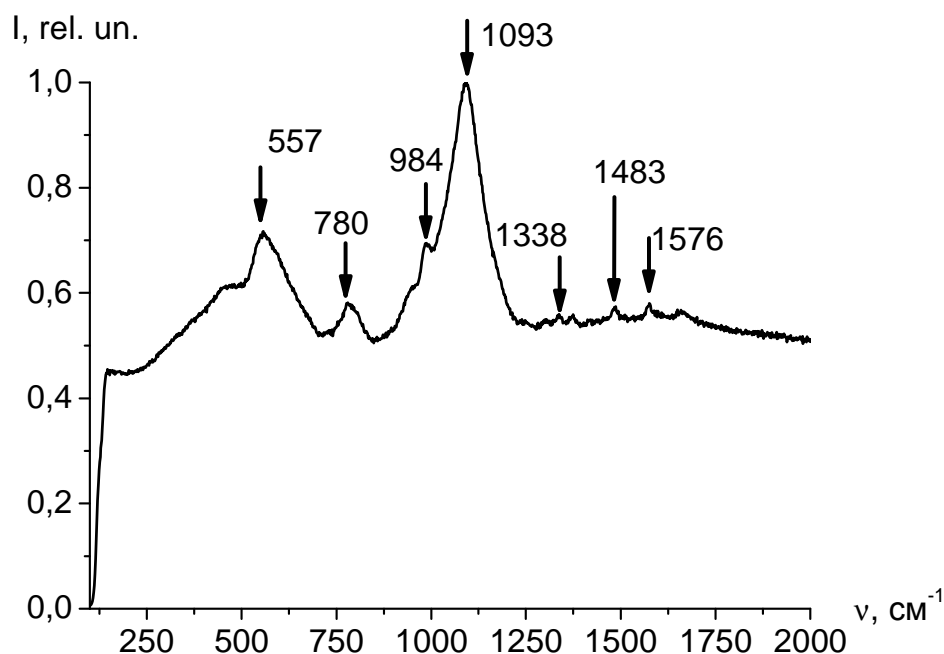


Рис. 4.38. Спектр КР влажной ДНК, полученный при возбуждении аргоновым лазером

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы оптической спектроскопии, основанные на анализе спектров комбинационного рассеяния и фотолюминесценции, позволяют получить важную информацию о микроструктуре биоактивных препаратов, о присутствии в них примесей и дефектов, позволяют получить количественные данные о соответствии анализируемого препарата эталону. На примере близких по структуре фармацевтических препаратов (цитрамона, аспирина, анальгина и парацетамола) было показано, что для количественного неразрушающего контроля молекулярного состава и структуры биоактивных препаратов, содержащих ароматические кольца, может быть эффективно использован метод флуоресцентного анализа, дополненный построением соответствующих разностных функций. Возбуждение спектров флуоресценции осуществлялось четвёртой гармоникой (266 нм) лазера на алюмоиттриевом гранате или ультрафиолетовым излучением полупроводникового светодиода (280 нм) с использованием волоконно-оптического зонда и малогабаритного светосильного спектрографа.

Разработанная к настоящему времени методика обеспечивает возможность получения методами оптической спектроскопии информации о структуре и составе даже небольшого количества анализируемой пробы с высоким пространственным разрешением по поверхности образца (0,1 мм) при времени экспозиции, равном 0,01-0,1 с.

При наличии нескольких компонентов в фармацевтическом препарате наблюдается его неоднородность по составу. Разностные спектры флуоресценции позволяют устанавливать различия в составе, структуре и степени дефектности препарата даже при кажущемся сходстве их спектров вторичного излучения. Развита методика разностного анализа спектров позволяет идентифицировать различные фармацевтические препараты.

Практический интерес представляет анализ предложенными методами оптической спектроскопии хиральной чистоты аминокислот, белков и биопродуктов. Нарушение хиральной чистоты этих веществ приводит к соответствующим нарушениям в организмах, употребляющих эти продукты. В связи с этим необходимо обеспечение контроля хиральной чистоты биоактивных препаратов, что может быть осуществлено на основе предложенных методик оптической спектроскопии.

Особый интерес представляют результаты анализа спектров КР и ФЛ молекул ДНК. Представляется важным проведение аналогичных исследований генетически модифицированных продуктов, активно внедряемых в последние годы в сельском хозяйстве. Количественные методы оптической спектроскопии позволят провести контроль их состава и степень отклонения от номинальных объектов.

Надеемся также, что дальнейшее развитие методов оптической спектроскопии биоактивных препаратов позволит получить новые научные результаты в этой области и расширит возможности практического использования различных типов биоактивных сред.

ЛИТЕРАТУРА

1. Low-dose aspirin therapy for chronic stable angina: a randomized, placebo-controlled clinical trial / P.M. Ridker, J.A.E. Manson, J.M. Gaziano [et al.]. // *Ann. Intern. Med.* - 1991. - V. 114. - P. 835-839.
2. Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2012 год (с изменениями на 19 декабря 2013 года) [Электронный ресурс]: распоряжение Правительства РФ от 07.12. 2011 г. № 2199-р // Техэксперт: инф.-справ. система // Консорциум «Кодекс».
3. Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии: учебное пособие / Дж. Лакович; пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 488 с.
4. Люминесцентный анализ клеток: учебное пособие / под ред. А.Ю. Буданцева. – Пузино: Аналитическая микроскопия, 2002. - 131с.
5. Особенности люминесценции ДНК и РНК / В.М.Ящук // Материалы XIX Международной школы-семинара «Спектроскопия молекул и кристаллов»: Украина, Крым, 20-27 сентября 2009 г. – Береговое, 2009. – С. 42-47.
6. Двухфотонно-возбуждаемая люминесценция в твердотельной фазе ДНК / П.П. Гаряев, В.С. Горелик, Е.А. Козулин, В.А. Щеглов // *Квантовая электроника.* - 1994. – Т. 21, № 6. – С. 603-604.
7. Горелик, В.С. Двухфотонно-возбуждаемая люминесценция в биологически активных твердотельных структурах / В.С. Горелик, Е.А. Козулин // *Квантовая электроника.* - 1994. – Т. 21, № 5. - С. 499-501.
8. Gorelik, V.S. Pulsed uv excitation of biological structures / V.S. Gorelik // *Journal of Russian Laser Research.* – 1999. – V. 20, № 2. - P.152-170.
9. Yalkowsky, S.H. Handbook of aqueous solubility data / S.H. Yalkowsky, H. Yan. - New York: CRC Press, 2003. – 736 p.
10. Рабинович, В. А Краткий химический справочник: справочник / В.А. Рабинович, З.Я. Хавин. - 3-е изд., перераб. и доп. - Л.: Химия, 1991. – 432 с.
11. Основные свойства неорганических и органических соединений: справочник / под ред. Б.П.Никольского. – Л.: Химия, 1971. – 1168 с.
12. Крутошикова, А. Природные и синтетические сладкие вещества: учебное пособие / А. Крутошикова, М. Угер. - М.: Мир, 1988. – 120 с.
13. Химический энциклопедический словарь: справочник / под ред. И.Л. Кнунянц. - М.: Советская энциклопедия, 1983. – 594 с.
14. Волькенштейн, М. В. Молекулы и жизнь: учебное пособие / М.В. Волькенштейн. - М.: Наука, 1965. – 504с.
15. Гауровиц, Ф. Химия и функции белков: учебное пособие / Ф. Гауровиц; пер. с англ. – 2-е изд. - М.: Мир, 1965. – 530 с.

16. Спирин, А.С. Молекулярная биология. Структура и биосинтез нуклеиновых кислот: учебник / А.С. Спирин. - М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
17. Сисакян, Н. М. Биохимия обмена веществ: учебное пособие / Н. М. Сисакян. – М.: АН СССР, 1954. – 274 с.
18. Спирин, А.С. Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка: учебник для студентов биол. спец. вузов / А.С. Спирин. - М.: Высшая школа, 1986. – 302 с.
19. Шамин, А. Н. Развитие химии белка: учебное пособие / А.Н. Шамин. - М.: Наука, 1966. – 172 с.
20. Рис, Э. Введение в молекулярную биологию. От клеток к атомам: учебное пособие /Э. Рис, Н. Стернберг; пер. с англ. - М.: Мир, 2002. – 142 с.
21. Органическая химия нуклеиновых кислот: учебное пособие / Н.К. Кочетков, Э.И. Будовский, Е.Д. Свердлов [и др.]. - М.: Химия, 1970. – 718 с.
22. Молекулярная биология: учебное пособие / под ред. Г.Х. Мацука. – Киев: Наука думка, 1979. – 376 с.
23. Шабарова, З.А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов: учебное пособие / З.А. Шабарова, А.А. Богданов. - М.: Химия, 1978. – 582 с.
24. Шабарова, З.А. Химические основы генетической инженерии: учебное пособие / З.А. Шабарова, А.А. Богданов, А.С. Золотухин. - М.: Изд-во МГУ, 1994. – 224 с.
25. Hauswirth, W. Excited States of the Nucleic Acids / W. Hauswirth, M. Daniels // In: Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids (edited by S.Y.Wang). – 1976. –V. 1. – P. 109-168.
26. Зенгер, В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: учебное пособие / В. Зенгер. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
27. Ванюшин, Б. Ф. Метилирование ДНК у растений: механизмы и биологическая роль: учебное пособие / Б.Ф. Ванюшин. – М.: Наука, 2009. – 77 с.
28. Волькенштейн, М.В. Биофизика: учебное пособие /М.В. Волькенштейн. – 3-е изд. стер.- СПб.: Лань, 2008. – 594 с.
29. Маршалл, В.Дж. Клиническая биохимия: учебное пособие / В.Дж. Маршалл, С.К. Бангерт. - М.: Бином, 2011. – 408 с.
30. Тапбергенов, С.О. Медицинская биохимия: учебник для медвузов / С.О. Тапбергенов. - Астана: Фолиант, 2001. – 342 с.
31. Сингер, М. Гены и геномы: учебное пособие: в 2 т. Т.1 / М. Сингер, П. Берг. - М.: Мир, 1998. – 373 с.
32. Сингер, М. Гены и геномы: учебное пособие: в 2 т. Т.2 / М. Сингер, П. Берг. - М.: Мир, 1998. – 394 с.

33. Слюсарев, А.А. Биология с общей генетикой: учебное пособие / А.А. Слюсарев. - М.: Альянс, 2012. – 472 с.
34. Биология: учебник для медицинских вузов: в 2 т. Т.1 / под ред. В.Н. Ярыгина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 736 с.
35. Биология: учебник для медицинских вузов: в 2 т. Т.2 / под ред. В.Н. Ярыгина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 560 с.
36. Пехов, А.П. Биология: медицинская биология, генетика и паразитология: учебник для вузов / А.П. Пехов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 656 с.
37. Рубан, Э.Д. Генетика человека с основами медицинской генетики: учебное пособие / Э.Д. Рубан. - М.: Феникс, 2013. – 319 с.
38. Бочков, Н.П. Клиническая генетика / Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 592 с.
39. Азимов, А. Генетический код. От теории эволюции до расшифровки ДНК: учебное пособие / А. Азимов. - М.: Центрополиграф, 2006. – 203 с.
40. Биохимия: учебник для вузов / под ред. Е.С. Северина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 779 с.
41. Модульная многофункциональная оптоволоконная спектрометрическая система: учебное пособие в 2 ч. Ч. I.: Устройство и принципы эксплуатации аппаратуры / А.И. Андреев, С.В. Мухин, В.В. Некрасов [и др.]. - М.: МИИТ, 2008. -121 с.
42. Pantell, R.H. Fundamentals of quantum electronics / R.H. Pantell, H.E. Puthoff. - New York; London; Sydney; Toronto: JOHN WILEY AND SONS: INC, 1969. - 384 p.
43. Placzek, G. Marx Handbuch Der Radiologie / G. Placzek. – Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1934. - 205 p.
44. Long, D.A. Raman Spectroscopy / D.A. Long. - New York: McGraw-Hill, 1977. –276 p.
45. Herzberg, G. Infrared and Raman Spectra at Polyatomic Molecules / G. Herzberg. - New York: Van Nostrand, 1945. – 109 p.
46. Wilson, E. B. Molecular vibrations: the theory of infrared and Raman vibrational spectra / E. B. Wilson, J. C. Decius, P. C. Cross. - New. York: McGraw-Hill, 1955. – 388 p.
47. Багавантам, С. Теория групп и ее применение к физическим проблемам: учебное пособие / С. Багавантам, Т. Венкатарайуду; пер. с англ. – 3-е изд., стереот. – М.: Ком Книга, 2006. – 296 с.
48. Ландсберг, Г.С. Оптика: учебное пособие / Г.С. Ландсберг. - 6-е изд., стереот. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. – 848 с.

49. Landsberg, G.S. Uber die Lichtzerstreuung in Kristallen / G.S. Landsberg, L.I. Mandelstam // Zs. Phys. – 1928. – V. 50. – P. 769-780.
50. Оптические фононы в кристаллах Rb_2TeBr_6 и Cs_2TeBr_6 / В.А. Стефанович, Л.М. Сусликов, З.П. Гадьмаши, Е.Ю. Переш // Физика твердого тела. – 2004. – Т.46, №. 6. – С. 995-997.
51. Активная спектроскопия комбинационного рассеяния света в непрерывном режиме; возможность спектроскопии сверхвысокого разрешения комбинационных переходов / С.А. Ахманов, Н.И. Коротеев, Р.Ю. Орлов, И.Л. Шумай // Письма в ЖЭТФ. – 1976. – Т.23, № 5. – С. 276-280.
52. Гончаров, А.Ф. Комбинационное рассеяние света в алмазе при давлениях до 72 ГПа / А.Ф. Гончаров, И.Н. Макаренко, С.М. Стишов // Письма в ЖЭТФ. – 1985. – Т. 41, № 4. – С. 150-153.
53. Бузкин, В.М. Комбинационное рассеяние света в зигзагообразных фотополимерных молекулах / В.М. Бузкин, В.С. Горелик, П.П. Свербиль [и др.] // Физика твердого тела. – 2002. – Т. 44, № 12. – С. 2224-2228.
54. Володин, В.А. Определение состава и механических деформаций в $\text{Ge}_x\text{Si}_{(1-x)}$ -гетероструктурах из данных спектроскопии комбинационного рассеяния света: уточнение параметров модели / В.А. Володин, М.Д. Ефремов, А.С. Дерябин, Л.В. Соколов // Физика и техника полупроводников. – 2006. – Т. 40, № 11. – С.1349-135.
55. Hirschfeld, T. FT-Raman spectroscopy: development and justification / T. Hirschfeld, D.B. Chase // Appl. Spectrosc. – 1986. – V. 40. – P. 133-137.
56. Fowles, G.R. Self-consistent equations including exchange and correlation effects / G.R. Fowles, W.T. Sulfvast // Appl. Phys. Letts. – 1965. – V. 6. – P. 236-240.
57. Pulsed laser transition in manganese vapor / M. Piltch, W.T. Walter, N. Solimene [et al.] // Appl. Phys. Letts. – 1965. – V. 7. – P. 309-310.
58. Исаев, А.А. Импульсный лазер с частотой повторения 10 кГц на парах меди / А.А. Исаев, М.А. Казарян, Г.Г. Петраш // Оптика и спектроскопия. – 1973. – Т. 35, № 3. – С. 529-530.
59. Исаев, А.А. Импульсные лазеры с высокой частотой повторения на парах свинца, марганца, меди и золота / А.А. Исаев, М.А. Казарян, Г.Г. Петраш // Журнал прикладной спектроскопии. – 1973. – Т. 18, № 3. – С. 483- 484.
60. Солдатов, А.Н. Газоразрядные лазеры на самоограниченных переходах в парах металлов: учебное пособие / А.Н. Солдатов, В.И. Соломонов. – Новосибирск: Наука, 1985. -140 с.
61. Батенин, В.М. Лазеры на самоограниченных переходах атомов металлов: учебное пособие / В.М. Батенин - М.: Научная книга, 1998. – 544с.

62. Пиотровский, Ю.А. О роли ступенчатой ионизации в процессах формирования инверсной заселенности в лазерах на самоограниченных переходах / Ю.А. Пиотровский, Н.М. Реутова, Ю.А. Толмачев // Оптика и спектроскопия. – 1984. – Т. 7, № 1. – С. 99-104.

63. О природе фантомных токов в активной среде лазеров на самоограниченных переходах атомов металлов / Н.А. Юдин, В.Б. Суханов, Ф.А. Губарев, Г.С. Евтушенко // Квантовая электроника. – 2008. – Т. 38, № 1. – С. 23-29.

64. Любин, Н.А. Разработка, производство и применение отпаянных лазеров на парах меди / Н.А. Любин, А.Д. Чурсин, С.А. Угольников [и др.] // Квантовая электроника. – 2001. – Т. 31, № 3. – С. 191-202.

65. Горелик, В.С. Комбинационные оптические процессы в ультрадисперсных средах при импульсно-периодическом лазерном возбуждении / В.С. Горелик, И.А. Рахматуллаев // Препринт ФИАН. – 2004. – № 13. – С. 37.

66. Bandekar, J. Amide modes and protein conformation / J. Bandekar // Journal of Biochimica et Biophysica Acta. – 1992. – V. 1120, № 2. – P.123-143.

67. Baena, J. R. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis / J. R. Baena, B. Lendl // Journal of Current Opinion in Chemical Biology. – 2004. – V. 8, № 5. – P. 534-539.

68. Лакович, Д. Основы флуоресцентной спектроскопии: учебное пособие / Д. Лакович. – М.: Мир, 1986. – 496 с.

69. Lakowicz, R. J. Principles of Fluorescence Spectroscopy: study book / R. J. Lakowicz. - N.Y.: Springer Science, 2006. – 960 p.

70. Ельяшевич, М.А. Атомная и молекулярная спектроскопия. Общие вопросы спектроскопии: учебное пособие / М.А. Ельяшевич. – М.: Ком Книга, 2007. – 240 с.

71. Pramanik, A. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) / A. Pramanik, J. Widengren // Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine / ed. by Robert A.Meyers. – Berlin: Wiley-VCH Verlag, 2004. - P. 461-500.

72. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rates and low background, analysis of translational diffusion / R. Rigler, , Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask // Eur. Biophys. J. – 1993. – V. 22, № 3. – P. 169-175.

73. Nagy, A. Observation volumes and {gamma}-factors in two-photon fluorescence fluctuation spectroscopy / A. Nagy, J. Wu, K.M. Berland // Biophys. J. – 2005. – V. 89, № 3. – P. 2077-2090.

74. Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation / P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W. Webb // Biophys. J. – 1999. – V. 77, № 4. – P. 2251-2265.

75. Koppel, D.E. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy / D.E. Koppel // *Phys. Rev. A*. – 1974. – V. 10, № 6. – P. 1938-1945.
76. Fluorescence Fluctuation Spectroscopy in Subdiffraction Focal Volumes / L. Kastrup, H. Blom, C. Eggeling, S.W. Hell // *Phys. Rev. Letters*. – 2005. – V. 94. – P. 1781-1784.
77. Хеммис, Г. Методы исследования быстрых реакций: учебное пособие / Г. Хеммис. - М.: Мир, 1977. – 716 с.
78. Камминс, Г. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов: учебное пособие / Г. Камминс, Э. Пайк. - М.: Мир, 1978. – 584 с.
79. Abney, J.R. On the measurement of particle number and mobility in non-ideal solutions by fluorescence correlation spectroscopy / J.R. Abney, B.A. Scalettar, C.R. Hackenbrock // *Biophys. J.* – 1990. – V. 58. – P. 261-265.
80. Callen, H.B. Irreversibility and generalized noise / H.B. Callen, T.A. Welton // *Phys. Rev.* – 1951. – V. 83, № 1. – P. 34-40.
81. Greene, R.F. On the formalism of thermodynamic fluctuation theory / R.F. Greene, H.B. Callen // *Phys. Rev.* – 1951. – V. 83, № 6. – P. 1231-1235.
82. Callen, H.B. On a theorem of irreversible thermodynamics / H.B. Callen, R.F. Greene // *Phys. Rev.* – 1952. – V. 86, № 5. – P. 702-714.
83. Greene, R.F. On a theorem of irreversible thermodynamics / R.F. Greene, H.B. Callen // *Phys. Rev.* – 1952. – V. 88, № 6. – P. 1387-1391.
84. Elson, E.L. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory / E.L. Elson, D. Magde // *Biopolymers*. – 1974. – V. 13, № 1. – P. 1-27.
85. Magde, D. Thermodynamic fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy / D. Magde, E.L. Elson, W.W. Webb // *Phys. Rev. Lett.* – 1972. – V. 29, № 11. – P. 705-708.
86. Ehrenberg, M. Rotational Brownian motion and fluorescence intensity fluctuations / M. Ehrenberg, R. Rigler // *Chem. Phys.* – 1974. – V. 4, № 3. – P. 390-401.
87. Magde, D. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization / D. Magde, E.L. Elson, W.W. Webb // *Biopolymers*. – 1974. – V. 13, № 1. – P. 29-61.
88. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rates and low background, analysis of translational diffusion / R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, P. Kask // *Eur. Biophys. J.* – 1993. – V. 22. – P. 169-175.
89. Aragon, S. R. Fluorescence correlation spectroscopy and Brownian rotational diffusion / S.R. Aragon, R. Pecora // *Biopolymers*. – 1975. – V. 14, № 1. – P. 119-138.

90. Aragon, S.R. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics / S.R. Aragon, R. Pecora // *J Chem Phys.* – 1976. – V. 64, № 4. – P. 1791-1803.
91. Schwille, P. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies / P. Schwille, J. Bieschke, F. Oehlenschläger // *Biophys Chem.* – 1997. – V. 66, № 1. – P. 211-228.
92. Krichevsky, O. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. / O. Krichevsky, G. Bonnet // *Reports on Progress in Physics.* – 2002. – V. 65, № 1. – P. 251-297.
93. Müller, J.D. Fluorescence Correlation spectroscopy / J.D. Müller, Y. Chen, E. Gratton // *Methods Enzymol.* – 2003. – № 361. – P. 69-92.
94. Palmer, A.G. Molecular aggregation characterized by high order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy / A.G. Palmer, N.L. Thompson // *Biophys J.* – 1987. – V. 52, № 52. – P. 257-270.
95. Widengren, J. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study / J. Widengren, Ü. Mets, R. Rigler // *J. Phys. Chem. B.* – 1995. – V. 99, № 36. – P. 13368-13379.
96. Widengren, J. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces / J. Widengren, R. Rigler // *Cell. Mol. Biol.* – 1998. – V. 44, № 5. – P. 857-879.
97. Pramanik, A. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) / A. Pramanik, J. Widengren // *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* / ed. by Robert A. Meyers. – Berlin: Wiley-VCH Verlag, 2004. – P. 461-500.
98. Thompson, N.L. Fluorescence correlation spectroscopy / N.L. Thompson // *Topics in fluorescence spectroscopy* / Editor J.R. Lakowicz. – New York: Plenum Press, 1991. – P. 337–378.
99. Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy. A review / S. T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W. W. Webb // *Biochemistry.* – 2002. – V. 41, № 3. – P. 697-705.
100. Bacia, K. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy / K. Bacia, P. Schwille // *Methods.* – 2003. – V. 29, № 1. – P. 74-85.
101. Schatzel, K. Photon correlation measurements at large lag times: improving statistical accuracy / K. Schatzel, M. Drewel, S. Stimac // *J. Mod. Opt.* – 1988. – V. 35, № 4. – P. 711-718.
102. Schatzel, K. Correlation Techniques in Dynamic Light Scattering / K. Schatzel // *Appl. Phys. B.* – 1987. – V. 42, № 4. – P.193-213.

103. Wohland, T. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy / T. Wohland, R. Rigler, H. Vogel // *Biophys J.* – 2001. – V. 80, № 6. – P. 2987-2999.
104. Bevington, P.R. Data Reduction and Error Analysis. For the Physical Sciences / P.R. Bevington, D.K. Robinson. – New York: McGraw-Hill, 2003. – 320 p.
105. Кукушкин, А.К. Методы биофизических исследований. Оптические свойства молекул: учебное пособие / А.К. Кукушкин. – М.: МГУ, 1999. – 81с.
106. Конев, С.В. Электронно-возбужденные состояния биополимеров: учебное пособие / С.В. Конев. – Минск: Наука и техника, 1965. – 186 с.
107. Черницкий, Е.А. Спектральный люминесцентный анализ в медицине: учебное пособие / Е.А. Черницкий, Е.И. Слобожанина. – Минск: Наука и техника, 1989. – 141с.
108. Кэри, П. Применения спектроскопии КР и РКР в биохимии: учебное пособие // П. Кэри. – М.: Мир, 1985. – 272 с.
109. Методика получения и обработки спектральной информации с помощью статического Фурье – спектрометра / К. В. Глаголев, И. С. Голяк [и др.] // *Оптика и спектроскопия.* – 2011. – Т.110, № 3. – С. 486-492.
110. Мониторинг открытой атмосферы с помощью фурье-спектрорадиометра / К. В. Глаголев, А. Н. Морозов, Б. П. Назаренко [и др.] // *Вестник МГТУ им. Н. Э. Баумана, серия “Естественные науки”.* – 2005. – № 3. – С. 9-25.
111. Проблема идентификации и определения концентраций загрязняющих веществ с помощью фурье-спектрорадиометра / А. Ю. Бойко, А. А. Григорьев, С. К. Дворук [и др.] // *Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана, серия “Естественные науки”.* – 2004. – № 1. – С. 26-41.
112. Мониторинг загрязняющих веществ в атмосфере с помощью фурье-спектрорадиометра / С.К. Дворук, В.Н. Корниенко, И.В.Кочкиков [и др.] // *Оптический журнал.* – 2004. – Т.71, № 5. – С. 7-13.
113. Морозов, А.Н. Численное решение задачи распознавания состава газовой смеси по результатам обработки спектров, зарегистрированных на фурье-спектрорадиометре / А. Н. Морозов, С. И. Светличный, И. Л. Фуфурин // *Вестник МГТУ им. Н.Э. Баумана, серия “Естественные науки”.* – 2007. – № 2. – С. 3-13.
114. DNA Melting Investigated by Differential Scanning Calorimetry and Raman Spectroscopy / John G. Duguid, Victor A. Bloomfield, James M. Benevides, George J. Thomas // *Biophysical Journal.* – 1996. – V.71, № 6. – P. 3350-3360.

115. Langlais, M. Raman spectroscopic study of the effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} ions on calf thymus DNA: binding sites and conformational changes / M. Langlais, H. A. Tajmir – Riahi, R. Savoie // *Biopolymers*. – 1990. – V. 30, № 7. – P. 743-752.
116. Kint, S. A Raman difference spectroscopic investigation of ovalbumin and S – ovalbumin / S. Kint, Y. Tomimatsu // *Biopolymers*. – 1979. – V. 18, № 5. – P. 1073-1079.
117. Benevides, James M. Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes / James M. Benevides, Stacy A. Overman, George J. Thomas Jr. // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2005. – V. 36, № 4. – P. 279 – 299.
118. Бортников, К.С. Вторичное излучение в опалах со структурными пустотами, заполненными сегнетоэлектриками и люминофорами, возбуждаемое полупроводниковыми светодиодами / К.С. Бортников, В.С. Горелик, А.А. Есаков // *Неорганические материалы*. – 2007. – Т.43, № 12. – С. 1458-1463.
119. Исакова, О.П. Обработка и визуализация данных физических экспериментов с помощью пакета Origin / О.П. Исакова, Ю.Ю. Тарасевич, Ю.И. Юзюк – М: ЛИБКОМ, 2009. – 136 с.
120. Корреляционная флуоресцентная спектроскопия структуры и состава диэлектриков – фармацевтических препаратов / Ю.П. Войнов, В.С. Горелик, С.В. Морозова, М.Ф. Умаров // *Физика диэлектриков (Диэлектрики - 2011): материалы двенадцатой Межд. конф., 23-26 мая 2011 г. / РГПУ им. А.И.Герцена. - Санкт-Петербург, 2011. – С. 220-223.*
121. Разностная флуоресцентная спектроскопия структуры и состава биоактивных препаратов / Ю.П. Войнов, В.С. Горелик, С.В. Морозова, М.Ф. Умаров // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. – 2011. – Т. 38, № 11. – С. 13-19.
122. Фотолюминесценция ароматических соединений, находящихся в фотонных ловушках, при резонансном импульсно-периодическом возбуждении / Ю.П. Войнов, В.С. Горелик, А.Ю. Пятышев, М.Ф. Умаров // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. – 2012. – Т. 39, № 12. – С. 28-36.
123. Горелик, В.С. Фотолюминесценция нуклеиновых оснований, ДНК и биологических объектов / В.С. Горелик, И. И. Сутула // *Краткие сообщения по физике ФИАН*. – 2010. – Т. 37, № 5. – С. 49-51.
124. Гончаров, А.П. Комбинационное рассеяние света в конденсированных средах, помещенных в фотонные ловушки / А.П. Гончаров, В. С. Горелик, А. В. Кравцов // *Журнал технической физики*. – 2007. – Т. 77, №11. – С. 78-82.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
I. ТИПЫ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	5
1.1. Фармацевтические препараты	5
1.2. Аминокислоты	8
1.3. Белки	12
1.4. Нуклеиновые основания	18
1.4.1. Пиримидиновые основания	19
1.4.2. Пуриновые основания	21
1.5. Дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты	24
1.5.1. Структура ДНК	28
1.5.2. Структура РНК	33
II. ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	38
2.1. Общая характеристика и классификация спектроскопических методов анализа	39
2.1.1. Природа и свойства электромагнитного излучения	39
2.1.2. Спектры электромагнитного излучения	41
2.1.3. Классификация спектроскопических методов анализа	46
2.2. Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света	50
2.2.1. Теория явления КР	50
2.2.2. Лазерная спектроскопия КР	57
2.3. Фотолюминесцентная спектроскопия	64
2.3.1. К теории фотолюминесцентной спектроскопии	65
2.3.1.1. Электронно-колебательные спектры молекул	65
2.3.1.2. Правило зеркальной симметрии	72
2.3.1.3. Времена затухания и квантовые выходы флуоресценции	75
2.3.1.4. Анизотропия флуоресценции	77
2.3.1.5. Временная шкала молекулярных процессов в растворе	79
2.3.2. Флуоресцентная флуктуационная спектроскопия	80
2.3.3. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия	82
2.3.4. Использование флуоресцентных методов для исследования структуры и состава биоактивных препаратов	86
III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ	90
3.1. Основные оптические элементы, используемые в спектроскопии КР	90
3.2. Подготовка образцов для регистрации спектров КР и ФЛ	93
3.3. Волоконно-оптические системы регистрации спектров вторичного излучения в биоактивных препаратах	95
3.4. Лазерная спектроскопия КР органических и неорганических соединений с использованием компактных волоконно-оптических схем регистрации	99
3.5. Математическая обработка экспериментов и их обсуждение	104

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ СПЕКТРОВ КР И ФЛ	
БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ	106
4.1. Спектры фотолюминесценции фармацевтических препаратов, находящихся в фотонных ловушках	106
4.2. Результаты исследований твердотельных хиральных фаз триптофана.....	115
4.3. Спектры фотолюминесценции альбумина	120
4.4. Спектры ФЛ нуклеиновых оснований и ДНК	121
4.5. Спектры КР аминокислот и ДНК	130
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	137
ЛИТЕРАТУРА.....	138

Научное издание

**Максуджон Файзулович Умаров
Владимир Семенович Горелик**

**ОПТИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
БИОАКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Монография

Подписано в печать 23.06.2014 г.
Формат 60х90/16. Бумага офисная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 9,2.
Тираж 500 экз. Заказ .

Отпечатано: РИО ВоГУ
160000, г. Вологда, ул. С. Орлова, 6.