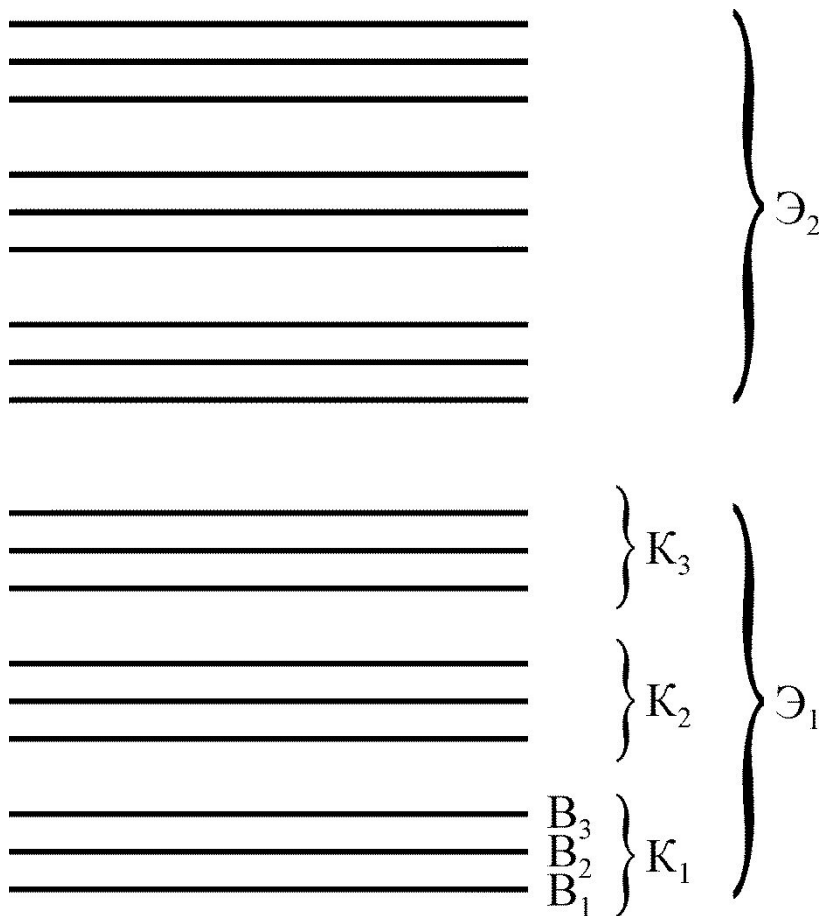


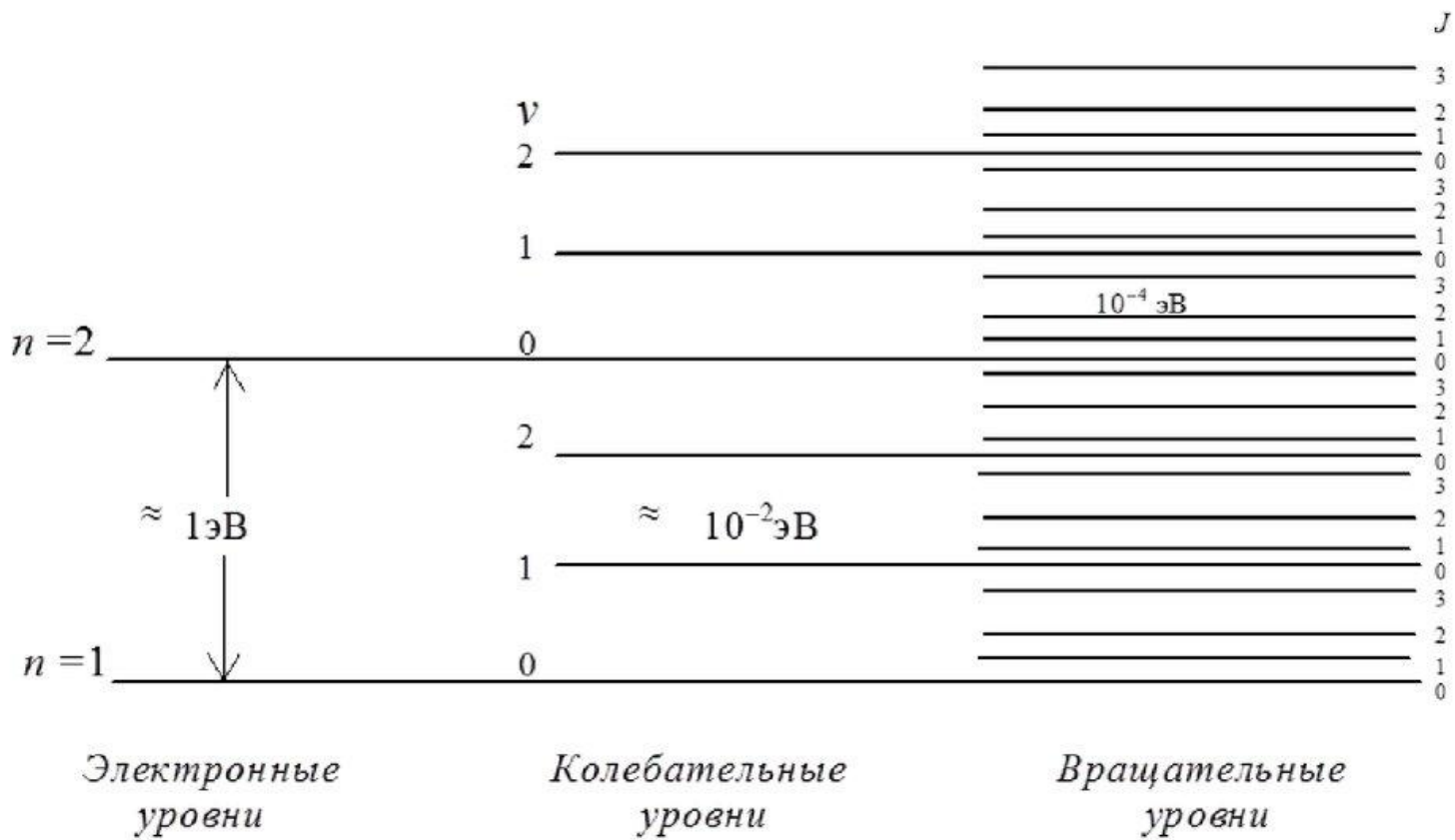
Поглощение атомами энергии фотона характеризуется отдельными линиями в спектре, отражающими чисто электронные переходы. Каждый электрон в молекуле находится на определенной орбитали (σ, π, n -орбитали) и обладает определенной энергией, поэтому в молекуле существует система электронных энергетических уровней. Электронные уровни в молекулах представлены семейством колебательных подуровней, а каждый колебательный подуровень - семейством вращательных



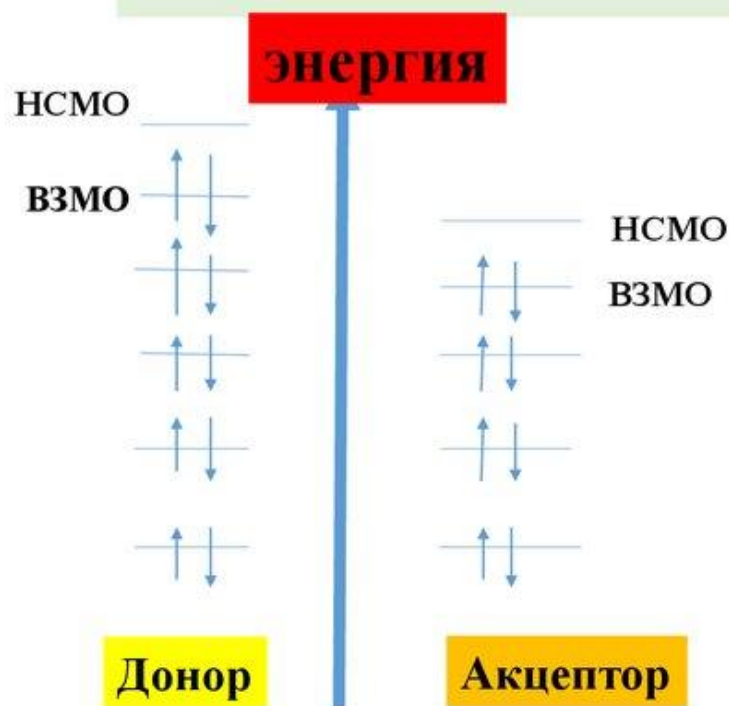
Полная (общая) энергия молекулы равна:

$$E_{\text{общ}} = E_{\text{эл}} + E_{\text{кол}} + E_{\text{вращ.}}$$

Для упрощения вклад вращательных переходов в $E_{\text{общ}}$ обычно не рассматривается.



Электронные переходы в молекулах при поглощении квантов ЭМИ



Согласно теории молекулярных орбиталей (МО), в молекуле существует система молекулярных энергетических уровней, и на каждом из них по два электрона с противоположными спинами. Для химических и оптических свойств молекулы важны самые верхние уровни (именно их электроны принимают участие в химических процессах). Важны таким образом верхняя заполненная молекулярная орбиталь (ВЗМО) и нижняя свободная молекулярная орбиталь (НСМО). Чем выше энергия ВЗМО, тем ниже энергия ионизации, то есть энергия, которую надо затратить, чтобы вырвать электрон из молекулы. Энергия НМСО определяет акцепторные свойства молекулы: чем ниже НМСО, тем более эффективно молекула присоединит электрон. Окислительно-восстановительная реакция будет происходить в том случае, если энергия ВЗМО донора выше энергии НМСО акцептора.

Электронные переходы при поглощении света в биомолекулах

При поглощении квантов света (фотонов) происходит изменение энергетического состояния молекул-акцепторов.

Поглощение света представляет собой преобразование энергии кванта света ($h\nu$) в энергию электронного и колебательного возбуждения молекулы. Этот процесс выражается в том, что один из электронов переходит с синглетного основного (невозбужденного) уровня (S_0) на один из синглетных возбужденных уровней (S_1); одновременно может происходить возбуждение колебательного подуровня.

При квантовых переходах атомы и молекулы скачкообразно переходят с одного энергетического уровня на другой.

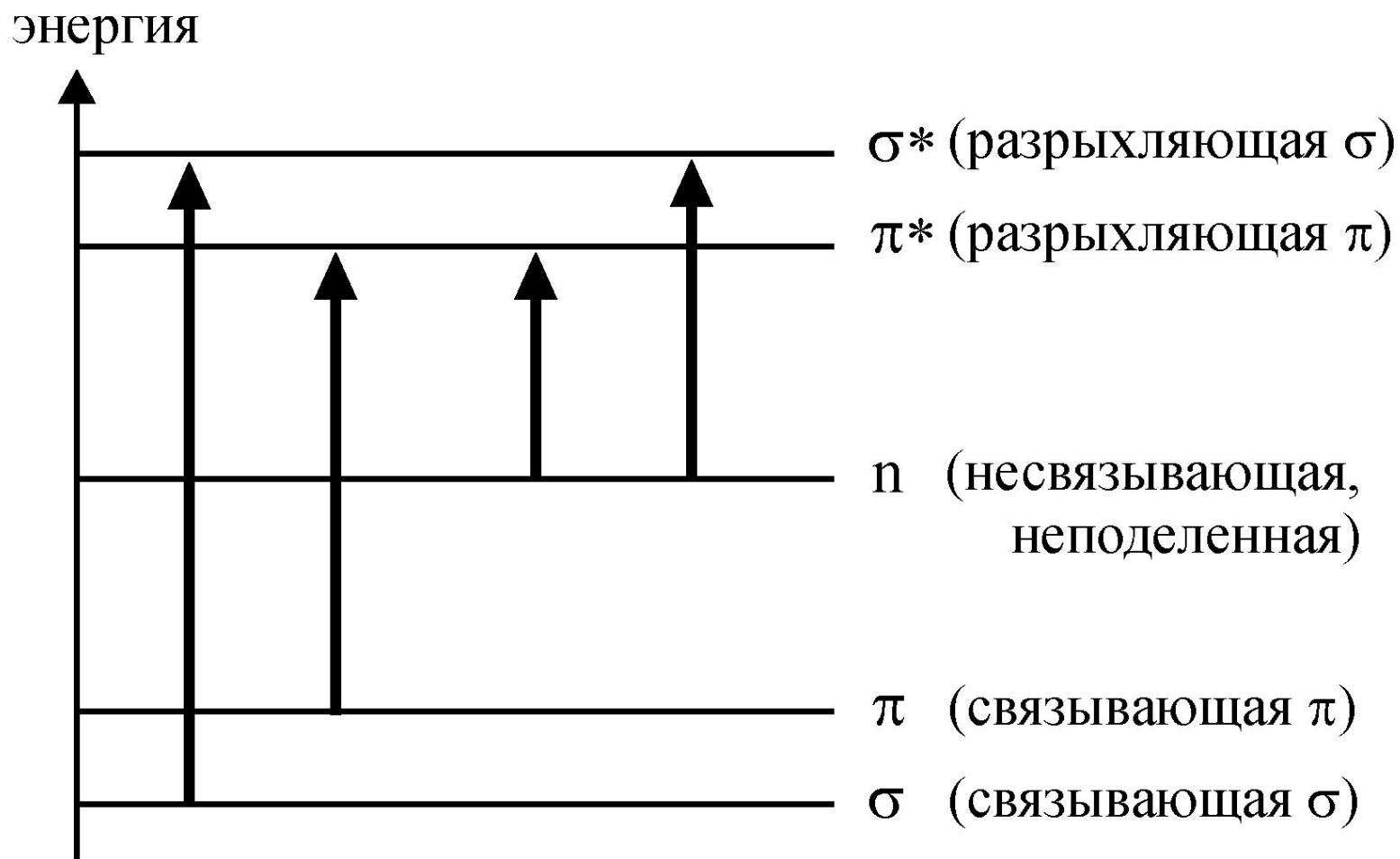
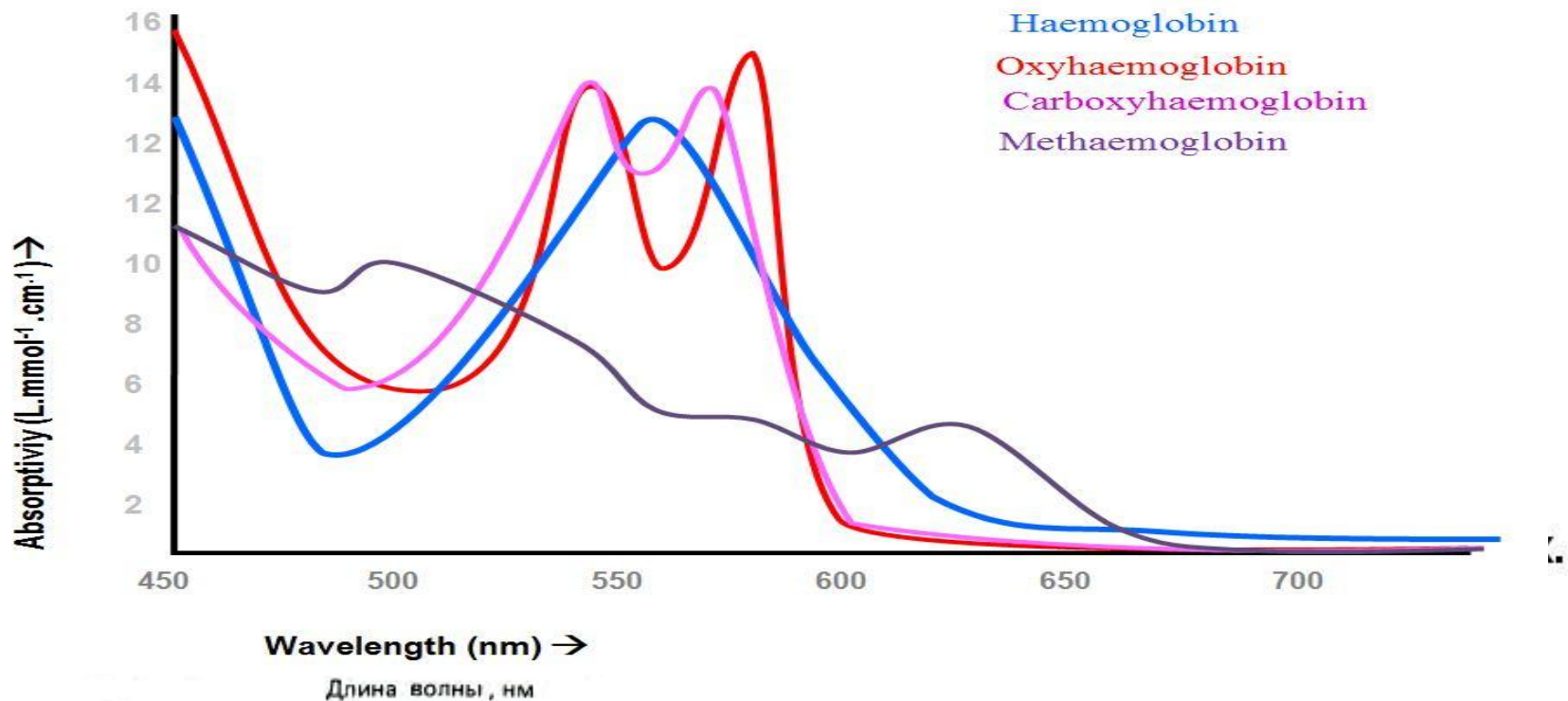


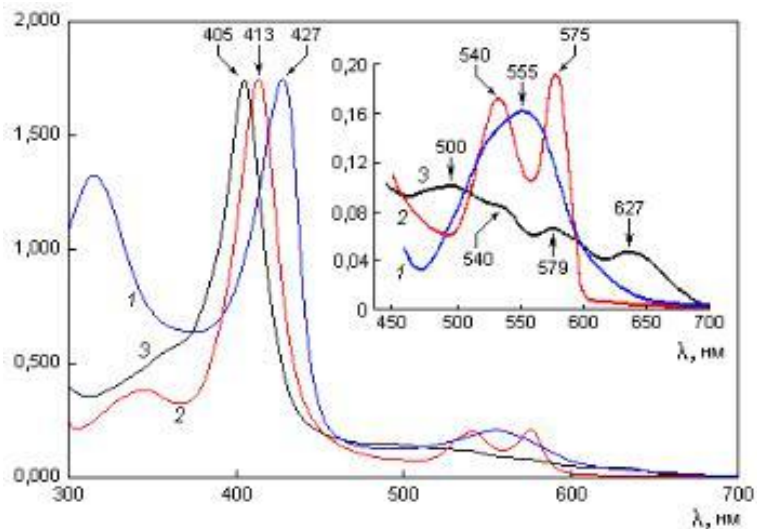
Схема электронных переходов, обуславливающих спектр поглощения в видимой и УФ-областях.

Спектр поглощения

Спектр поглощения (абсолютный спектр поглощения) – зависимость количества поглощенного света от длины волны.

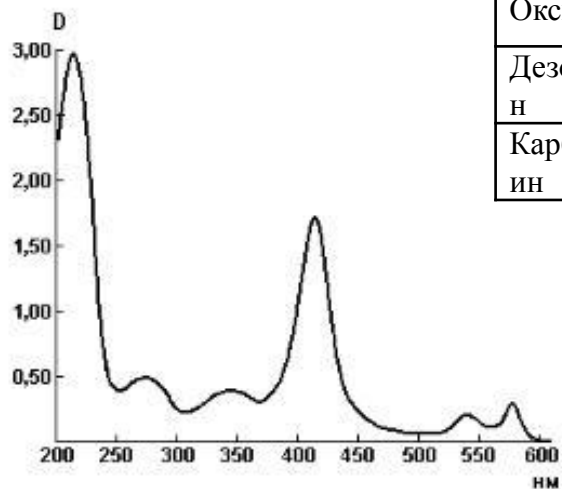
У каждого вещества спектр поглощения уникален – это его «молекулярный паспорт».



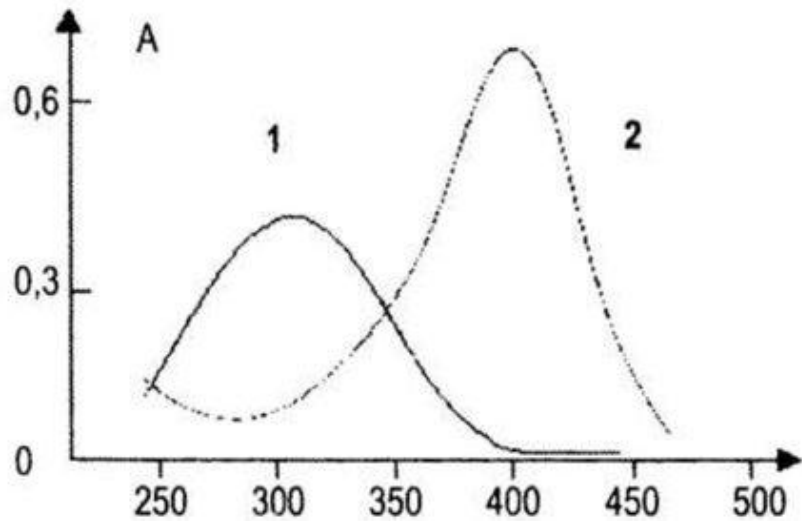


Спектральные характеристики различных форм гемоглобина человека

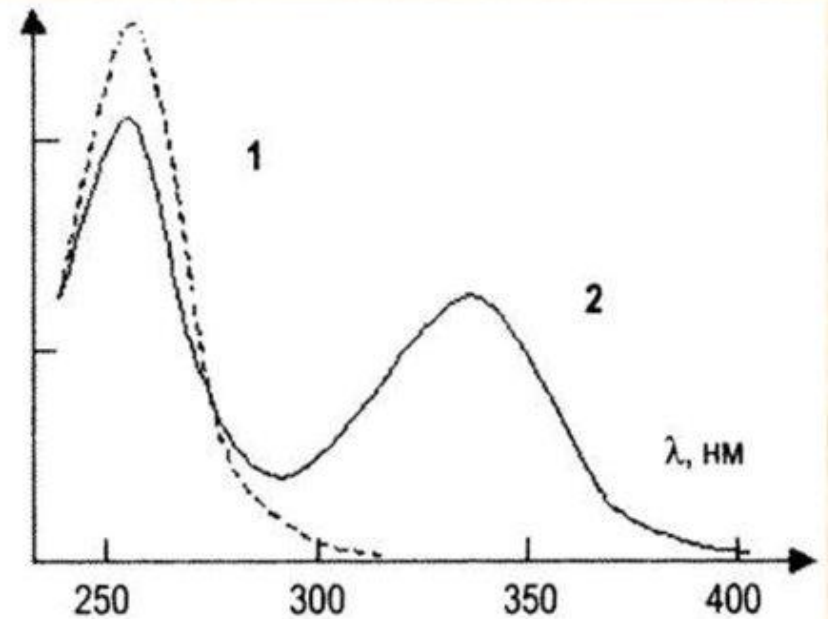
	α-полоса		β-полоса		Полоса Соре	
	λ, нм	ε _λ , M ⁻¹ см ⁻¹	λ, нм	ε _λ , M ⁻¹ см ⁻¹	λ, нм	ε _λ , M ⁻¹ см ⁻¹
Оксигемоглобин	577	14600	542	13800	412	135000
Дезоксигемоглобин	555	13500			430	119000
Карбоксигемоглобин	569	13400	539	13400	419	191000



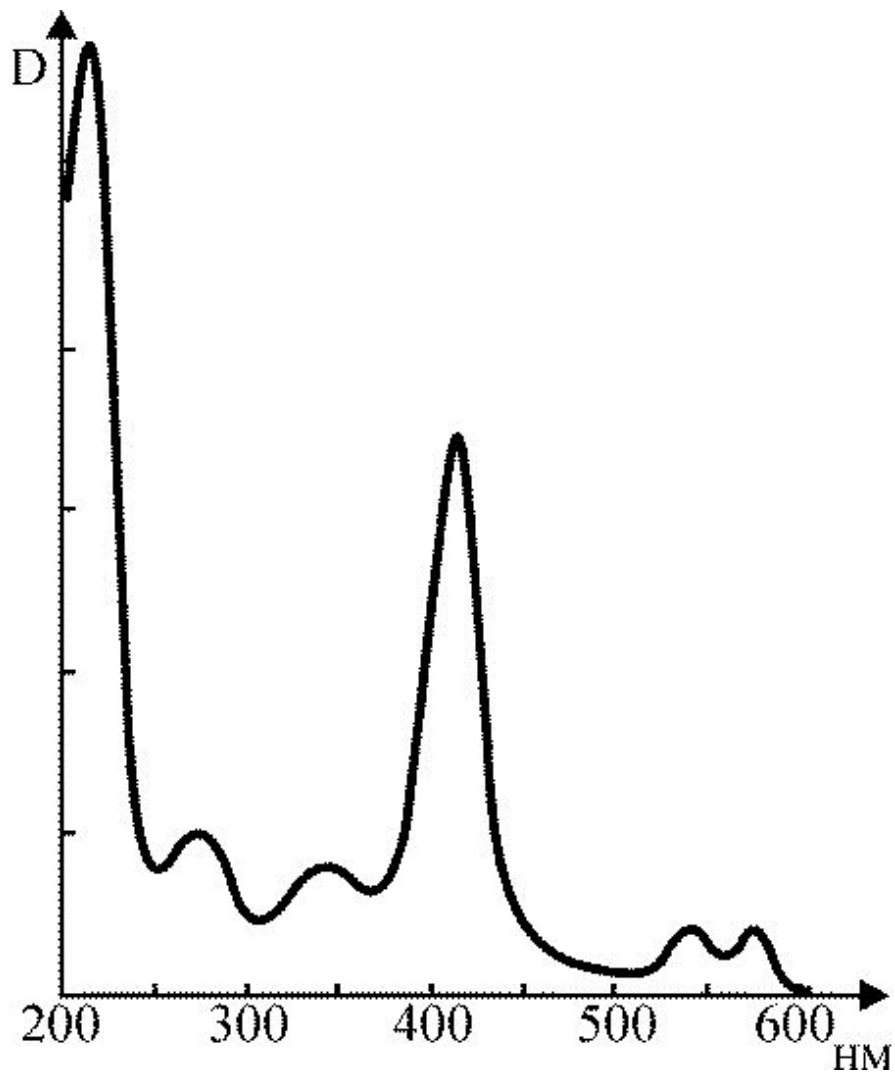
Спектры поглощения



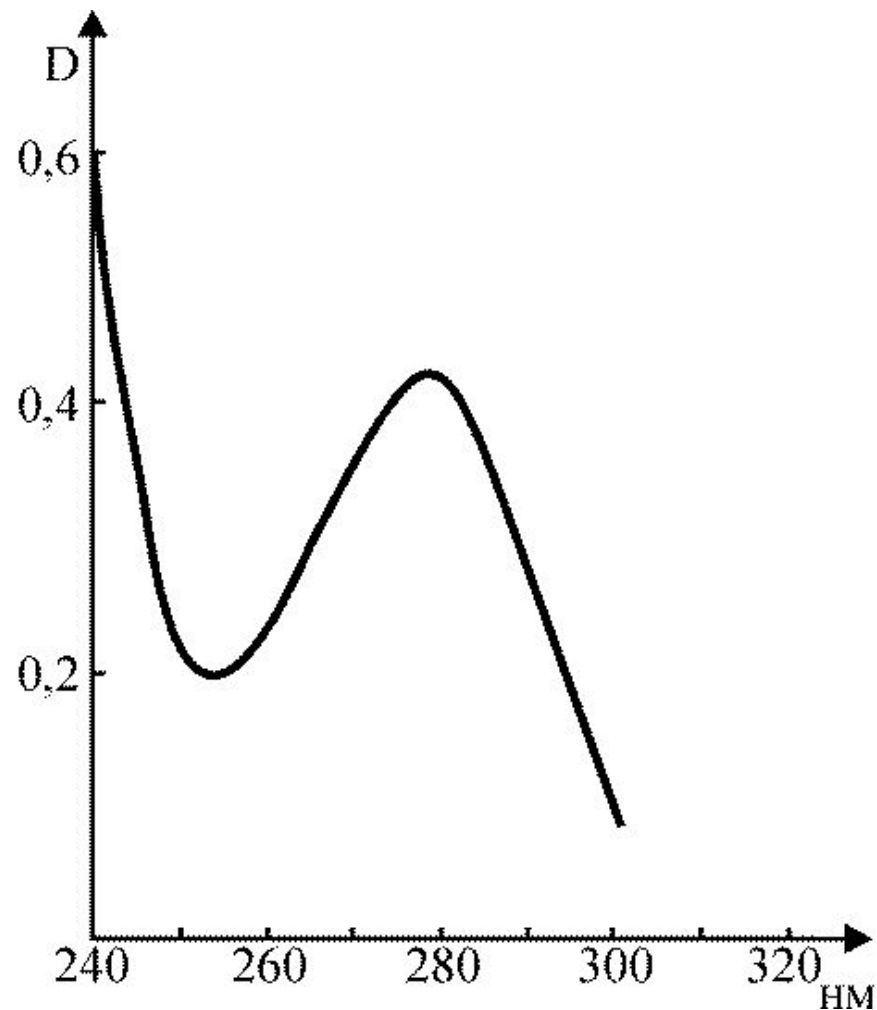
•4-нитрофенолфосфата (1) и 2-нитрофенольного аниона (2), образующегося при расщеплении субстрата



Спектры поглощения НАД⁺ (1) и НАДН (2)

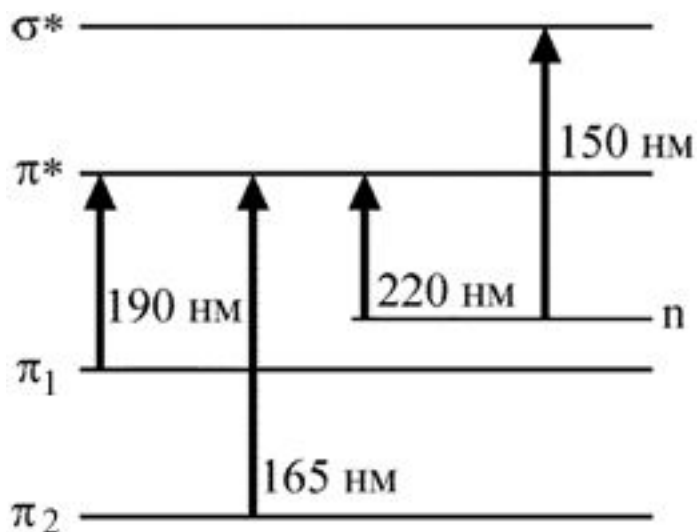
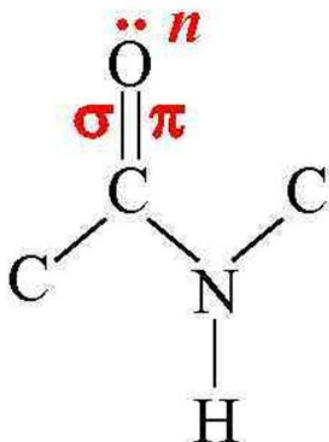
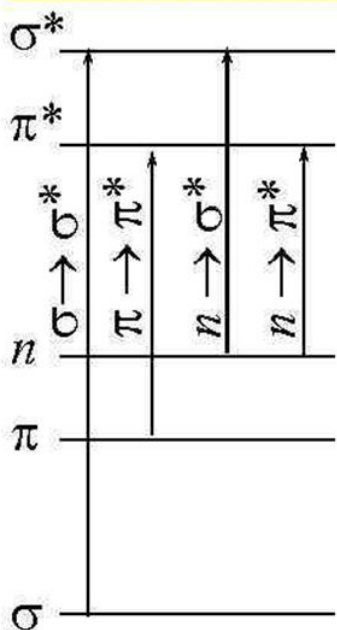


Спектр поглощения водного оксигемоглобина мышей в ультрафиолетовой и видимой областях.



Спектр поглощения водного раствора сывороточного альбумина человека

Электронные переходы в пептидной связи

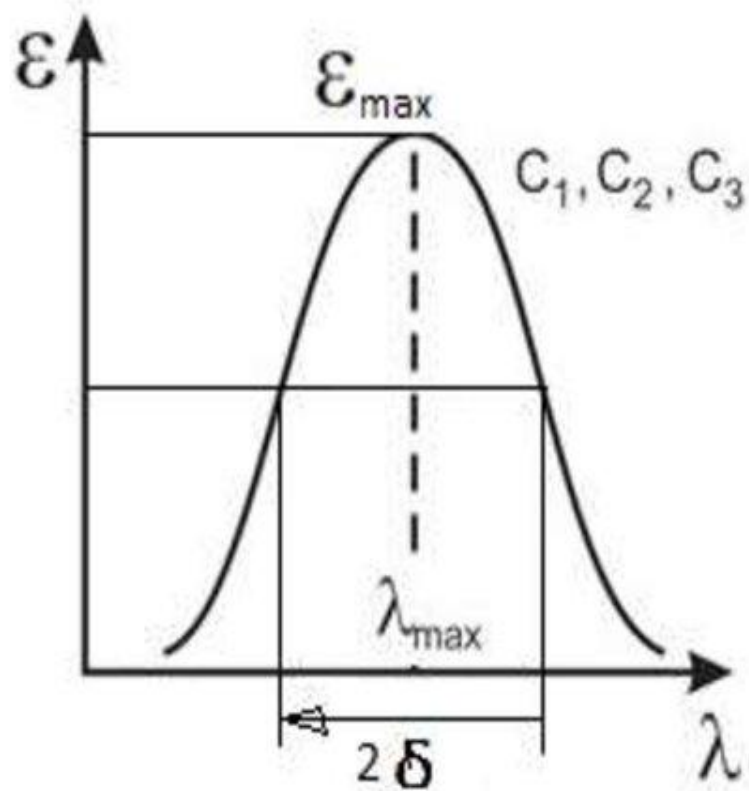
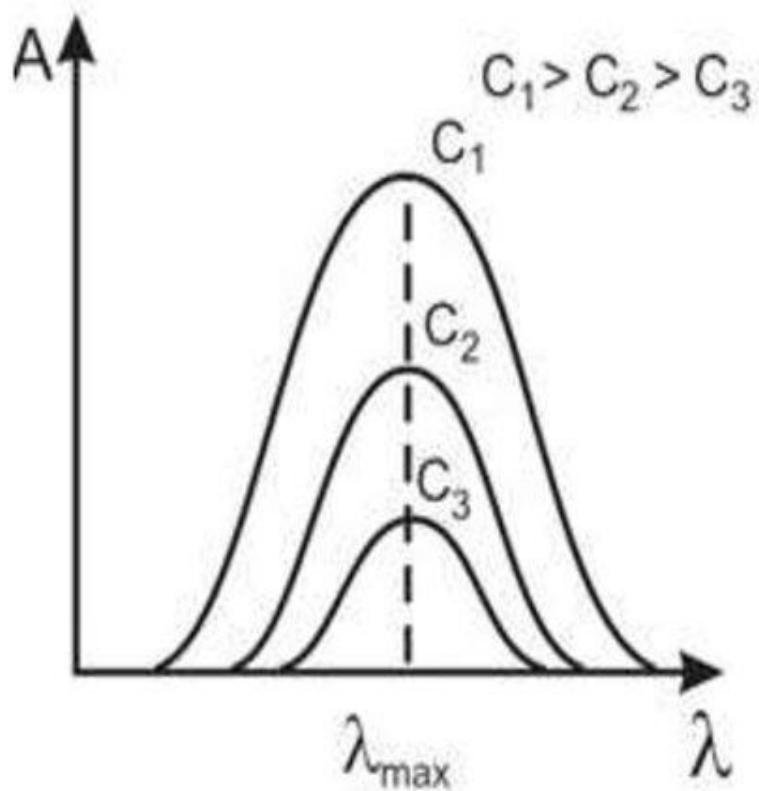


Как известно, электроны пептидной группы в известной мере делокализованы по трем атомам: азоту, углероду и кислороду. Среди наблюдаемых в пептидной группе переходов наименьшую энергию имеет $n \rightarrow \pi^*$ -переход, n -электрон локализован на атоме кислорода. Полоса поглощения $n \rightarrow \pi^*$ в пептидах обычно наблюдается при 210-220 нм и является очень слабой. Только в случае *альфа*-спиральной конформации полимера этот переход очень слабо проявляется в виде небольшого плеча на фоне гораздо более сильной полосы с максимумом вблизи 190 нм. Эта интенсивная полоса, главная в доступной для измерений области, порождается $\pi_1 \rightarrow \pi^*$ -переходом. Уровни π_1 и π^* отвечают связывающей и несвязывающей орбите CO -группы.

При одноэлектронном переходе зависимость D (или ϵ) от λ обычно описывается кривой распределения Гаусса. Полоса поглощения в электронном спектре характеризуется основными параметрами:

- *максимальным значением оптической плотности (D_{\max}) или молярного коэффициента экстинкции (ϵ_{\max}) (максимум поглощения);*
- *длиной волны максимального поглощения (λ_{\max} , нм), соответствующей D_{\max} ;*
- *эффективной шириной полосы поглощения $\Delta\lambda_{1/2}$, нм (или полушириной полосы поглощения), она соответствует расстоянию между двумя точками полосы поглощения, находящимися на высоте $1/2 D_{\max}$ данной полосы.*

Характеристики спектра поглощения

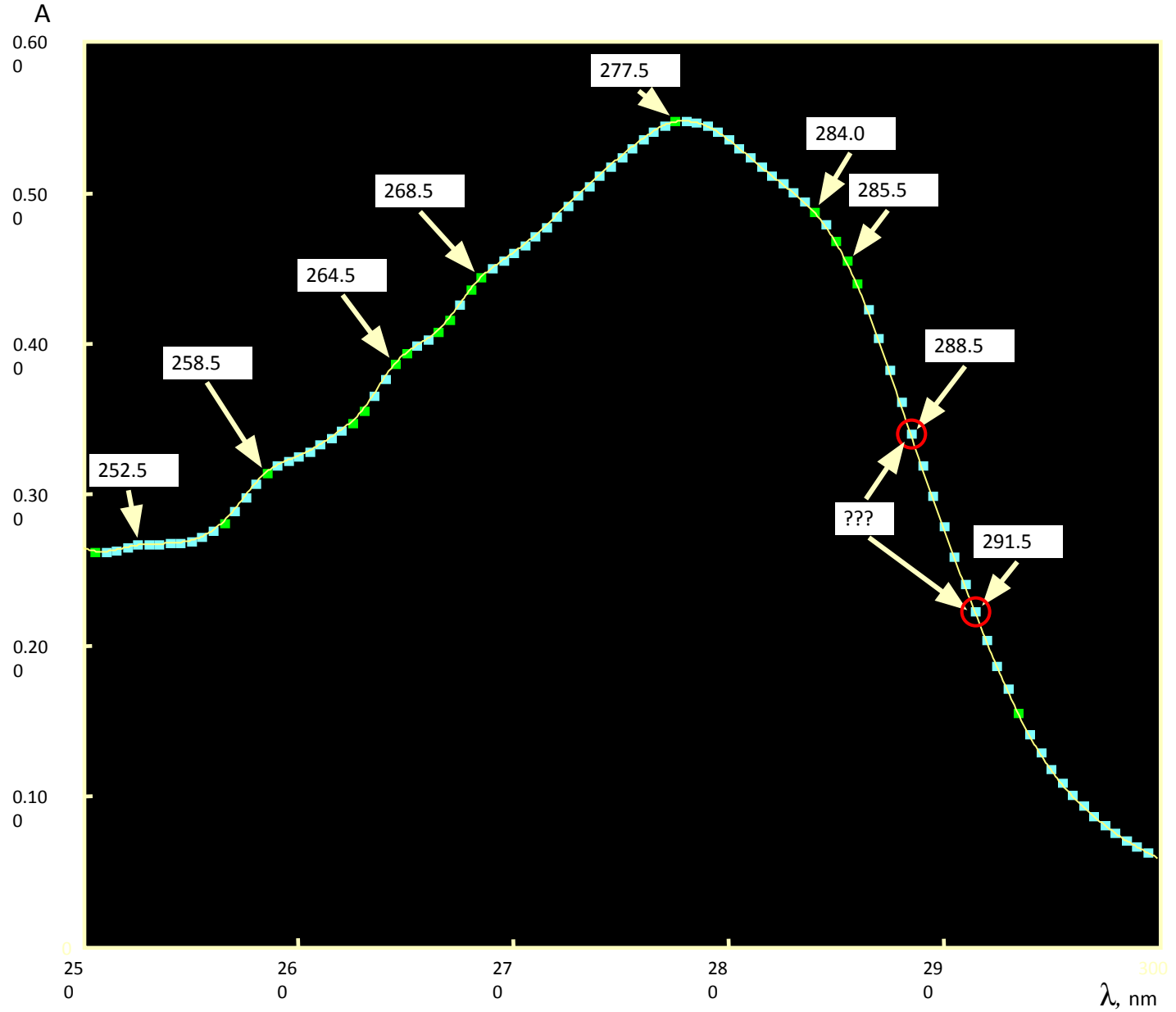


- Максимумы поглощения ароматических аминокислот
- Характеристические точки спектра поглощения раствора белка (BSA^{VS}) и его реконструкции (BSA^{RS})
- Смещение характеристических точек ($^{VS-RS}$)

Sample	Wavelength, nm									
His										
Phe	241.5	247.0	251.5	257.5	263.5	267.0				
Tyr								275.0	281.5	
Trp							271.5		279.5	288.5
BSA^{VS}			252.5	258.5	264.5	268.5		277.5	284.5 285.5	288.5 291.5
BSA^{RS}	–	246.5	250.5	257.0	263.5	267.0	272.0	275.5	282.0	–
VS-RS		–	+2.0	+1.5	+1.0	+1.5	–	+2.0	+2.5 +3.5	–

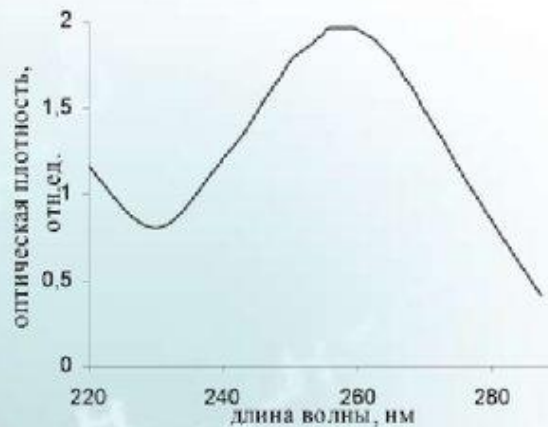
Смещение точек ($^{VS-RS}$) в длинноволновую часть спектра белка относительно модели, а также неоднородность шага смещения, указывает на взаимодействие аминокислотных остатков в молекуле бычьего сывороточного альбумина.

Спектр поглощения БСА в диапазоне длин волн 250 – 300 нм
(концентрация 1.2×10^{-5} моль/л, рН 7.4)

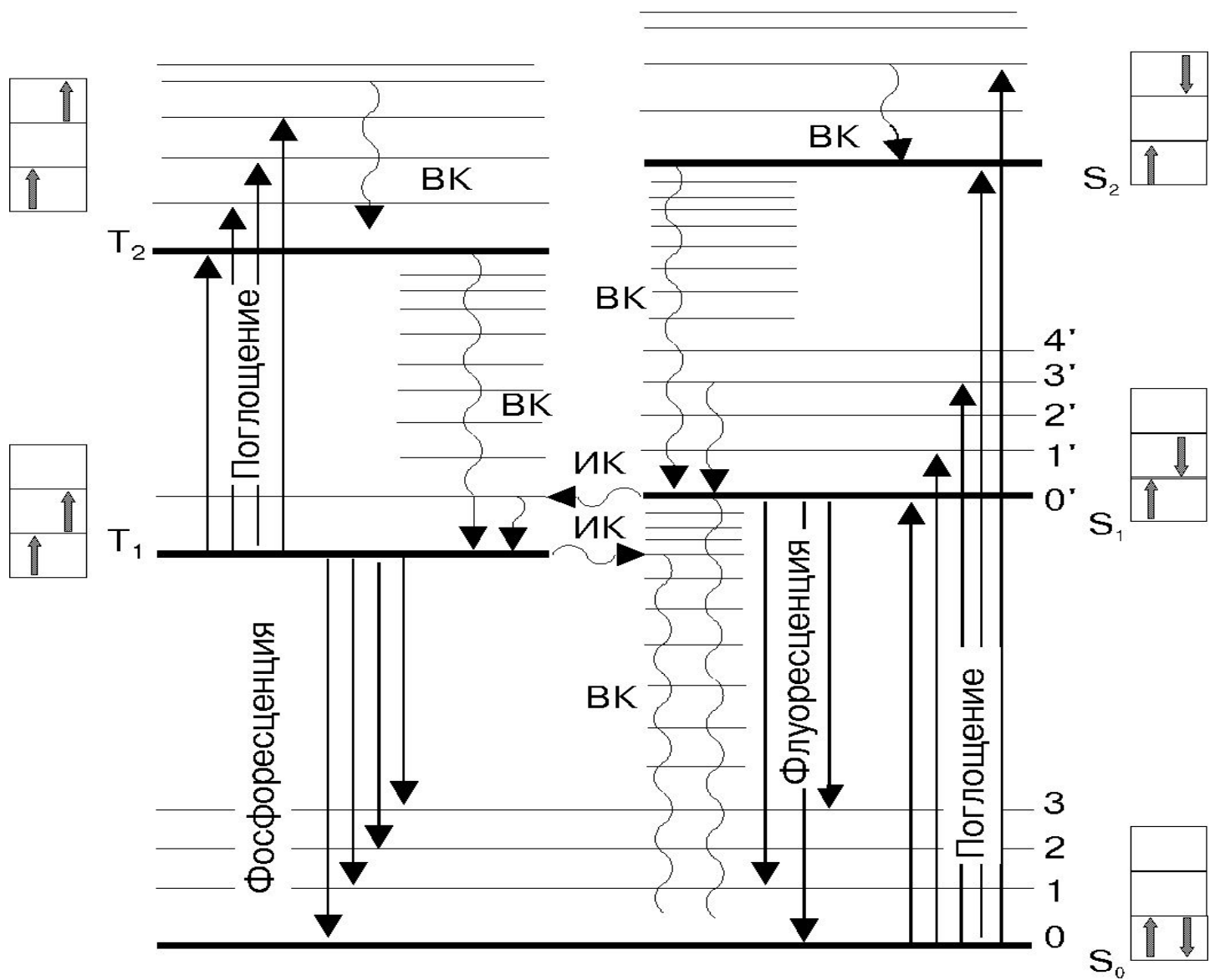


Измерение спектра поглощения ДНК

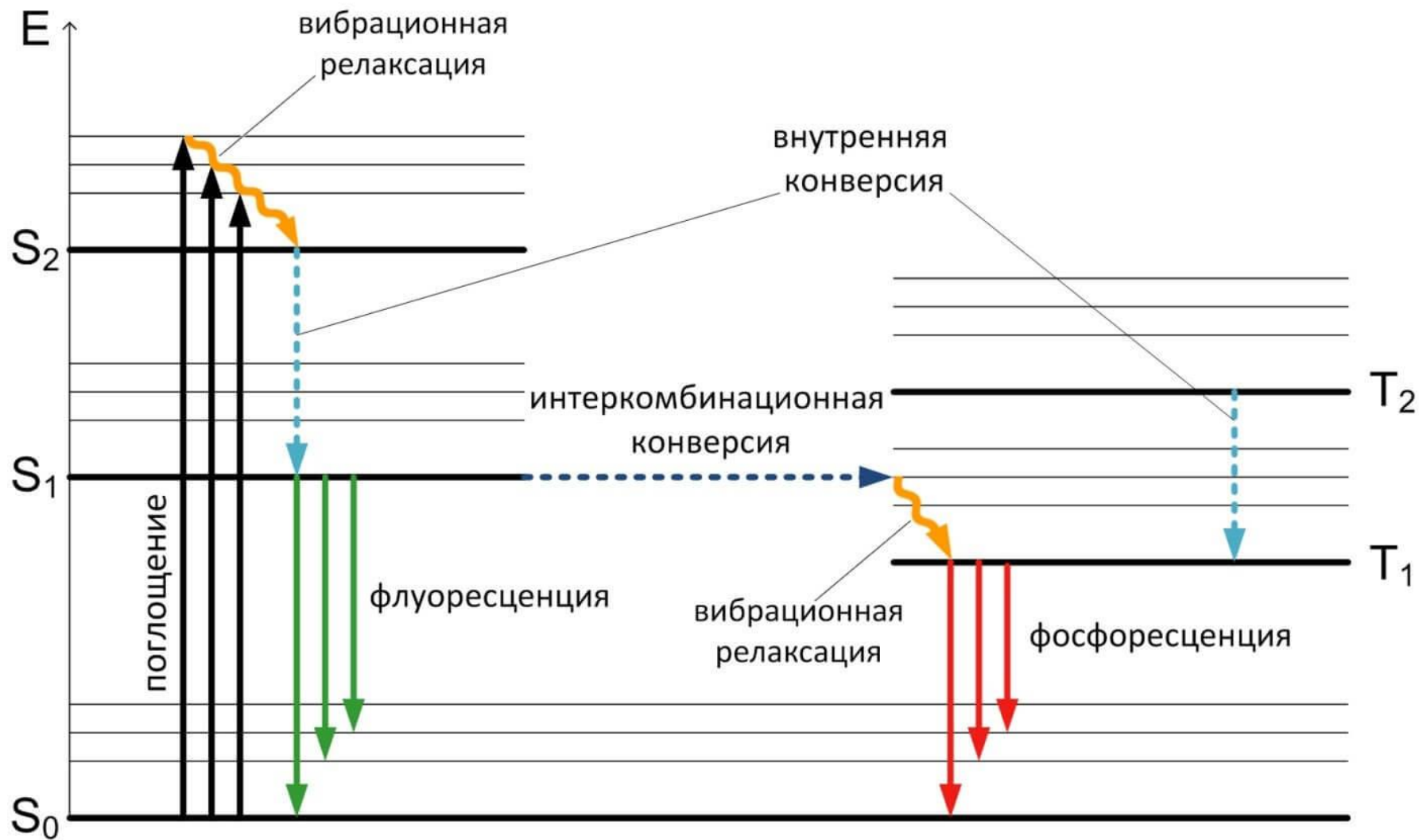
- Максимум поглощения ДНК $\lambda_{\text{макс}}$ приходится на длину волны около 260 нм



- а $\epsilon=6600$, однако, индивидуальные основания имеют $\lambda_{\text{макс}}$ (в нм):
 - 260,5 для аденина;
 - 264,5 для тимина;
 - 246 для гуанина и
 - 267,0 для цитозина
- Соответственно ϵ оснований при $\lambda_{\text{макс}}$ $13,4 \times 10^3$, $7,9 \times 10^3$, $10,7 \times 10^3$, $6,1 \times 10^3$



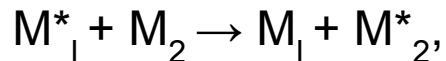
Электронные переходы в молекуле (схема Яблонского)



Электронные переходы в молекуле (схема Яблонского)

Миграция энергии

Это самопроизвольная безызлучательная передача энергии от одной частицы (атома, молекулы) к другой на расстояния, значительно превышающие межатомные, происходящая без растраты на тепловые колебания и без кинетических соударений донора и акцептора энергии:



где M_1^* – донор энергии – электронно-возбужденная частица (молекула); M_2 – акцептор энергии – молекула в основном состоянии.

Механизмы миграции энергии:

- индуктивно-резонансный,
- обменно-резонансный,
- экситонный
- полупроводниковый (зонная проводимость).

Индуктивно-резонансная миграция энергии

Передача энергии по этому механизму осуществляется за счет диполь-дипольных взаимодействий между молекулами M_1 и M_2 .

Энергия взаимодействия обратно пропорциональна R^3 (R - межмолекулярное расстояние), а вероятность миграции энергии обратно пропорциональна R^6 .

Расстояния, при которых осуществляется миграция энергии между донором и акцептором, принято характеризовать так называемым критическим радиусом R_0 . Значение его колеблется для различных пар молекул от 1 до 10 нм и определяется временем жизни возбужденного состояния донора ($10^{-8} - 10^{-9}$ с), площадью (интегралом) перекрытия вышеназванных спектров и величиной мигрирующих порций энергии.

Индуктивно-резонансная миграция энергии может протекать как в рамках одной молекулы, от одних ее групп к другим (внутримолекулярная миграция), так и между отдельными молекулами (межмолекулярная миграция энергии).

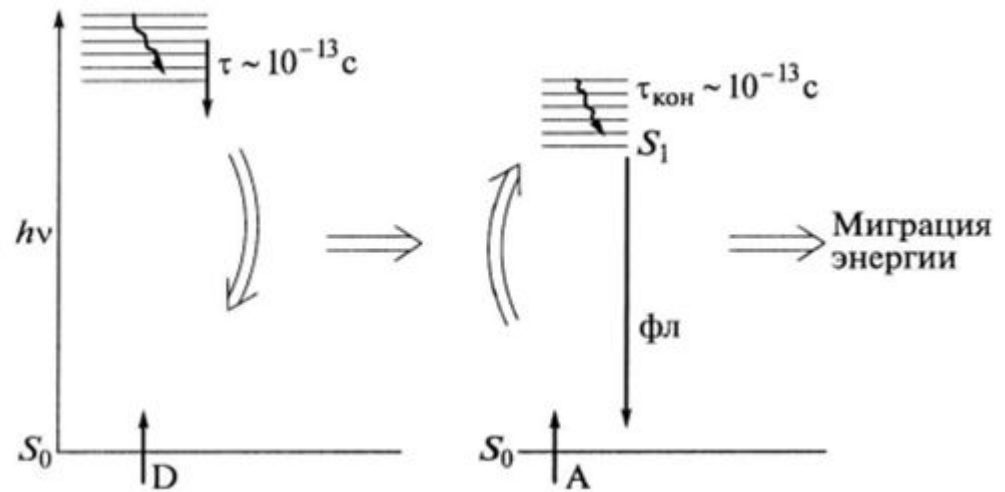
Примеры миграции энергии по индуктивно-резонансному механизму: ароматические аминокислоты белка → фикобилины (фикоэритрин и фикоцианин); тирозин → триптофан; триптофан → триптофан; хлорофилл b → хлорофилл a и др.

Миграция энергии по индуктивно-резонансному механизму может происходить в случае выполнения трех правил Ферстера:

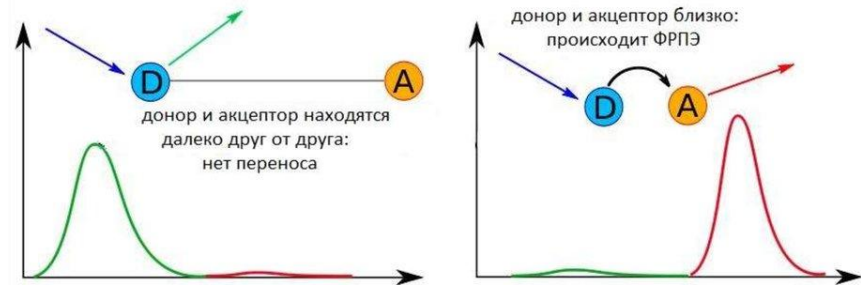
1. Донор энергии (M_1^*) должен обладать способностью к флуоресценции.

2. Спектр флуоресценции донора (M_1^*) должен перекрываться со спектром поглощения акцептора (M_2). Эффективность миграции энергии прямо пропорциональна площади перекрытия указанных спектров.

3. Донор (M_1^*) и акцептор энергии (M_2) должны быть сближены на определенные расстояния (R).



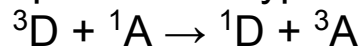
Фёрстеровский резонансный перенос энергии (ФРПЭ)



Важным является что ФРПЭ происходит на расстояниях, соизмеримых с размерами биологических объектов, таких как белковые глобулы или мембраны клеток. При этом относительная эффективность переноса энергии обратно зависит от расстояния между ФРПЭ-партнёрами.

Обменно-резонансная, или триплет-триплетная миграция энергии

Энергия мигрирует с триплетного возбужденного уровня донора (3D) на триплетный уровень акцептора (3A) в соответствии со схемой



Это связано с перекрыванием «триплетных» электронных облаков за счет электростатических взаимодействий электронов донора и акцептора. Чем больше объем перекрывания электронных орбит (облаков), тем вероятнее перенос, при котором донор и акцептор взаимно обмениваются своими электронами.

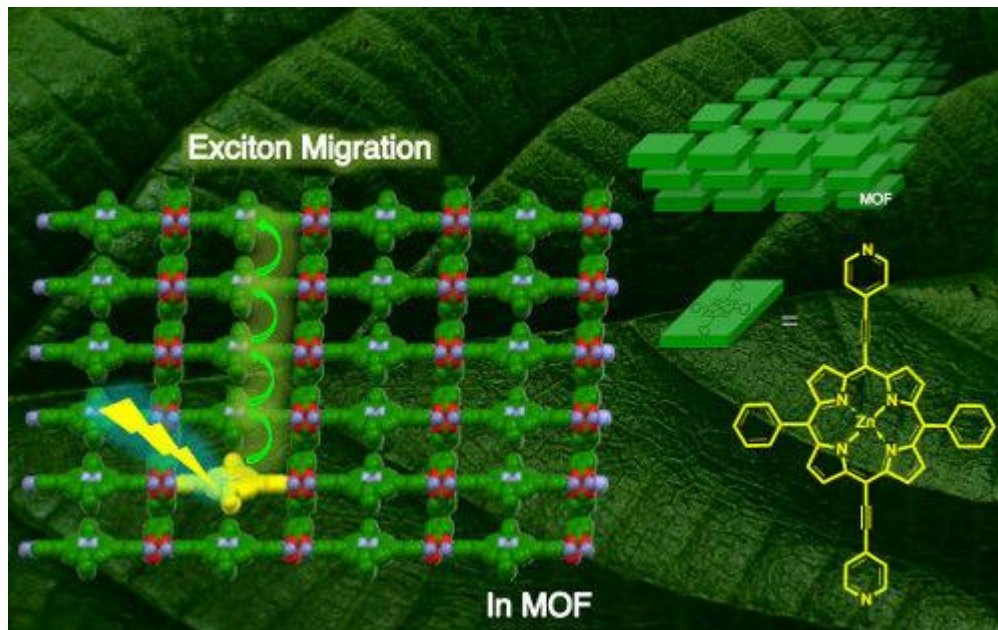
В этом случае необходимо большее сближение молекул ($R_0 < 2$ нм), чем для индуктивно-резонансного переноса энергии.

Эффективность обменно-резонансной миграции энергии обратно пропорциональна шестой степени межмолекулярного расстояния ($1/R^6$).

Экситонный перенос энергии

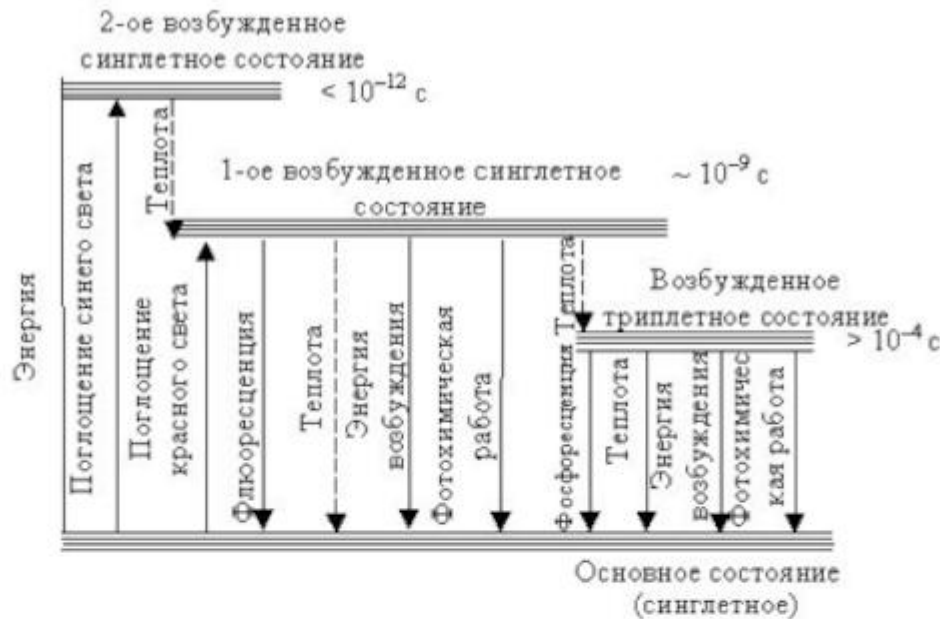
возникает вследствие электрических, диполь-дипольных взаимодействий между молекулами или ионами.

Экситон – квазичастица, представляющая собой электронное возбуждение в диэлектрике или полупроводнике, мигрирующее по кристаллу и не связанное с переносом электрического заряда и массы.



В пределах одного локального светособирающего комплекса, примыкающего с ФС I или ФС II, где молекулы пигментов плотно упакованы в квазикристаллическую структуру, их электронные уровни могут обобществляться в зоны. В этом случае возможен экситонный механизм миграции энергии, при котором поглощение кванта света приводит к появлению экситона - коллективного возбуждения, делокализованного по всей системе молекул.

Возбуждение молекулы донора распространяется по верхним колебательным уровням на всю систему акцепторов за время 10^{-13} - 10^{-14} сек, меньшее, чем время релаксации колебательных состояний. Это самый быстрый способ миграции энергии.



Поглощение молекулой Хл а одного кванта красного света (энергия = 41 ккал/энштейн) приводит к переходу молекулы в **первое синглетное возбужденное состояние**, протяженность жизни которого $\sim 10^{-9}$ с.

Поглощение кванта **синего света**, который имеет большую энергию (65 ккал/энштейн), приводит к возникновению еще более короткоживущего (менее 10^{-12} с) второго возбужденного синглетного состояния.

Первое возбужденное синглетное состояние может с поворотом спина и тратой тепла (10 ккал/моль) переходить в первое возбужденное триплетное состояние (протяженность жизни больше 10^{-4} с).

Спектр действия фотохимической реакции –

зависимость поперечного сечения (вероятности)

фотохимической реакции (σ) от длины волны

облучения: $\sigma = S\phi$,

где S – поперечное сечение поглощения активного света;

ϕ – квантовый выход фотохимической реакции.

S – вероятность поглощения кванта при

прохождении его через молекулу

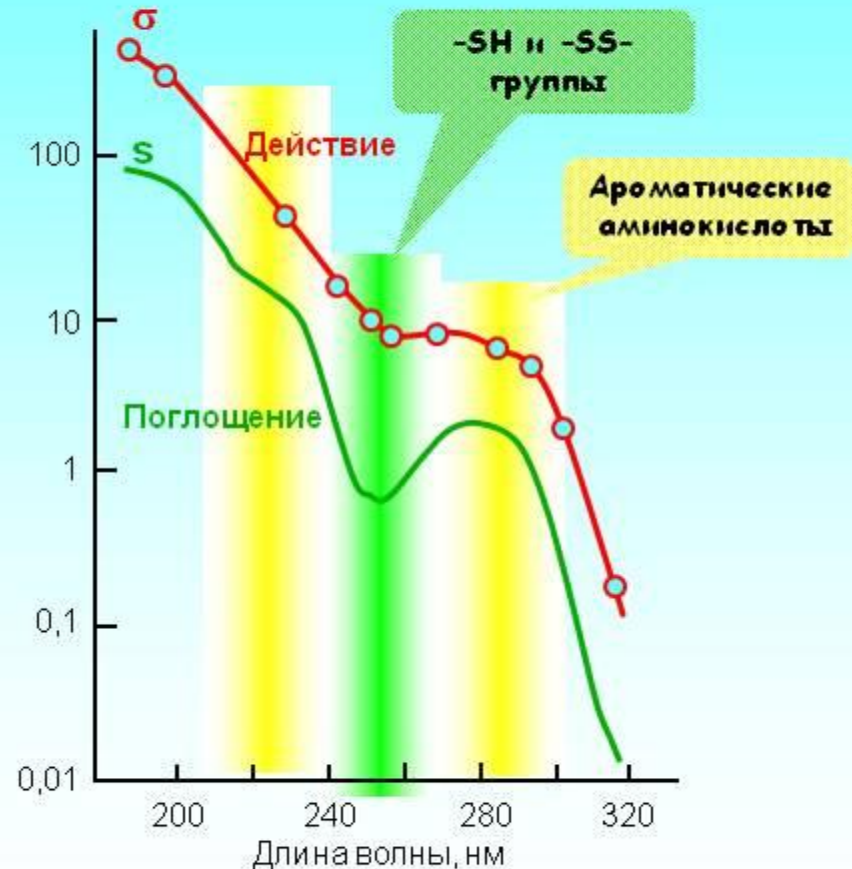
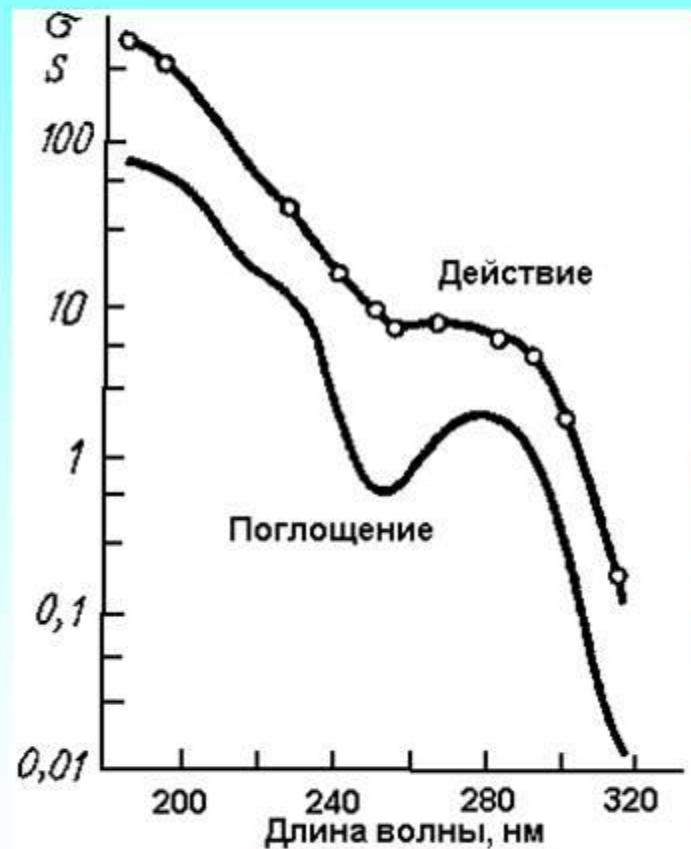
Физический смысл S – эффективное сечение молекулы, при попадании в которое происходит поглощение фотона данной длины волны.

Физический смысл квантового выхода фотохимической реакции

ϕ – отношение числа прореагировавших (химически измененных) молекул (n_1) к числу молекул, поглотивших фотоны (n_2): $\phi = n_1/n_2$.

ϕ Величина квантового выхода фотохимической реакции определяется отношением констант скорости фотохимической дезактивации электронно-возбужденного состояния к сумме констант скорости других процессов дезактивации: тепловая диссипация, испускание кванта люминесценции, фотохимическая реакция и образование фотопродукта, миграция энергии, переход молекулы в триплетное возбужденное состояние.

Спектры поглощения и спектры действия



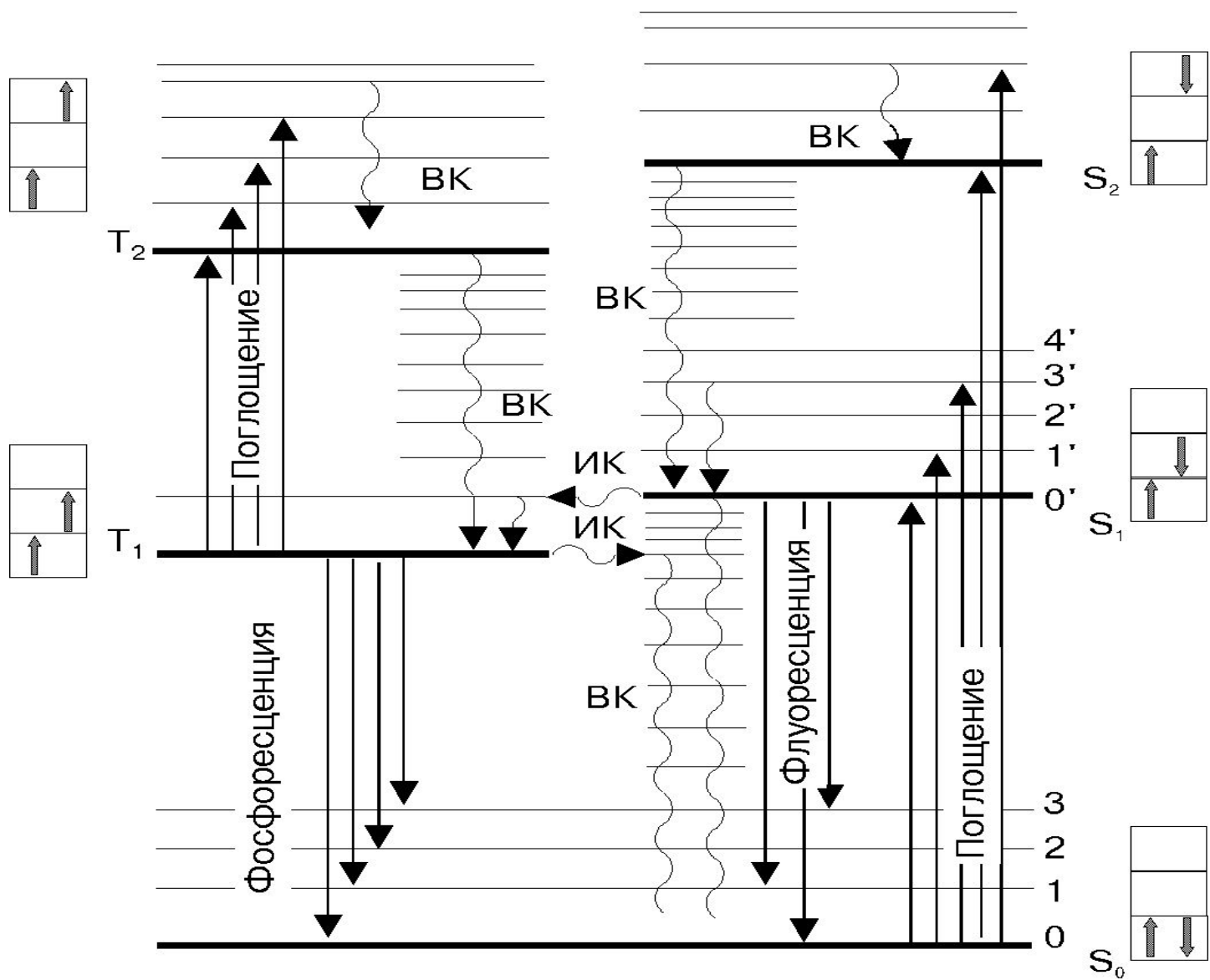
Инактивации трипсина под действием УФ-облучения

Люминесценция - это нетепловое свечение вещества, происходящее после поглощения им энергии возбуждения.

«Будем называть люминесценцией избыток светового над температурным излучением тела в том случае, если это избыточное излучение обладает конечной длительностью примерно 10^{-10} секунд и больше». С.И. Вавилов

По виду энергии возбуждения различают :

- фотолюминесценцию (возбуждение светом),
- радиолюминесценцию (возбуждение ионизирующей радиацией),
- электролюминесценцию (возбуждение электрическим полем),
- триболюминесценцию (возбуждение механическими колебаниями),
- хемилюминесценцию (возбуждение в результате химических реакций).



Электронные переходы в молекуле (схема Яблонского)

Интенсивность люминесценции ($I_{\text{л}}$) возрастает с увеличением интенсивности возбуждающего света (I_0), способности вещества поглощать энергию света и его способности испускать кванты люминесценции:

$$I_{\text{л}} = \varphi (I_0 - I) = I_0 \varphi (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

где I - интенсивность вышедшего из образца света;

φ - квантовый выход люминесценции, представляющий собой отношение числа излученных квантов к числу поглощенных квантов и рассчитываемый по формуле $\varphi = I_{\text{л}}/(I_0 - I)$;

ε - молярный коэффициент поглощения;

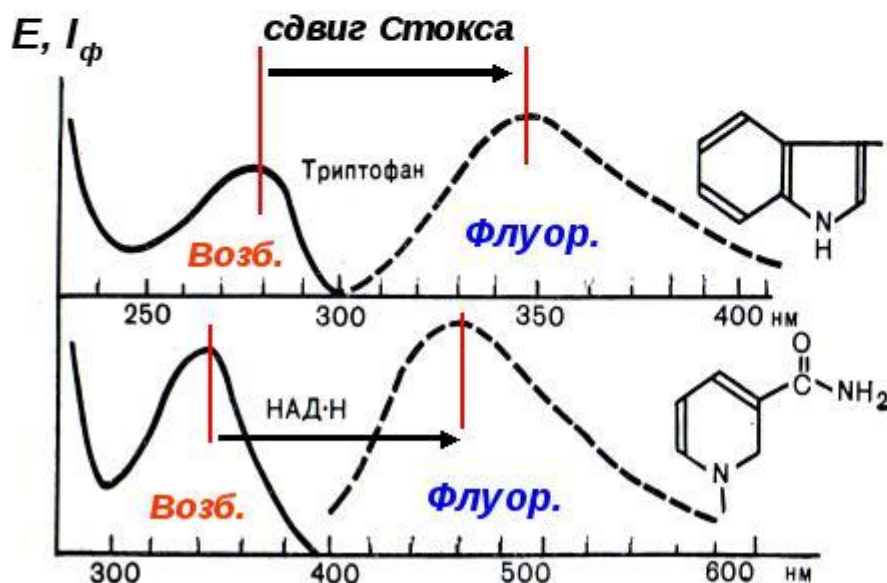
c - концентрация вещества;

l - толщина образца (длина оптического пути).

Спектры возбуждения и спектры флуоресценции

Спектр возбуждения - зависимость количества поглощенного света от длины волны (то же, что спектр поглощения).

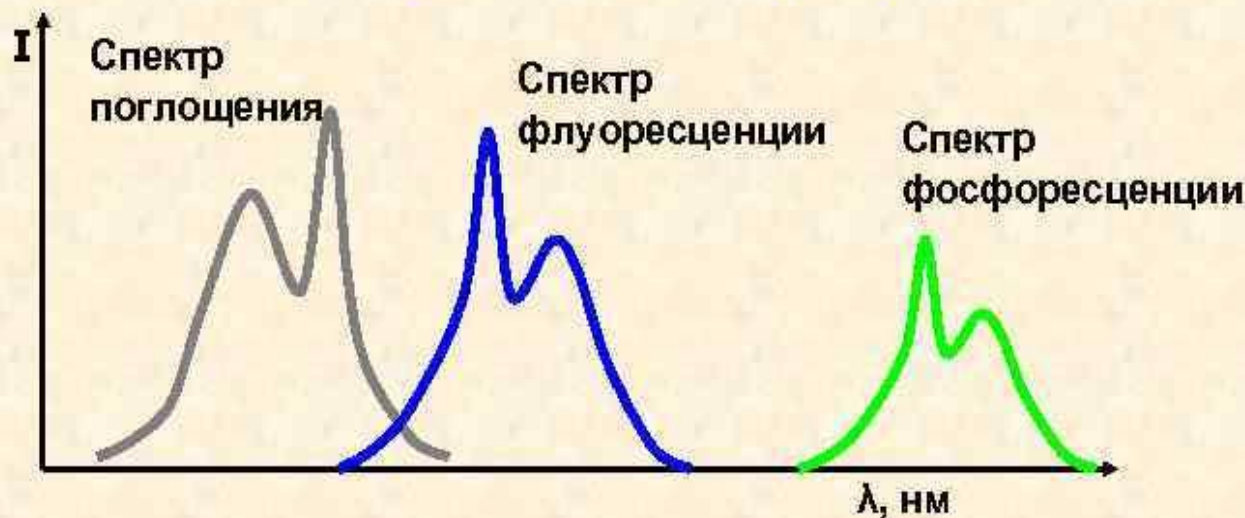
Спектр флуоресценции – интенсивность флуоресценции (I_{ϕ}), измер. при различных длинах волн.



Сдвиг Стокса – энергия кванта флуоресценции всегда меньше энергии кванта возбуждения –
- **тах. флуоресценции** сдвинут в длинноволновую область

Спектры флуоресценции сдвинуты в длинноволновую область по сравнению с длинноволновой полосой поглощения (**закон Стокса**)
Спектры флуоресценции зеркально-симметричны данной полосе поглощения (**правило В.Л. Лёвшина**).

Спектры люминесценции



По виду - широкополосные

Являются зеркальным отображением спектров поглощения, смещены в более длинноволновую область

правило Стокса–Ломмеля: $\lambda_{\text{испускания}} > \lambda_{\text{поглощения}}$

Явление зеркальной симметрии фиксируется экспериментально, однако полное зеркальное соответствие не наблюдается. Все отклонения связаны с молекулярными и межмолекулярными процессами, в том числе отличиями колебательных уровней молекул в основном и возбужденном электронном состояниях, перестройкой молекул

Форма спектра люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего света.

(правило М.Каши)

Квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны возбуждающего света.

(закон С.И. Вавилова)

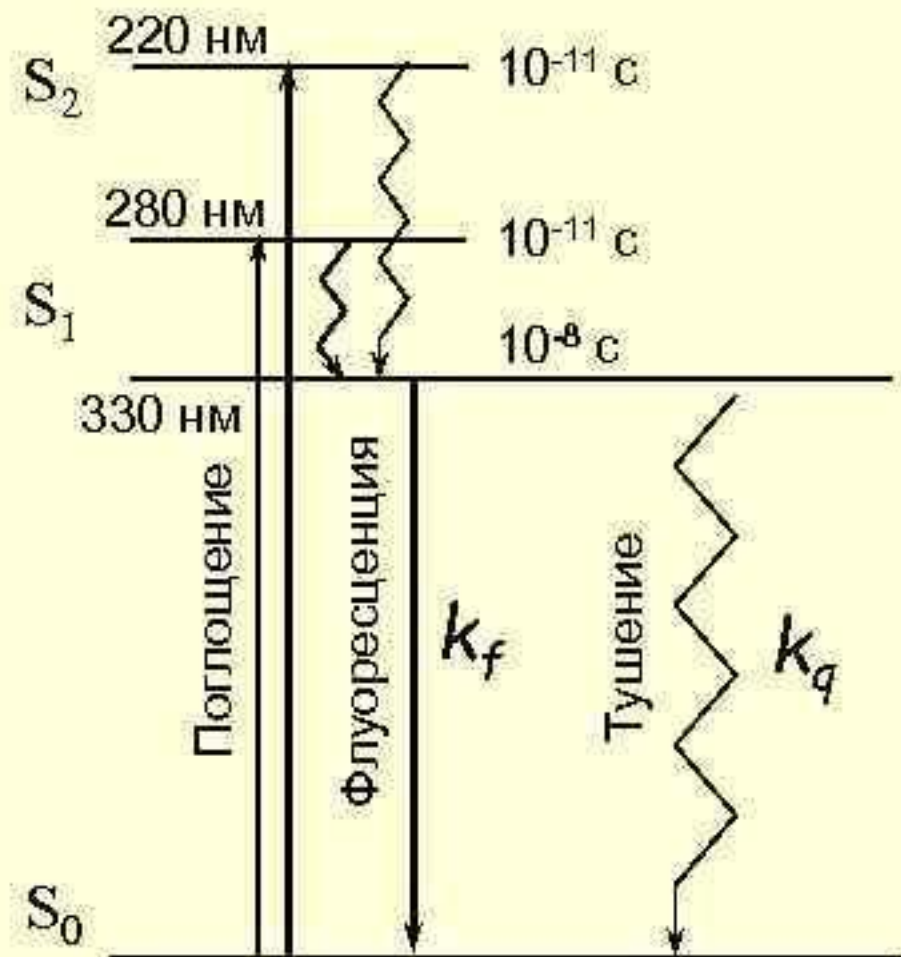
Закон Вавилова

Квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны возбуждения

Что такое квантовый выход (η)?:

$$\eta = \frac{\text{Число квантов флуоресценции}}{\text{Число поглощенных квантов}}$$

$$\eta = \frac{k_f}{k_f + k_q}$$



Закон Вавилова:

квантовый выход люминесценции не зависит от длины волны возбуждения люминесценции.

Это означает, что для каждого вещества квантовый выход фотолюминесценции постоянен в широкой области длин волн возбуждающего света и резко падает при длинах волн, превышающих ту, при которой наблюдается максимум спектра люминесценции

$$\varphi_{\text{л}} = \frac{\text{Число излученных квантов люминесценции}}{\text{Число поглощенных квантов}}$$

$$0 \leq \varphi_{\text{л}} \leq 1$$

Флуоресцентные зонды и метки

Это **люминофоры**, добавляемые к нелюминесцирующим веществам и связываемые с мембранами

Флуоресцентные зонды
(нековалентная связь с БМ)

это молекула, которая встраивается в структуру клетки, **не меняя химических связей**.

(Нековалентная связь с

Флуоресцентные метки
(химическая связь)

Это люминофоры, **ковалентно** связанные с какими-либо молекулами, то есть путем **образования химических связей**.

