Շ. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ
Կ. Ռ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ՀԻՄՈՒՆՔՆԵՐԸ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ
ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Շ. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ, Կ. Ռ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ՀԻՄՈՒՆՔՆԵՐԸ

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2017

ՀՏԴ 577.3(07)
ԳՄԴ 28.071g7
Մ 350

Հրատարակության է երաշխավորել
ԵՊՀ քիմիայի ֆակուլտետի
գիտական խորհուրդը

Շ. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ, Կ. Ռ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ
Մ 350 Մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիայի հիմունքները/ Շ. Ա. Մարգարյան, Կ. Ռ. Գրիգորյան: -Եր., ԵՊՀ հրատ., 2017, 132 էջ:

Այս ուսումնական ձեռնարկում ներկայացված են էլեկտրոնային կլանման և ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրաչափության հիմունքները, մեթոդները և կիրառության ոլորտները քիմիական և կենսաբանական համակարգերի համար: Այն նախատեսված է քիմիայի և կենսաբանության ֆակուլտետների ուսանողների համար, օգտակար կարող է լինել նաև այս ոլորտներում գիտական հետաքրքրություն ունեցող և հետազոտական աշխատանք իրականացնող ասպիրանտների և գիտաշխատողների համար:

ՀՏԴ 577.3(07)
ԳՄԴ 28.071g7

ISBN 978-5-8084-2195-0

© ԵՊՀ հրատ., 2017
© Մարգարյան Շ., Գրիգորյան Կ., 2017

ՆԱԽԱԲԱՆ

Մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիայի կարևորությունը բնագիտության ասպարեզում պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ այն արդյունավետ կիրառվում է ոչ միայն պարզ քիմիական համակարգերի, այլ նաև բարդ կենսաբանական համակարգերի ուսումնասիրման համար: Այն հզոր միջոց է մոլեկուլային մակարդակով նյութի, ինչպես նաև կենդանի համակարգերի կառուցվածքի և դինամիկայի ուսումնասիրման համար: Այդ կապակցությամբ տեղին է նշել, որ Երևանի պետական համալսարանի ֆիզիկական քիմիայի ամբիոնի գիտական ուղղությունը ընդգրկում է մոլեկուլային փոխազդեցությունների ուսումնասիրությունը կենսաբանական նշանակություն ունեցող համակարգերում, որտեղ իր ուրույն մասնաբաժինն ունի ֆլուորեսցենցիայի մեթոդը: Դեռևս 2000 թ. սկսած Երևանի պետական համալսարանի ֆիզիկական քիմիայի ամբիոնը, շնորհիվ միջազգային դրամաշնորհների, ձեռք է բերել ի թիվս շատ այլ սարքավորումների ֆլուորեսցենտային սպեկտրոֆոտոմետրը /Cary Eclipse (Varian) Fluorescence Spectrophotometer/, համակցված Cryostat Optistat^{DN} (Oxford Instruments) և անիզոտրոպիայի չափման Cary Eclipse Manual Polarizer կցորդով: Նշված սարքավորման առկայությունը հնարավորություն է ընձեռել նպատակային և ավելի արդյունավետ անցկացնելու մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիային վերաբերող դասընթացներն ինչպես բակալավրիատում, այնպես էլ մագիստրատուրայում: Ավելին, ֆլուորեսցենցիայի չափումների հիման վրա ստացված արդյունքներն ընդգրկվել են ոչ միայն ուսանողների ավարտական աշխատանքներում և մագիստրոսական թեզերում, ամ-

բիոնում իրականացված թեկնածուական ատենախոսություններում, այլ նաև միջազգային ճանաչում ունեցող գիտական ամսագրերում:

Հայերեն լեզվով «Մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիային հիմունքները» ուսումնական ձեռնարկի ստեղծման անհրաժեշտությունը պայմանավորված է մայրենի լեզվով այս ասպարեզին վերաբերող դասագրքերի բացակայությամբ, որը բավականին բարդություններ է առաջացնում ուսանողների մոտ դասավանդվող նյութի տեսական դրույթների յուրացման, լաբորատոր աշխատանքների անցկացման, ինքնուրույն գիտական աշխատանքի կազմակերպման համար:

Ձեռնարկը կազմված է տասը գլխից և հավելվածներից: Առաջին գլխում, որը նաև իբրև ներածություն է ծառայում, տրվում են ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի ընդհանուր հատկանիշները: Երկրորդ գլխում ներկայացված են լույսի կլանմանը առնչվող հասկացությունները: Քանի որ Ծ. Մարգարյանի «Մոլեկուլային սպեկտրոսկոպիա» ուսումնական ձեռնարկը 2003 թ. իր մեջ ներ է առել էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիայի բաժինը, այդ պատճառով այս գլխում այն ներկայացված է համառոտ՝ անդրադառնալով հատկապես այն դրույթներին, որոնք կարևոր են նաև ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրոսկոպիայի համար: Երրորդ գլխում քննարկված են ֆլուորեսցենցիայի հիմնական բնութագրերը և գրգռված մոլեկուլի ապագրգռման հնարավոր այլ պրոցեսները: Չորրորդ գլուխը վերաբերում է մոլեկուլի կառուցվածքի և ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրի միջև եղած կապին, իսկ հինգերորդը՝ ֆլուորեսցենտային անիզոտրոպիային և նրա կիրառման ոլորտներին: 6-րդ և 7-րդ գլուխներում ներկայացված է միջմոլեկուլային փոխազդեցությունների և լուծիչի բևեռայնության ազդեցությունը ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի վրա: 8-րդ գլխում քննարկված է ֆլուորեսցենցիայի կիրառությունը կենսաբանական համակարգերի ուսումնասիրություններում՝ առանձին օրինակների ներկայացմամբ: 9-րդ գլխում նկարագրված է ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի գրանցման տեխնիկան, իսկ 10-րդ գլխում ներկա-

յացված են լաբորատոր աշխատանքների առաջադրանքները և վարժությունները:

Ձեռնարկում տեղ են գտել նաև հեղինակների ղեկավարած գիտական խմբերի կողմից վերջին տարիներին ստացված որոշ էքսպերիմենտալ արդյունքներ: Հավելվածներում բերված են կարևոր հաստատունների արժեքները, միավորները:

Ձեռնարկում պարունակած բուն նյութի յուրացումը, ինչպես նաև խնդիրների լուծումը և գործնական աշխատանքների կատարումը կնպաստի այն գիտելիքների և փորձի ձեռք բերմանը, որոնք անհրաժեշտ են գիտահետազոտական աշխատանքներում մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիայի մեթոդները կիրառելու համար:

ԳԼՈՒԽ ԱՌԱՋԻՆ

ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ

1.1. Ֆլուորեսցենցիան և գրգռված մոլեկուլների ապագրգռումը

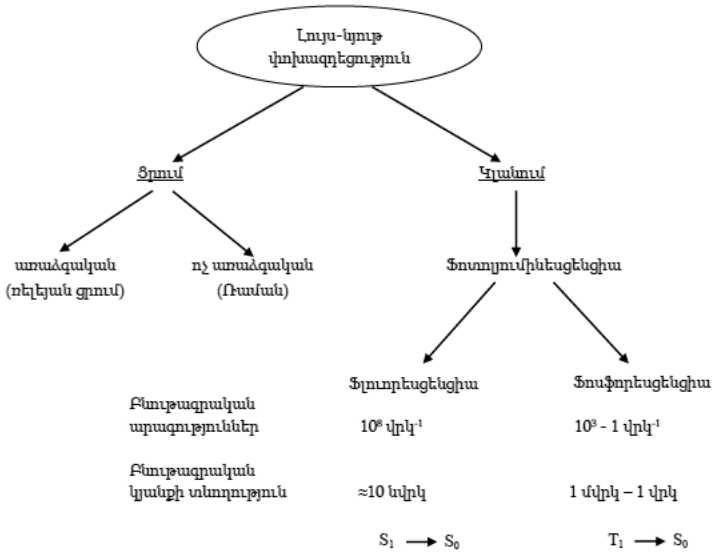
Ֆլուորեսցենց (կամ ֆլուորեսցենտային) սպեկտրոսկոպիան, ինչպես և էլեկտրոնային կլանման սպեկտրոսկոպիան, գործ ունի ատոմական կամ մոլեկուլային համակարգերում էլեկտրոնային էներգետիկ մակարդակների միջև իրագործվող անցումների հետ: Թերևս, միանգամից պետք է նշել, որ էլեկտրոնային կլանման սպեկտրում գրանցվող ազդանշանը պայմանավորված է էլեկտրամագնիսական ճառագայթման (տեսանելի կամ ուլտրամանուշակագույն) կլանմամբ, որն ուղեկցվում է էլեկտրոնային անցումով ցածր էներգետիկ մակարդակից ավելի բարձրին, մինչդեռ ֆլուորեսցենց սպեկտրոսկոպիան առնչվում է առաքված էլեկտրամագնիսական ճառագայթման գրանցման հետ, երբ իրագործվում է ապագրգռումը՝ այսինքն անցումը էլեկտրոնային գրգռված վիճակից՝ հիմնականին: Ընդհանուր առմամբ, էլեկտրոնային գրգռված վիճակներից (գոյացումներից) ուլտրամանուշակագույն և տեսանելի ֆոտոնների առաքումը անվանվում է լյումինեսցենցիա, որին և պատկանում է ֆլուորեսցենցիան: Լյումինեսցենցիայի տարատեսակները կարելի է դասակարգել՝ ելնելով գրգռման եղանակից (տես աղյուսակ 1):

Աղյուսակ 1

Լյումինեսցենցիայի հիմնական տարատեսակները

Երևույթը	**Գրգռման եղանակը**
Ֆոտոլյումինեսցենցիա. Ֆլուորեսցենցիա-կարճատև լուսարձակում Ֆոսֆորեսցենցիա-տևական լուսարձակում	Լույսի (ֆոտոնի) կլանում
Ռադիոլյումինեսցենցիա	Իոնիզացնող ճառագայթում (ռենտգենյան, α, β ,γ)
Էլեկտրալյումինեսցենցիա	Էլեկտրական դաշտ
Իոնալյումինեսցենցիա	Իոնների հարվածներ
Քեմիլյումինեսցենցիա	Քիմիական պրոցես (օրինակ, օքսիդացում)
Բիոլյումինեսցենցիա	Կենսաբանական պրոցես

Ընդհանուր առմամբ լույս – նյութ փոխազդեցությունից առաջացած հնարավոր ֆիզիկական էֆեկտները պատկերված են նկ.1.1-ում:



Նկ. 1.1 Լույս-նյութ փոխազդեցությունը և ֆլուորեսցենցիայի ու ֆոսֆորեսցենցիայի ժամանակային բնութագրերը:

Ֆլուորեսցենցող միացությունները կարող են լինել տարբեր տեսակի.

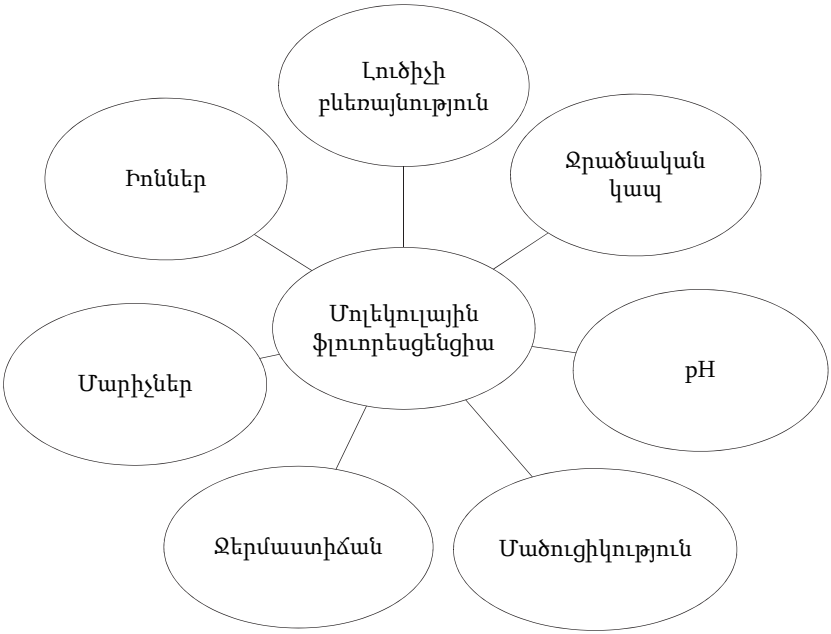
- *օրգանական նյութեր* – արոմատիկ ածխաջրածիններ (նավթալին, անտրացեն, ֆենանտրեն, պիրեն, պերիլեն և այլն), ֆլուորեսցեին, ռոդամին, պոլիեններ, դիֆենիլպոլիեններ, ամինոթթուներ (տրիպտոֆան, թիրոզին, ֆենիլալանին) և այլն;
- *անօրգանական նյութեր* – լանթանիդ իոններ (օր., Eu^{3+}, Tb^{3+}), ուրանիլ իոն (UO_2^+), հավելույթներ պարունակող ապակիներ (օր.՝ Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag պարունակող), բյուրեղներ (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, GaS, GaP, Al_2O_3/Cr^{3+}) և այլն;

- *մետաղօրգանական նյութեր* – ռութենիումի կոմպլեքսներ (օր., $Ru(biPy)_3$), լանթանիդ իոններով կոմպլեքսներ, ֆլուորոգենային խելատավորող ագենտներով կոմպլեքսներ (օր., 8-հիդրոքսիքինոլին) և այլն:

Ֆլուորեսցենցիան և ֆոսֆորեսցենցիան լյումինեսցենցիայի մասնավոր դեպքերն են, երբ գրգռման եղանակը ֆոտոնի կլանումն է, որի հետևանքով կլանող մասնիկները անցնում են էլեկտրոնային գրգռված վիճակին: Սրան հաջորդող ապագրգռումը ֆոտոնների առաքումով ընդհանուր անունով կոչվում է ֆոտոլյումինեսցենցիա:

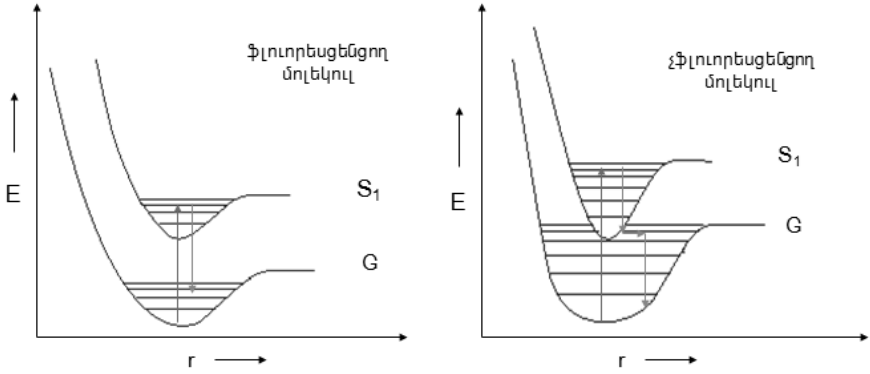
Կարևոր է նշել, որ ճառագայթային ապագրգռումը միակ ճանապարհը չէ, կան այլ ապագրգռման հնարավորություններ՝ ներքին կոնվերսիա – անմիջական վերադարձը հիմնական վիճակին, առանց ֆլուորեսցենտային առաքման, ներհամակարգային անցում, որին հաջորդում է հնարավոր ֆոսֆորեսցենտային առաքումը, ներմոլեկուլային լիցքի տեղափոխումը և կոնֆորմացիոն փոփոխությունը: Սրանց մասին ավելի մանրամասն կխոսվի հետագայում, երբ կքննարկվի Յաբլոնսկու դիագրամը, որտեղ և համառոտ կանդրադառնանք ֆոսֆորեսցենցիայի երևույթին:

Բացի դրանից կարևորվում է տարբեր գործոնների ազդեցությունը ֆլուորեսցենտային առաքման վրա (նկ. 1.2):



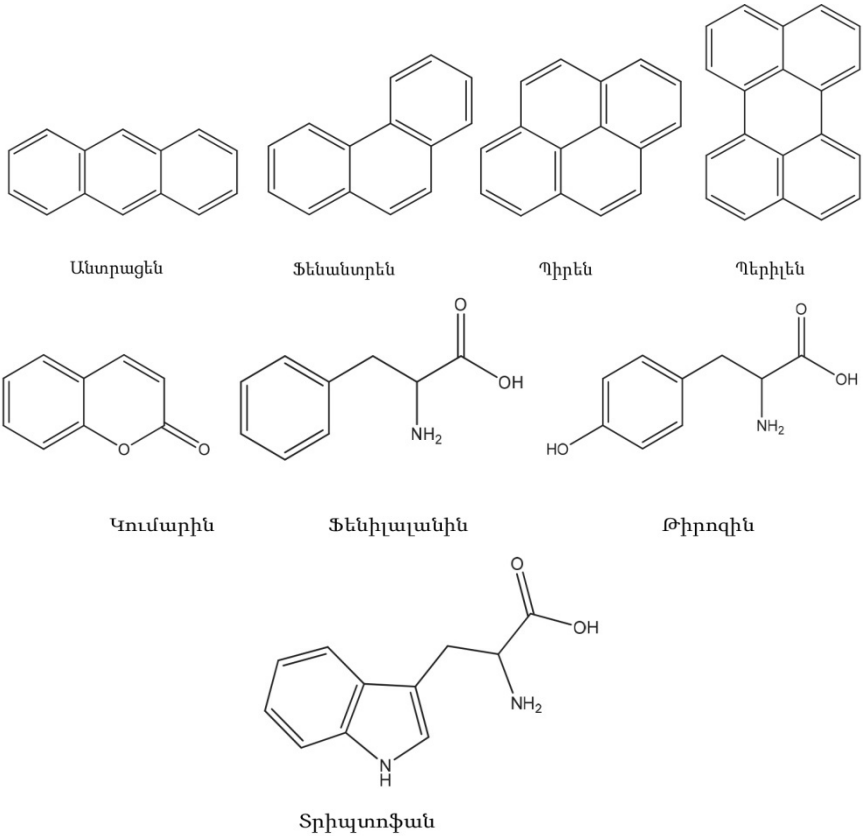
Նկ. 1.2 Ֆլուորեսցենտային առաքման վրա ազդող հիմնական գործոնները:

Ինչպես ամեն մի ֆիզիկական մեթոդ ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիան ևս ունի իր հնարավորությունները և սահմանափակումները՝ կապված համակարգի և խնդրի ընտրության հետ: Նախ անհրաժեշտ է նշել, որ մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիա կարող են ցուցաբերել «կոշտ» կառուցվածք ունեցող մոլեկուլները, ինչպիսիք են արոմատիկ և հատկապես զուգորդված միացությունները: Պատճառը կայանում է նրանում, որ այդ դեպքում գրգռված էլեկտրոնային մակարդակում գտնվող տատանողական մակարդակները չեն ընդհանրանում հիմնական էլեկտրոնային մակարդակում գտնվող տատանողական մակարդակների հետ, որը տեղի ունի ոչ արոմատիկ «ճկուն» մոլեկուլների դեպքում (նկ. 1.3):



Նկ. 1.3 Ֆլուորեսցենցող և չֆլուորեսցենցող մոլեկուլների էներգետիկ մակարդակների գծապատկերը. G – հիմնական վիճակ, S_1 – գրգռված առաջին սինգլետ վիճակ:

Ներկայացնենք որոշ բնութագրական ֆլուորեսցենցող միացությունների կառուցվածքները: Նկ. 1.4-ում բերվածների մեջ են նաև ամինոթթուներից տրիպտոֆանը, թիրոզինը և ֆենիլալանինը: Սրանք հանդիսանում են բնական ֆլուորոֆորներ, որոնցից տրիպտոֆանը ամենաինտենսիվ ֆլուորեսցենցող ամինոթթուն է սպիտակուցներում:



Նկ. 1.4 Ֆլուորեսցենցող հատկություն ունեցող որոշ կարևոր միացություններ:

Բայց և այնպես, հաճախ մակրոմոլեկուլների բնական ֆլուորեսցենցող հատկությունները բավարար չեն էքսպերիմենտալ լիարժեք տվյալներ ստանալու համար: Ահա այստեղ է, որ կարևորվում է ներմուծվող ֆլուորոֆորների (նշանակիրների) դերը, որոնց օգնությամբ և ստացվում են բավականին հարուստ և օգտակար տեղեկություններ:

Աղյուսակ 2-ում բերված են գիտական այն ոլորտները, որտեղ արդյունավետորեն կիրառվում է մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիան:

Աղյուսակ 2

Տարբեր ասպարեզներում ֆլուորեսցենցող նշանակիրների օգտագործմամբ ստացվող տեղեկություններ

Գիտական ասպարեզ	**Ստացվող տեղեկությունները**
Պոլիմերներ	Պոլիմերային շղթաների դինամիկա, ֆազերի բաժանում, մասնիկների դիֆուզիա պոլիմերային ցանցերում
Մակերեսներ	Կոլոիդ սիլիկագելի մակերևույթի բնույթը, մակերևութային բևեռայնություն և մոդիֆիկացիա
ՄԱՆ-երի լուծույթներ	ՄԿԿ-ի որոշում, ռեագենտների բաշխում, բաշխման գործակից, ՄԱՆ-երի ագրեգացիայի թվերը, ֆազային անցումներ, հավելանյութերի ազդեցություն
Կենսաբանական մեմբրաններ	Լիպիդ-սպիտակուց փոխազդեցություններ, համընթաց դիֆուզիա, կառուցվածքային փոփոխություններ, մեմբրանային պոտենցիալ, կոմպլեքսներ, սպիտակուցների տեղայնացում, կողմնային (լատերալ) կազմավորում և դինամիկա
Բշտիկներ	Երկշերտի բնութագրերը, միկրոմածուցիկություն, ֆազային անցումներ, հավելանյութերի ազդեցություն, ներքին pH, թափանցելիություն
Սպիտակուցներ	Դենատուրացիա, հեռավորություններ, կոնֆորմացիոն անցումներ
Նուկլեինաթթուներ	Շարժողականություն, լարման դինամիկա, պարույրի կառուցվածք
Կենդանի բջիջներ	Մեմբրանների, լիպիդների, սպիտակուցների, ԴՆԹ-ի, ՌՆԹ-ի և մակերեսային հակագեների պատկերում, ներբջջային pH, բջիջ-բջիջ, բջիջ-վիրուս փոխազդեցություններ, ֆերմենտների ակտիվություն, ցիտոտոքսիկ ակտիվություն

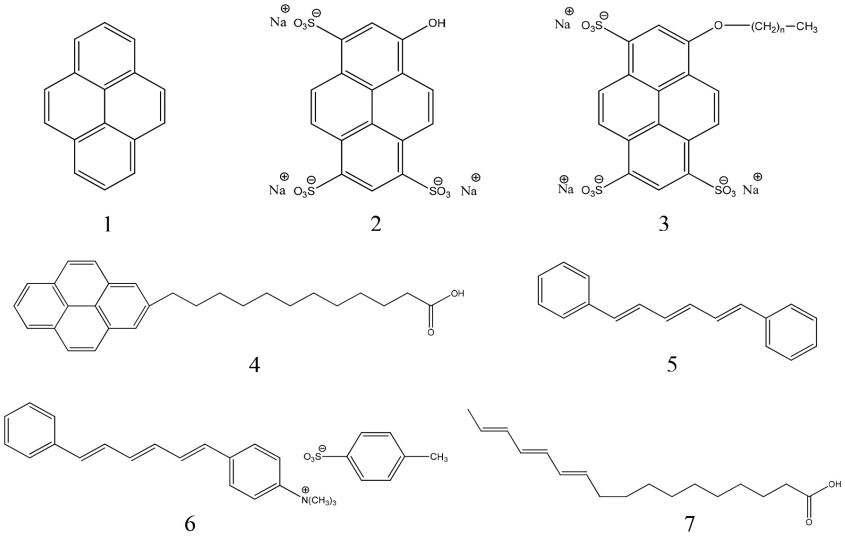
1.2. Ֆլուորեսցենտային նշանակիրներ

Ինչպես նշվեց վերևում, ֆլուորեսցենցող մոլեկուլները օգտագործվում են որպես նշանակիրներ՝ ուսումնասիրելու համար ոչ միայն պարզ քիմիական, այլ հատկապես բարդ կենսաբանական համակարգերը:

Գոյություն ունի նշանակիրների հետևյալ դասակարգումը՝ /ա/ ներքին, սեփական նշանակիրներ, /բ/ արտաքին, դրսից ներմուծվող և կովալենտային կապով միացվող նշանակիրներ և /գ/ արտաքին, դրսից ներմուծվող ասոցվող նշանակիրներ:

Իհարկե, ներքին, սեփական նշանակիրները իդեալական են, բայց նման օրինակները միայն մի քանիսն են, օրինակ՝ տրիպտոֆանը սպիտակուցում: Կովալենտային կապով կապված նշանակրի առավելությունն ասոցվածի նկատմամբ այն է, որ դրա տեղակայման վայրը հայտնի է: Բազմաթիվ են օրինակները, երբ նշանակիրները կովալենտային կապով կապված են մակերևութային ակտիվ նյութին (ՄԱՆ), պոլիմերային շղթային, ֆոսֆոլիպիդներին, սպիտակուցներին, պոլինուկլեոտիդներին և այլն:

Նկ. 1.5-ում բերված են որոշ կարևոր նշանակիրներ, որոնք բնութագրվում են հիդրոֆոբ, հիդրոֆիլ և ամֆիֆիլ հատկություններով: Այսպես օրինակ՝ հայտնի է, որ պիրենը գործում է որպես հիդրոֆոբ մարզի նշանակիր, այն զգայուն է բևեռայնության նկատմամբ: Ի հակադրություն պիրենի, պիրանինը շատ հիդրոֆիլ է և տեղայնանում է հիդրոֆիլային ջրային մարզում: Բացի դրանից, այն զգայուն է pH-ի նկատմամբ:



Նկ. 1.5 Հիդրոֆիլ, հիդրոֆոբ և ամֆիֆիլ նշանակիրներ. 1: պիրեն, 2: 8-հիդրոքսիպիրեն-1,3,6-եռծմբական թթվի եռնատրիումական աղ (պիրենին), 3: 8-ալկոքսիպիրեն-1,3,6-եռծմբական թթվի եռնատրիումական աղ, 4: 1-պիրենդոդեկանաթթու, 5: 1,6-դիֆենիլ-1,2,5-հեքսատրիեն (DPH), 6: 1-(4-տրիմեթիլամոնիումֆենիլ)-6-ֆենիլ-1,3,5-հեքսատրիեն, պ-տոլուոլ սուլֆոնատ (TMA-DPH), 7 – ցիս-պարինատաթթու:

Առանձին կարևոր ասպարեզ է մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիան անալիտիկ քիմիայում:

Ֆլուորեսցենտային անալիզի տարածվածությունը պայմանավորված է մեթոդի բարձր զգայունությամբ և ընտրողականությամբ: Երբ անալիզվող նյութը ֆլուորեսցենցում է, ապա կարելի իրագործել անմիջական ֆլուորոմետրիկ գրանցում՝ օգտագործելով սպեկտրոֆլուորոմետր, որն աշխատում է որոշակի գրգռման և առաքվող ալիքի երկարությունների տիրույթում: Նման դեպքերից են, օրինակ, արոմատիկ ածխաջրածինները (չմշակված յուղեր), սպիտակուցները

(կովի կաթում, արյան շիճուկում), որոշ դեղամիջոցներ (մորֆին), քլորոֆիլները և այլն:

Բայց, իհարկե, պետք է նկատի ունենալ, որ իոնների և մոլեկուլների գերակշռող մասը չեն ֆլուորեսցենցում և այդ պատճառով էլ կիրառվում են ոչ անմիջական մեթոդներ՝

- ածանցվող մեթոդ. հիմքում ընկած է անալիզվող նյութի ռեակցիան մի որևէ ելանյութի հետ, որի հետևանքով առաջանում է ֆլուորեսցենցող միացություն
- ֆլուորեսցենցող կոմպլեքսի առաջացում. սա իոնների և մոլեկուլների հայտնաբերման հիմնական եղանակն է
- ֆլուորեսցենցիայի մարում, որն արդյունք է անալիզվող նյութի և ֆլուորեսցենցող միացության փոխազդեցության: Մասնավորապես, այս մեթոդը զգայուն է գազերի հայտնաբերման համար, օրինակ՝ ջրում կամ արյան մեջ լուծված թթվածնի, SO_2, H_2S, HCl և այլն:

ԳԼՈՒԽ ԵՐԿՐՈՐԴ

ՈՒԼՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ԵՎ ՏԵՍԱՆԵԼԻ ԼՈՒՅՍԻ ԿԼԱՆՈՒՄԸ. ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՅԻՆ ԱՆՑՈՒՄՆԵՐԻ ԴԱՍԱԿԱՐԳՈՒՄԸ ԲԱԶՄԱՏՈՄ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐՈՒՄ

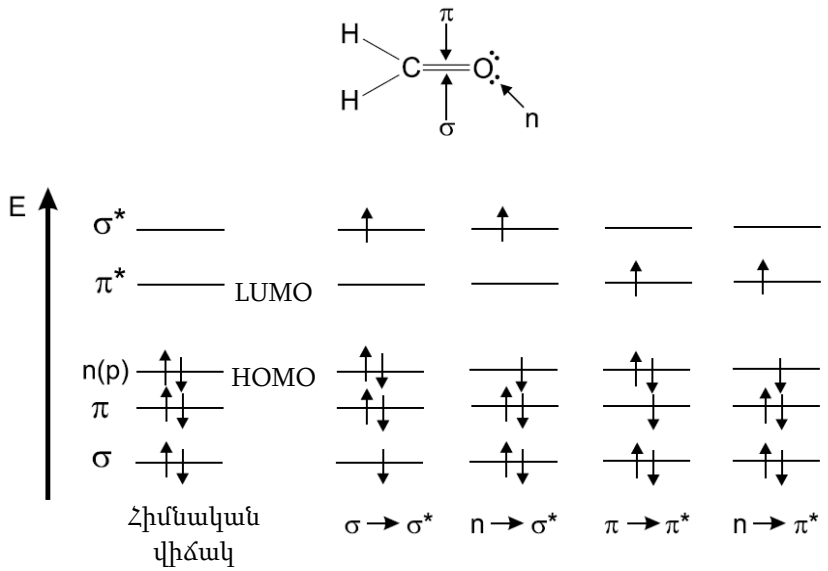
Մոլեկուլային ֆլուորեսցենցիայի երևույթը ընդհանուր առմամբ առնչվում է մոլեկուլում իրագործվող էլեկտրոնային անցումների հետ: Նշենք, որ էլեկտրոնային անցումը հետևանք է ֆոտոնի կլանումով պայմանավորված էլեկտրոնի անցմամբ՝ հիմնական վիճակում գտնվող մոլեկուլի օրբիտալից դեպի չլրացված օրբիտալ: Այդ տեսակետից իմաստավորվում է սկզբից քննարկել (վերհիշել) մոլեկուլում առկա տարբեր տեսակի օրբիտալները:

Պարզ կապ առաջացնող σ-օրբիտալ կարող է ձևավորվել երկու ատոմային s - օրբիտալներից, մեկ s - և մեկ p - օրբիտալից, կամ էլ երկու p - օրբիտալներից, որոնք ունեն սիմետրիայի նույն առանցքները: Այս ձևով առաջացած կապը կոչվում է σ կապ: π - օրբիտալը ձևավորվում է կողմնային վերադրվող երկու p - օրբիտալից: Առաջացող կապը կոչվում է π կապ: Օրինակ, էթիլենում ($CH_2=CH_2$) ածխածնի երկու ատոմները իրար միացած են մեկ σ և մեկ π կապով: Համապատասխան էներգիայով ֆոտոնի կլանման դեպքում կարող է π էլեկտրոններից մեկն անցնել խարխլող π^* օրբիտալ: Այս անցումը կոչվում է $\pi \rightarrow \pi^*$: Առավելագույն էներգիան պահանջվում է σ էլեկտրոնների գրգռման համար, քանի որ σ կապը համեմատաբար ավելի ամուր կապ է, ուստի $\sigma \rightarrow \sigma^*$ անցումը իրականանում է հեռու ՈՒՄ մարզում: Անհամեմատ փոքր էներգիաներ պահանջում են $\pi \rightarrow \pi^*$ անցումները, որոնք հատուկ են չհագեցած միացություններին

և ընկած են մոտիկ ՈՒՄ և տեսանելի մարզերում: Մոլեկուլը կարող է ունենալ նաև չկապակցող էլեկտրոններ՝տեղակայված հետերոատոմում, ինչպիսիք են, օրինակ, թթվածինը կամ ազոտը: Նման մոլեկուլային օրբիտալները կոչվում են n - օրբիտալներ: Չկապակցող էլեկտրոնի անցումը խարխլող օրբիտալ հնարավոր է և նման անցումը ներկայացվում է որպես $n \rightarrow \pi^*$ անցում (օրինակ, կետոններում): Ըստ էներգիաների աճման այս էլեկտրոնային անցումները տրվում են հետևյալ շարքով՝

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*:$$

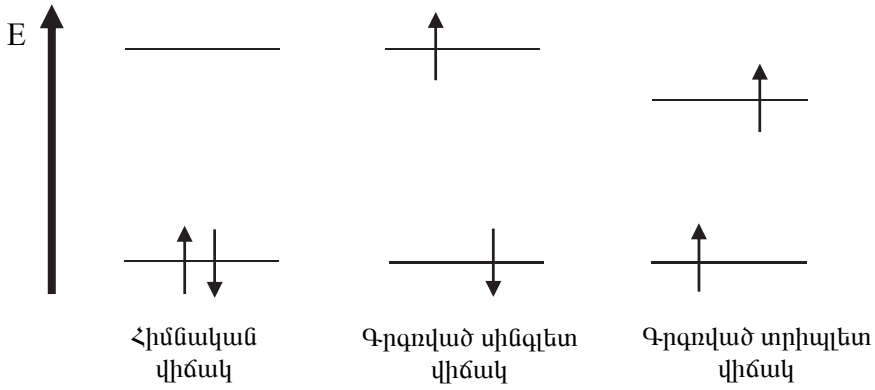
Որպես դասական օրինակ, որն ընդգրկում է վերը նշված բոլոր անցումները ընդունված է դիտարկել ֆորմալդեհիդի մոլեկուլը: Նկ. 2.1-ում բերված են բոլոր հնարավոր անցումները:



Նկ. 2.1 Ֆորմալդեհիդի մոլեկուլային օրբիտալների էներգետիկ մակարդակները (ԲԼՄՕ (HOMO) – բարձրագույն լրացված մոլեկուլային օրբիտալ, ՑՉՄՕ (LUMO) – ցածրագույն չլրացված մոլեկուլային օրբիտալ) և հնարավոր էլեկտրոնային անցումները:

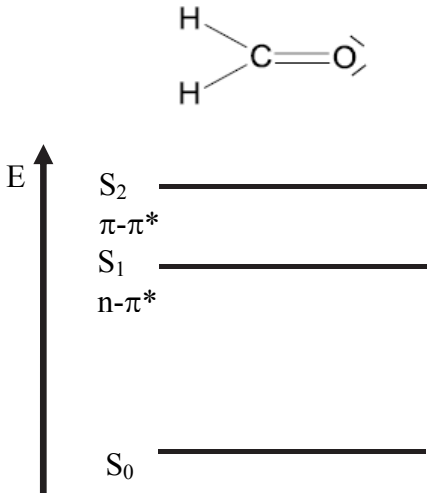
Ինչպես կլանման, այնպես էլ ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայում կարևորվում են երկու տիպի օրբիտալներ՝ բարձրագույն լրացված մոլեկուլային օրբիտալներ և ցածրագույն չլրացված մոլեկուլային օրբիտալներ: Առաջինի համար ընդունված է HOMO հապավումը, որի անգլերեն նշանակումն է Highest Occupied Molecular Orbitals, իսկ երկրորդի համար՝ LUMO հապավումը՝ Lowest Unoccupied Molecular Orbitals: Ֆորմալդեհիդի դեպքում HOMO-ն *n* օրբիտալն է, իսկ LUMO-ն՝ π^* օրբիտալը (տե՛ս նկ. 2.1):

Ընդհանուր առմամբ, մոլեկուլի հիմնական վիճակին պատկանող հակառակ սպինով երկու էլեկտրոններից մեկի անցումը գրգռված վիճակին կարող է իրագործվել երկու ճանապարհով՝ /ա/ առանց սպինի փոփոխման, այնպես, որ ամբողջական սպինային քվանտային թիվը դարձյալ մնում է հավասար զրոյի (S=0) և, հետևաբար, ինչպես հիմնական, այնպես էլ գրգռված վիճակների մուլտիպլետությունը հավասար է մեկի՝ համաձայն M = 2S+1 բանաձևի, և /բ/ սպինի շրջմամբ, որի արդյունքում կունենանք տրիպլետ գրգռված վիճակ (նկ. 2.2), քանի որ S=1 և, հետևաբար, M=3: Առաջին իրավիճակը թե հիմնական, թե գրգռված անվանվում է սինգլետ վիճակ: Այն սովորաբար նշանակվում է S_0՝ հիմնական վիճակի համար, և S_1, S_2 …՝ գրգռված վիճակների համար: Իսկ համապատասխան անցումն էլ կոչվում է սինգլետ-սինգլետ անցում (նկ. 2.2):



Նկ. 2.2 Հիմնական, գրգռված սինգլետ և տրիպլետ վիճակները:

Ֆորմալդեհիդի մոլեկուլում կապակցող և չկապակցող օրբիտալները տեղայնացված են ատոմների զույգերի միջև և այս դեպքում առանձնացված դիտարկվում են միակ կապի σ օրբիտալները և մեկուսացված կրկնակի կապի π օրբիտալները: Մինչդեռ, անհրաժեշտ է ընդգծել, որ զուգորդված համակարգերում, ինչպես օրինակ բենզոլը և բութադիենն են, իրագործվում է π օրբիտալների վերածածկում և π էլեկտրոնային համակարգը դիտարկվում է σ կապերից անկախ (նկ. 2.3):



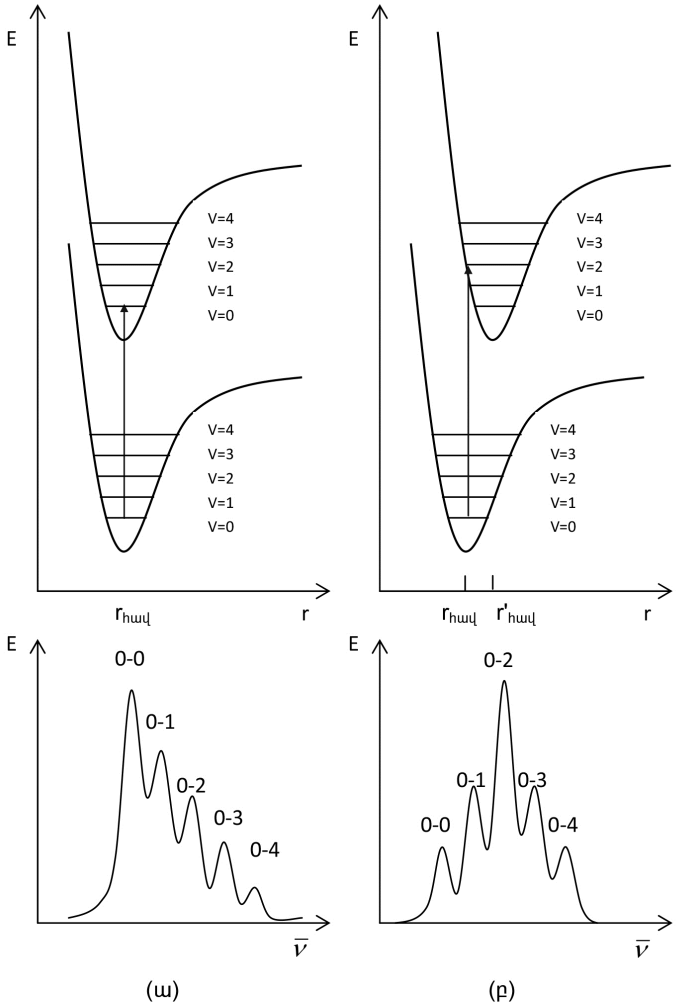
Նկ. 2.3 Սինգլետ հիմնական և գրգռված վիճակները ֆորմալդեհիդի օրինակով:

Հագեցած օրգանական մոլեկուլներում, ինչպիսիք են ալկանները, էլեկտրոնային անցումները $\sigma \rightarrow \sigma^*$ տիպի են: Արոմատիկ մոլեկուլներում և միացություններում, որոնք պարունակում են =C=C= և =C=O խմբեր, իրականանում են նաև $\pi \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$ և $n \rightarrow \pi^*$ անցումներ: $\sigma \rightarrow \pi^*$ և $n \rightarrow \pi^*$ անցումները թույլ անցումներ են, քանի որ դրանք արգելված են ըստ սիմետրիայի: $n \rightarrow \pi^*$ անցումները $\pi \rightarrow \pi^*$ անցումներից տարբերվում են առաջին հերթին իրենց ինտենսիվությամբ: Եթե կլանման մոլային գործակիցը՝ $\varepsilon(\lambda)$-ն, $\pi \rightarrow \pi^*$ թույլատրելի անցումների համար 10 000 և ավելին է, իսկ արգելվածների համար 200-ից մինչև մի քանի հազար, ապա $n \rightarrow \pi^*$ անցումների համար բնութագրական են 5 - 1000 արժեքները:

Քանի որ, ինչպես ֆոտոնի կլանման, այնպես էլ առաքման դեպքում գործ ունենք էլեկտրոնային անցման հետ, որտեղ նաև դիտարկվում են հիմնական և գրգռված վիճակների տատանողական մակարդակները, ապա տեղին է անդրադառնալ Ֆրանկ-Կոնդոնի սկզբուն-

քին: Համաձայն Ֆրանկ-Կոնդոնի սկզբունքի՝ էլեկտրոնի անցումը դեպի չկապակցող մոլեկուլային օրբիտալ տեղի է ունենում շատ արագ (10^{-15}վ) և միջուկների դիրքի փոփոխություն գործնականորեն չի իրագործվում:

Նախ նշենք, որ հիմնական էլեկտրոնային վիճակում մոլեկուլները գտնվում են v=0 ամենացածր տատանողական մակարդակի վրա: Կլանման շերտում գծերի ինտենսիվությունը և դրանց հարաբերությունը կորոշվեն հիմնական և գրգռված էլեկտրոնային վիճակներում տատանողական ալիքային ֆունկցիաների վերադրումով: Առաջին դեպքում, երբ հիմնական և գրգռված վիճակների միջմիջուկային հեռավորությունները նույնն են, 0-0 անցմանը համապատասխանող գիծը կլինի ամենաինտենսիվը, քանի որ այս անցումը ապահովում է տատանողական ալիքային ֆունկցիաների արդյունավետ վերածածկում (նկ. 2.4ա): Մյուս անցումներին 0-1, 0-2 և այլն, կհամապատասխանեն ավելի փոքր ինտենսիվության գծեր: Ըստ որում, այդ շարքում գծերի ինտենսիվությունը փոքրանում է, որովհետև հիմնական էլեկտրոնային վիճակի v=0 տատանողական ալիքային ֆունկցիայի վերադրումը գրգռված էլեկտրոնային վիճակի v=1, 2 և մյուս տատանողական մակարդակների հետ զգալի չէ (նկ. 2.4ա): Մյուս դեպքում (նկ. 2.4բ) գրգռված վիճակի պոտենցիալ էներգիայի կորը շեղված է դեպի ավելի մեծ միջմիջուկային հեռավորությունը: Դա այդպես է, քանի որ գրգռված վիճակում մոլեկուլի օրբիտալները, որպես կանոն, խարխլված են: Այստեղ արդեն ուղղահայաց Ֆրանկ-Կոնդոնյան անցումը լինում է ոչ թե 0-0, այլ՝ v=0-ից դեպի գրգռված վիճակի ավելի բարձր տատանողական մակարդակները, որի համարը կախված է ներքևի և վերևի վիճակների միջմիջուկային հեռավորությունների տարբերությունից (կամ պոտենցիալ կորերի միմյանց նկատմամբ ունեցած շեղումից): Նկ. 2.4բ-ում բերված օրինակում ուղղահայաց անցումը 0-2 է: Բնականաբար այն անցումները, որոնք տեղի են ունենում դեպի դրանից ավելի ցածր և բարձր տատանողական մակարդակները, լինում են ավելի քիչ ինտենսիվ:



Նկ. 2.4 Ֆրանկ-Կոնդոնի սկզբունքի ցուցադրումը և էլեկտրոնային անցման շերտի տատանողական կառուցվածքը տարբեր դեպքերի համար՝ (ա) հիմնական և գրգռված վիճակների միջմիջուկային հեռավորությունը նույնն է, (բ) գրգռված վիճակում միջմիջուկային հեռավորությունն ավելի մեծ է, քան հիմնական վիճակում: Ներքևում բերված են համապատասխան տատանողական կառուցվածքները:

Ասվածից հետևում է, որ բացի «մաքուր» էլեկտրոնային անցումից, որն ըստ էության 0-0 անցումն է, կան նաև մի քանի տատանողական անցումներ, որոնց ինտենսիվությունները կախված են պոտենցիալ էներգիայի կորերի հարաբերական դիրքից և տեսքից (նկ. 2.4ա, բ): Ակնհայտ է, որ ֆրանկ-կոնդոնյան «ուղղահայաց» անցումներն իրենց ազդեցությունը կունենան ինչպես կլանման, այնպես էլ ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրների տեսքի վրա: Թերևս, պետք է նկատի ունենալ, որ շատ դեպքերում ֆլուորոֆորի և կլանման, և առաքման սպեկտրներում տատանողական նուրբ կառուցվածքը ի հայտ չի գալիս՝ պայմանավորված այսպես կոչված հոմոգեն և ոչ հոմոգեն լայնացման էֆեկտներով:

2.1. Էլեկտրոնային անցումների ինտենսիվությունը, Լամբերտ-Բերի օրենքը, օսցիլյատորի ուժ

Սպեկտրալ գծի ինտենսիվությունը որոշող կարևորագույն գործոններից է նաև անցման հավանականությունը: Խիստ ասած, անցման հավանականության հաշվարկի համար անհրաժեշտ է իմանալ այն երկու վիճակների քվանտամեխանիկական ալիքային ֆունկցիաները, որոնց միջև տեղի է ունենում անցումը: Պարզելու համար, թե տվյալ անցումը արգելված է կամ թույլատրելի, ավելի հաճախ օգտվում են ընտրության կանոններից: Այդ կանոնները ձևակերպվել են որակական դատողությունների հիման վրա: Դրանք կներկայացվեն համապատասխան սպեկտրալ մարզերը (մեթոդները) քննարկելիս: Սպեկտրալ գծի ինտենսիվությունը կախված է սպեկտրը պայմանավորող նյութի կոնցենտրացիայից և նմուշի միջով անցնող լույսի ճանապարհից: Ընկնող և անցնող լույսերի ինտենսիվությունների միջև գոյություն ունեցող քանակական կապը տրվում է Լամբերտ-Բերի հայտնի օրենքով՝

$$\lg\frac{I_0}{I} = \varepsilon cl \quad (2.1),$$

որտեղ I-ն՝անցնող լույսի, I_0-ն ընկնող կամ սկզբնական լույսի ինտենսիվություններն են, c-ն նմուշում լույս կլանող նյութի կոնցենտրացիան է, l-ը՝ ճառագայթի անցման ճանապարհը:

$$D = \lg\frac{I_0}{I} \quad (2.2)$$

և կոչվում է օպտիկական խտություն: Որոշ դեպքերում (հատկապես ինֆրակարմիր սպեկտրոսկոպիայում) օգտագործվում է բացթողումը (նշանակվում է T-ով, անգլերեն Transmission բառի սկզբնատառով), որը որոշվում է

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.3):$$

հարաբերությամբ: (2.1)-(2.3) հավասարումներից հետևում է՝

$$-\lg T = D = \varepsilon cl \quad (2.4):$$

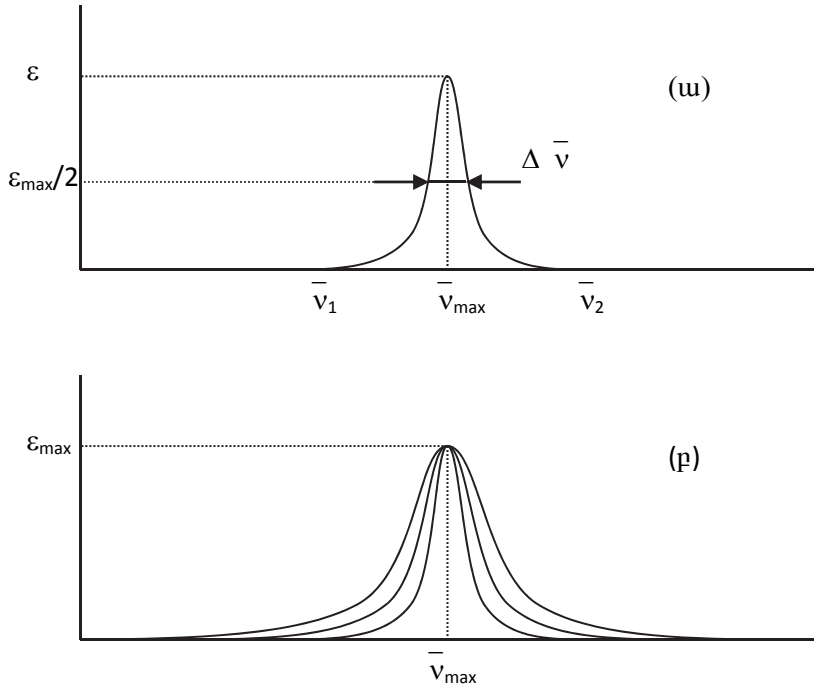
Քանի որ I-ն չի կարող մեծ լինել I_0-ից, ուստի՝ $T < 1$ և բացթողման տոկոսը կլինի $I/I_0 \times 100$: ε-ը էքստինկցիայի կամ կլանման մոլային գործակիցն է, որը բնութագրում է անցման տեսակը (էլեկտրոնային, տատանողական և այլն): ε-ի արժեքը կապված է անցման հավանականության հետ՝ անցման մեծ հավանականությանը համապատասխանում է ε-ի մեծ արժեք և հակառակը:

Այստեղ ևս մեկ անգամ Լամբերտ-Բերի օրենքի քննարկման կարևորությունը պայմանավորված է նաև այն հանգամանքով, որ ֆլուորեսցենցիայի չափումներին նախորդում է ֆլուորոֆորի կլանման սպեկտրի գրանցումը՝ նմուշի կոնցենտրացիայի տիրույթը պարզելու, գրգռման ալիքի երկարությունը և սպեկտրի գրանցման օպտիմալ պայմանները որոշակի դարձնելու համար (տե՛ս էքսպերիմենտալ մաս): Լամբերտ - Բերի ուղղագծային օրենքից շեղումները կարող են պայմանավորված լինել նյութի բարձր կոնցենտրացիաների

դեպքում ագրեգատացման երևույթների, կամ կլանող այլ նյութի առկայությամբ: Սովորաբար, ε-ը որոշվում է կլանման մաքսիմումի՝ λ-ի համար, քանի որ այդ ալիքի երկարության դեպքում է, որ մոլեկուլը կլանում է մաքսիմալ չափով: ε-ը կարող է ունենալ 5-100000 արժեքները՝ կախված էլեկտրոնային անցման տիպից. $\pi \rightarrow \pi^*$ անցման դեպքում կլանման մոլային գործակիցը կարող է ընդունել 500 - 100000, իսկ $n \rightarrow \pi^*$անցման դեպքում 5 - 1000 արժեքները:

ε-ի հետ է առնչվում օսցիլյատորի ուժ հասկացությունը:

Ինչպես արդեն նշվել է, նմուշի միջով անցնող և ընկնող լույսի ինտենսիվությունների կապը տրվում է Լամբերտ-Բերի օրենքով (2.1): Հիշյալ հավասարումից հետևում է, որ ε-ի չափողականությունը լ·մոլ$^{-1}$·սմ$^{-1}$ է: Սովորաբար կլանման ունակությունը բնութագրելու համար վերցվում է սպեկտրալ շերտի մաքսիմումին համապատասխանող արժեքը՝ ε_{max} (նկ. 2.5ա):



Նկ. 2.5. Կլանման շերտի տեսքը ε - $\bar{\nu}$ կոորդինատներով:

Բայց ինչպես երևում է նկ. 2.5բ-ից, ε_{max}-ը ոչ միշտ կարող է հանդիսանալ կլանման ունակության քանակական չափանիշ: Միևնույն ε_{max}-ի արժեք ունեցող կորերը կարող են ունենալ տարբեր մակերեսներ:

$$A = \int_{\bar{\nu}_1}^{\bar{\nu}_2} \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (2.5):$$

A-ն լայն սպեկտրալ շերտի ընդհանուր ինտենսիվության իրական չափանիշն է: Նշենք, որ ε-ի չափողականությունը բացի լ·մոլ$^{-1}$·սմ$^{-1}$-ից կարող է ներկայացվել և որպես մոլ$^{-1}$·սմ^{2}: A-ի չափողականությունը, այսպիսով, կարող է արտահայտվել մոլ$^{-1}$·սմ^{2}·վրկ$^{-1}$-ով:

Ինտեգրալ ինտենսիվությունը հաճախ արտահայտվում է չափողականություն չունեցող մեծությամբ՝f-ով, որը կոչվում է օսցիլյատորի ուժ

$$f = \frac{4m_e \cdot c^2 \varepsilon_0}{Ne^2} A = \frac{4m_e \cdot c^2 \varepsilon_0}{Ne^2} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (2.6),$$

որտեղ ε_0-ն վակուումի դիէլեկտրիկ հաստատունն է, c-ն՝ լույսի տարածման արագությունը վակուումում, N-ը՝ Ավոգադրոյի թիվը, m_e-ն՝ էլեկտրոնի զանգվածը, իսկ e-ն՝ լիցքը: Օսցիլյատորի ուժը, փաստորեն, նշված A մակերեսն է՝ բազմապատկած հաստատունով, որի հաշվումից էլ ստացվում է (2.7)-ը

$$f = 4.319 \cdot 10^{-9} \int_{\bar{\nu}_1}^{\bar{\nu}_2} \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (2.7):$$

Նշենք, որ (2.6) և (2.7) հավասարումներում $\bar{\nu}$-ն ալիքային թիվն է (սմ$^{-1}$), իսկ $\varepsilon(\bar{\nu})$-ի չափողականությունը՝ լ·մոլ$^{-1}$·սմ$^{-1}$ է:

Սիմետրիկ տեսք ունեցող կլանման շերտի համար (2.7) արտահայտությունում ինտեգրալը կարելի է փոխարինել $\varepsilon_{max} \cdot \Delta\bar{\nu}$ արտադրյալով, որտեղ $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$-ն շերտի լայնությունն է $\varepsilon=\varepsilon_{max} \cdot 1/2$ արժեքի համար (նկ. 2.3ա): Այդ դեպքում՝

$$f = 4.319 \cdot 10^{-9} \cdot \varepsilon_{max} \cdot \Delta\bar{\nu}_{1/2} \quad (2.8):$$

Ինտենսիվ անցումների օսցիլյատորի ուժը մոտ է մեկին, որի դեպքում մոլային էքստինկցիան փոխվում է 10^4-10^5 արժեքների սահմաններում:

Օսցիլյատորի ուժի կամ ինտեգրալ ինտենսիվության և էքստինկցիայի գործակցի միջև եղած հիմնական տարբերությունը այն է, որ առաջինները բնութագրում են ինտեգրալ ինտենսիվությունը հաճախությունների ողջ տիրույթում, իսկ մոլային էքստինկցիան բնութագրում է կլանման ինտենսիվությունը ալիքի որոշակի երկարության տակ: Օսցիլյատորի ուժը կարևոր է և նրանով, որ կարող է

հաշվարկվել տեսականորեն: Դրա քվանտամեխանիկական հաշվարկը կապվում է անցման դիպոլ մոմենտ հասկացության հետ:

Լրիվ թույլատրելի անցման դեպքում՝ f =1:

$n \to \pi^*$ անցումների համար f -ի արժեքը $\approx 10^{-3}$ է, $\pi \to \pi^*$ անցումների համար f -ի և ε -ի արժեքները ավելի բարձր են: f -ը չափողականություն չունեցող մեծություն է և դրա մաքսիմալ արժեքը մոտ է 1-ին: Նման դեպքերում ε-ի արժեքը 10^5 կարգի մեծություն է: Հավելված 3-ում բերված են ֆլուորեսցենցիայի տեսակետից կարևորվող որոշ միացությունների ε-ի արժեքները: Իսկ ինչ վերաբերում է ամինոթթուներին, ապա նշենք, որ դրանց մեծ մասի էլեկտրոնային անցումները $\sigma \to \sigma^*$ տիպի են, որոնք իրականանում են հեռու ՈՒՄ մարզում, 230 նմ-ից ցածր: Բացառություն են կազմում ֆենիլալանինը (Phe), թիրոզինը (Tyr) և տրիպտոֆանը (Trp), որոնք բոլորն էլ պարունակում են ֆենիլ քրոմոֆոր խումբ և կլանում են 250 նմ-ից բարձր ալիքի տակ: Սպիտակուցների 280 նմ կլանումը արդյունք է $\pi \to \pi^*$ անցումների:

ԳԼՈՒԽ ԵՐԲՈՐԴ

ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՆ ԵՎ ԳՐԳՌՎԱԾ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ԱՊԱԳՐԳՌՄԱՆ ԱՅԼ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԸ

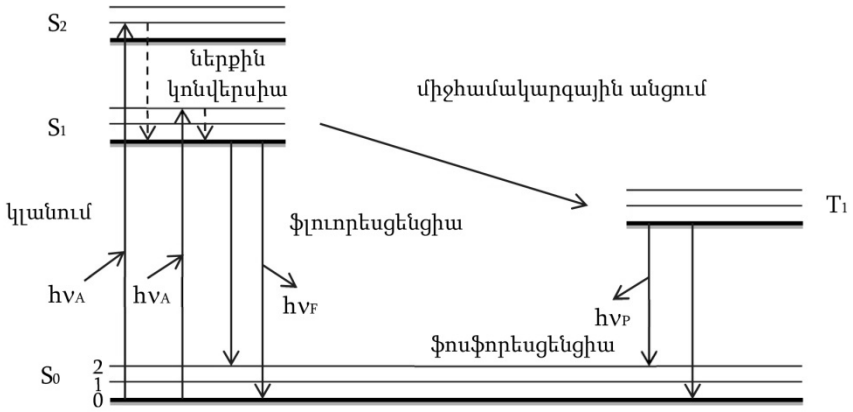
3.1. Ֆլուորեսցենտային առաքման բնութագրերը

Այս գլխում կներկայացվեն լուծույթում գտնվող գրգռված մոլեկուլի ֆլուորեսցենտային առաքման բնութագրերը, որոնք, մասնավորապես, ընդգրկում են էլեկտրոնային վիճակների միջև ճառագայթային և ոչ ճառագայթային անցումները, և մոլեկուլի կառուցվածքի ազդեցությունը: Իսկ ինչ վերաբերում է մոլեկուլային փոխազդեցություններով պայմանավորված ֆոտոֆիզիկական պրոցեսներին, ապա դրանք կքննարկվեն հաջորդ՝ չորրորդ գլխում:

Յաբլոնսկու դիագրամը. Էլեկտրոնային վիճակների միջև ճառագայթային և ոչ ճառագայթային անցումները

Երբ մոլեկուլը կլանելով ֆոտոն անցնում է գրգռված վիճակի, այն կարող է վերադառնալ հիմնական վիճակին ինչպես ֆլուորեսցենցիայի, այնպես էլ ապագրգռման այլ ճանապարհներով: Լույսի կլանումով գրգռված մոլեկուլի էներգիայի կորուստի (ապագրգռման) հնարավոր ճանապարհներն են. ճառագայթային անցումները՝ հանձինս ֆլուորեսցենցիայի և ֆոսֆորեսցենցիայի, և ոչ ճառագայթային անցումները՝ ընդգրկելով ներքին կոնվերսիան և միջհամակարգային անցում: Մեկ այլ կարևոր պրոցես է հանդիսանում տատանողական ռելաքսացիան (տատանողական կասկադ): Այդ երևույթը պայմանավորված է այն հանգամանքով, որ գրգռված էլեկտրոնային վիճակին

համապատասխանող տատանողական մակարդակներում իրագործվում են ոչ ճառագայթային անցումներ մինչև ամենացածր մակարդակը, որին և հաջորդում է ֆլուորեսցենցիան: Համակարգում տեղի ունեցող ճառագայթային և ոչ ճառագայթային անցումները ներկայացվում են Յաբլոնսկու դիագրամի միջոցով (նկ. 3.1):



Նկ. 3.1 Յաբլոնսկու դիագրամը:

Վերը նշված ֆոտոպրոցեսների բնութագրական ժամանակները բերված են նկ. 3.2 ում՝

Բնութագրական ժամանակահատվածներ	
Կլանում	10^{-15} վրկ
Տատանողական ռելաքսացիա	$10^{-12} – 10^{-10}$ վրկ
S_1 գրգռված վիճակի կյանքի տևողությունը	$10^{-10} – 10^{-7}$ վրկ → Ֆլուորեսցենցիա
Միջհամակարգային անցում	$10^{-10} – 10^{-8}$ վրկ
Ներքին կոնվերսիա	$10^{-11} – 10^{-9}$ վրկ
T_1 գրգռված վիճակի կյանքի տևողությունը	$10^{-6} – 1$ վրկ → Ֆոսֆորեսցենցիա

Նկ. 3.2 Ֆոտոֆիզիկական պրոցեսների բնութագրական ժամանակահատվածները:

Լույսի կլանումը բազմատոմ մոլեկուլների կողմից հանգեցնում է էլեկտրոնային անցումների հիմնական սինգլետ վիճակից (S_0) գրգռված (S_n) վիճակին: Սինգլետ հիմնական, առաջին և երկրորդ էլեկտրոնային գրգռված վիճակները համապատասխանաբար նշանակվում են S_0, S_1 և S_2: Այս էլեկտրոնային էներգետիկ մակարդակներից յուրաքանչյուրում ֆլուորոֆորները կարող են գտնվել տատանողական էներգետիկ որևէ 0, 1, 2 և այլն մակարդակում: Տարբեր էլեկտրոնային վիճակների միջև անցումները ներկայացված են ուղղահայաց գծերով, ընդգծելու համար այն, որ այդ պրոցեսն ունի ակնթարթային բնույթ: Այն իրագործվում է մոտավորապես 10^{-15} վայրկյան ժամանակահատվածում, այսինքն շատ կարճ ժամանակամիջոցում, որի ընթացքում, համաձայն Ֆրանկ-Կոնդոնի սկզբունքի, չի իրագործվում միջուկների դիրքի փոփոխություն:

Այժմ դիտարկենք հնարավոր ապագրգռման պրոցեսները:

Ներքին կոնվերսիա

Ներքին կոնվերսիան նույն սպինային մուլտիպլետությամբ երկու էլեկտրոնային վիճակների միջև ոչ ճառագայթային անցումն է: Այդպիսին է հանդիսանում S_2 - S_1 անցումը: Լուծույթում այս պրոցեսին հաջորդում է տատանողական ռելաքսացիան մինչև S_1-ի ցածրա-

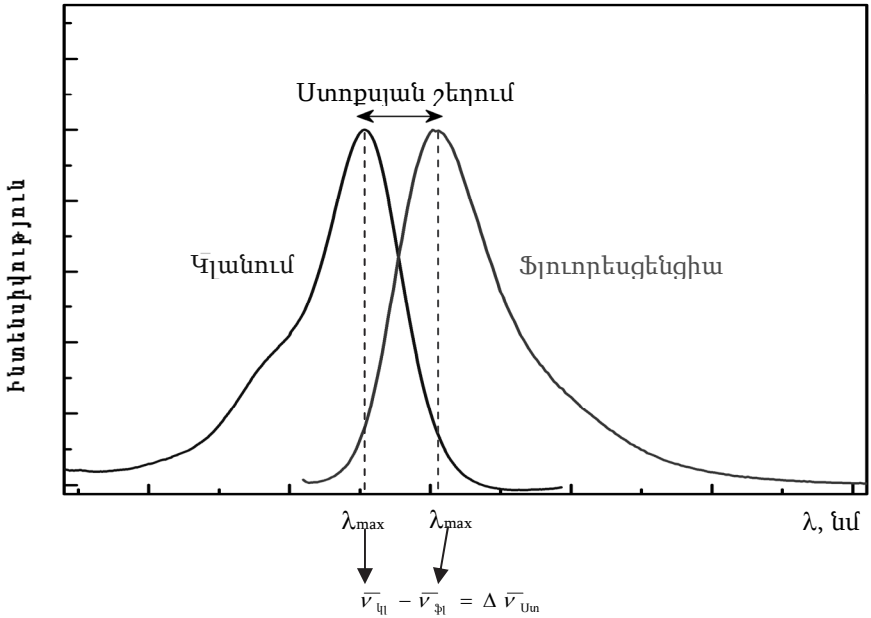
գույն տատանողական մակարդակը: Իրոք, լուծույթում հավելյալ տատանողական էներգիան փոխանցվում է լուծիչին շնորհիվ բախումների, որոնք իրագործվում են գրգռված մոլեկուլի և շրջապատի լուծիչի մոլեկուլների միջև: Նշենք, որ տատանողական ռելաքսացիան ընթանում է 10^{-13} - 10^{-11} վ ժամանակահատվածում:

Ֆլուորեսցենցիա և ստոքսյան շեղում

Ֆոտոնների առաքումը, պայմանավորված S_1 - S_0 անցումով, կոչվում է ֆլուորեսցենցիա: Քանի որ, ֆլուորեսցենցիայի բնութագրական ժամանակամիջոցը մոտավորապես 10^{-8} վ (10 նվ) է, ապա տատանողական ռելաքսացիան սովորաբար ավարտվում է մինչև լուսարձակումը: Հետևաբար, կարող ենք եզրակացնել, որ ֆլուորեսցենտային առաքումն ավելի հաճախ իրագործվում է ջերմային հավասարակշռված գրգռված վիճակից:

Ակնհայտ է, որ գրգռված վիճակում տատանողական ռելաքսացիայով պայմանավորված էներգիայի կորուստը բերում է նրան, որ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրը ի հայտ է գալիս ավելի երկար ալիքի երկարության տակ: Այս երևույթը առաջին անգամ դիտվել է Քեմբրիջի համալսարանի պրոֆեսոր Գ. Ստոքսի կողմից 1852 թ., որի անունով էլ այն կոչվում է «Ստոքսյան շեղում»: Ստոքսյան շեղումը հենց փորձնական արտացոլումն է այն հանգամանքի, որ ֆլուորեսցենտային առաքման ալիքի երկարությունն ավելի մեծ է, քան կլանման ալիքի երկարությունը (նկ. 3.3), ինչպես դա հետևում է և Յաբլոնսկու դիագրամից: Նկատենք, որ ստոքսյան շեղումը մշտապես դիտվում է լուծույթում առկա ֆլուորեսցենցող մոլեկուլների համար: Ըստ որում, ստոքսյան շեղումը կարող է ավելի մեծանալ լուծիչի՝ ֆլուորոֆորի վրա ունեցած ազդեցության պատճառով (տե՛ս գլուխ 7): Ավելի խիստ մեկնաբանությամբ ստոքսյան շեղումը դա կլանման և ֆլուորեսցենցիայի մաքսիմումների միջև ընկած հեռավորությունն է՝ արտահայտված ալիքային թվերով: Նշենք, որ հենց ալիքային թիվն է օգտագործվում քանակական վերլուծություններում, քանի որ,

որպես սպեկտրոսկոպիական մեծություն, վերջինս ուղիղ համեմատական է էներգիային:



Նկ. 3.3 Ստոքսյան շեղման պատկերումը:

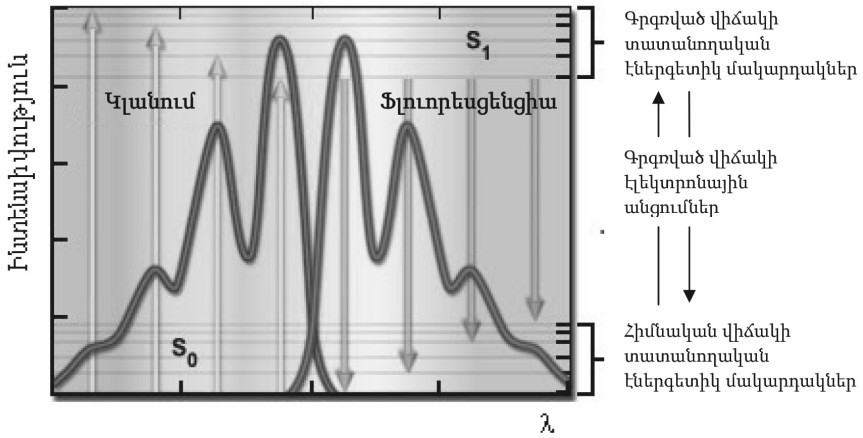
3.2. Առաքման սպեկտրի անկախ լինելը գրգռման ալիքի երկարությունից. Հայելային սիմետրիայի կանոնը

Ֆլուորեսցենց առաքման սպեկտրը, սովորաբար, կախված չէ գրգռման ալիքի երկարությունից: Բարձր էլեկտրոնային տատանողական մակարդակ հասնելուց հետո էներգիայի ավելցուկը արագ ծախսվում է, որն ուղեկցվում է ֆլուորոֆորի վերադարձմամբ S_1 վիճակի ամենացածր տատանողական մակարդակ: Այդ ռելաքսա-

ցիան, ինչպես նշվել է, տեղի ունի 10^{-13} - 10^{-11} վ ժամանակահատվածում: Շնորհիվ նման արագ ռելաքսացիայի գրգռման ալիքի երկարությունը չի ազդում առաքման սպեկտրի վրա:

Սովորաբար, ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրը իրենից ներկայացնում է կլանման սպեկտրի հայելային պատկերը՝ անդրադարձը (նկ. 3.4), ավելի ճիշտ ասած այն կլանման, որը համապատասխանում է S_0 -ից S_1-ին անցմանը: Նկարում բերված սպեկտրների սիմետրիկ տեսքը հետևանք է այն բանի, որ և՛ կլանումը, և՛ առաքումը պայմանավորված են միևնույն անցումներով, ինչպես նաև S_0 և S_1 վիճակների տատանողական մակարդակների նմանությամբ: Կարևորենք նաև այն հանգամանքը, որ կլանումը հիմնականում իրագործվում է ամենացածր (v″= 0) տատանողական մակարդակից՝ համաձայն Բոլցմանի բաշխման օրենքի, իսկ առաքումը գրգռված վիճակի ամենացածր տատանողական մակարդակից (v′= 0), ինչպես նշվել է՝ պայմանավորված արագ տատանողական ռելաքսացիայով: Միևնույն ժամանակ ասվածը նշանակում է, որ գրգռման ժամանակ տեղի չունի մոլեկուլի երկրաչափության զգալի փոփոխություն, որն էլ հենց բնորոշ է կոշտ կառուցվածք ունեցող քրոմոֆորներին (ֆլուորոֆորներին): Բացի դրանից, Ֆրանկ-Կոնդոնի սկզբունքը, որը և որոշում է կլանման շերտի տեսքը, պետք է կիրառելի լինի նաև առաքման պրոցեսների համար: Հիշենք, որ համաձայն Ֆրանկ-Կոնդոնի սկզբունքի, բոլոր էլեկտրոնային անցումները իրագործվում են առանց միջմիջուկային հեռավորության փոփոխության: Արդյունքում, եթե տվյալ անցման հավանականությունը (Ֆրանկ-Կոնդոնի գործոնը) մաքսիմալն է կլանման ժամանակ, ապա համապատասխան անցումը կլինի և ամենահավանականը առաքման ժամանակ: Ինչպես երևում է նկ. 3.4-ում, երկու սպեկտրներն էլ սիմետրիկ են 0,0 – շերտի նկատմամբ, որոնք պետք է, որ համընկնեն: Նման համընկնում դիտվում է գազերի սպեկտրներում: Մինչդեռ լուծույթում 0,0– շերտի դիրքերը կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրներում տար-

բեր են: Ըստ որում, այդ տարբերության չափը կախված է լուծիչի բնույթից և ջերմաստիճանից: Չնայած այն բանին, որ հայելային սիմետրիայի կանոնը հաճախ է իրագործվում, այնուամենայնիվ կան նաև բազմաթիվ բացառություններ: Հայելային սիմետրիայի կանոնից շեղումը, սովորաբար, հետևանք է այն բանի, որ հիմնական և գրգռված վիճակներում միջուկներն ունեն տարբեր դասավորվածություն:



Նկ. 3.4 Կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների պատկերը:

Միջհամակարգային անցումը և դրան հաջորդող պրոցեսները

Մեկ այլ ֆոտոֆիզիկական պրոցես է էներգիայի միջհամակարգային անցումը: Այն բնորոշվում է որպես ոչ ճառագայթային անցում երկու իզոէներգետիկ (նույն էներգիան ունեցող) տատանողական մակարդակների միջև, որոնք պատկանում են տարբեր մուլտիպլետությամբ էլեկտրոնային վիճակներին: Այսպես օրինակ՝ գրգռված մոլեկուլը, որը գտնվում է S_1 վիճակի 0 տատանողական մակարդակում, կարող է տեղափոխվել T_1–ի իզոէներգետիկ մակարդակը, որից

հետո տատանողական ռելաքսացիայի հետևանքով այն հայտնվում է T_1-ի ցածրագույն տատանողական մակարդակում:

Առաքումը T_1 վիճակից իրականանում է ավելի երկար ալիքի տակ: Այս երևույթը կոչվում է ֆոսֆորեսցենցիա: Անցումը T_1 վիճակից հիմնական S_0 վիճակին արգելված է, այդ իսկ պատճառով ճառագայթման արագության հաստատունը շատ փոքր է: Թերևս T_1 - S_0 անցումը կարող է իրագործվել շնորհիվ սպին-օրբիտալային փոխազդեցության, որին նպաստում է ծանր ատոմների ներկայությունը: Նշենք, որ ցածր ջերմաստիճաններում, ինչպես նաև մածուցիկ միջավայրում տրիպլետ վիճակի կյանքի տևողությունը բավականին երկար է և ֆոսֆորեսցենցիան դիտվում է վայրկյանների և նույնիսկ րոպեների ընթացքում: Ակնհայտ է, որ ֆոսֆորեսցենցիայի սպեկտրը, ի համեմատ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի, ավելի երկար ալիքի երկարության տակ է ի հայտ գալիս, քանի որ T_1 տրիպլետ վիճակի ցածրագույն տատանողական մակարդակն ավելի ցածր է, քան S_1 սինգլետ վիճակինը:

3.3. Ֆլուորեսցենցիայի տևողությունը և քվանտային ելքը

Ֆլուորեսցենցիայի կյանքի տևողությունը և քվանտային ելքը ֆլուորոֆորի կարևորագույն բնութագրերից են: Նշված հասկացությունների ըմբռնման համար հարմար է օգտվել Յաբլոնսկու դիագրամի պարզեցված տեսքից (նկ. 3.1): Այս դիագրամի առանձնահատկությունը կայանում է նրանում, որ ուշադրություն է դարձվում այն պրոցեսների վրա, որոնք պայմանավորում են գրգռված մոլեկուլի վերադարձը հիմնական վիճակին, այսինքն S_1 - S_0 անցմանը՝ ընդգրկելով և՛ ճառագայթային, և՛ ոչ ճառագայթային անցումները: Դրա համար, որպես քննարկվող պարամետր, վերցվում է ճառագայթային ապագրգռման արագության հաստատունը՝ Γ և ոչ ճառագայ-

թային ապագրգռման արագության հաստատունը՝ k: Երկուսի դեպքում էլ իրագործվում է անցում S_1- ից S_0: Ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը առաքված ֆոտոնների թվի հարաբերությունն է կլանված ֆոտոնների թվին: Երկու արագությունների հաստատուններն էլ՝ Γ և k, արտահայտում են գրգռված վիճակի բնակեցվածության փոքրացումը: Ասվածից հետևում է, որ ֆլուորոֆորի մոլեկուլների այն մասնաբաժինը, որն ապագրգռվում է ճառագայթային ճանապարհով, այլ կերպ ասած՝ քվանտային ելքը, կորոշվի հետևյալ արտահայտությամբ՝

$$Q=\Gamma/\Gamma+k \quad (3.1):$$

Պարզ է, որ քվանտային ելքը՝ Q-ն, մոտ է մեկին այն դեպքում, երբ ոչ ճառագայթային ապագրգռման արագության հաստատունը շատ անգամ փոքր է ճառագայթային առաքման արագության հաստատունից, այսինքն՝ $k << \Gamma$: Նշենք, որ գրգռված վիճակի կյանքի տևողությունը որոշվում է որպես միջինացված ժամանակահատված, որի ընթացքում մոլեկուլը գտնվել է գրգռված վիճակում մինչև այն պահը, երբ նա կվերադառնա հիմնական վիճակին: Սովորաբար, ֆլուորեսցենցիան ավարտվում է մոտավորապես 10 նվ-ի ընթացքում: Ֆլուորեսցենցիայի ժամանակամիջոցը կամ ավարտման ժամանակը՝ τ -ն, որոշվում է այսպես՝

$$\tau=1/\Gamma+k \quad (3.2):$$

Անհրաժեշտ է ընդգծել, որ ֆլուորեսցենցիայի ընթացքում ոչ բոլոր մոլեկուլներն են առաքում ֆոտոնները $t = \tau$ ժամանակահատվածում: Ֆլուորոֆորի կյանքի տևողությունը գրգռված վիճակում գտնվելու միջին ժամանակն է: Եթե բացակայում են ոչ ճառագայթային պրոցեսները, ապա այդ դեպքում ֆլուորոֆորի կյանքի տևողությունը անվանվում է սեփական կամ բնական կյանքի տևողություն՝ τ_0, որը հավասար է՝

$$\tau_0 = 1/\Gamma \quad (3.3):$$

Բերված հավասարումներից էլ հետևում է կապը քվանտային ելքի և կյանքի տևողության միջև՝

$$Q = \tau / \tau_0 \quad (3.4):$$

Q -ի առավելագույն արժեքը կարող է լինել 1 (100%): Մեծ քվանտային ելքով օժտված նյութերը, ինչպիսիք են ռոդամինները, ունեն լավ արտահայտված առաքում: Միացությունները, որոնց քվանտալին ելքը կազմում է 0.10, դասվում են թույլ ֆլուորեսցենցող նյութերի շարքը: Քվանտային ելքը և կյանքի տևողությունը կարող են փոխվել տարբեր ազդակների ազդեցությունից: Մոլեկուլը կարող է չֆլուորեսցենցել ներքին կոնվերսիայի մեծ արագության կամ էլ առաքման փոքր արագության հետևանքով, իսկ NO_2 խումբ պարունակող արոմատիկ միացությունների ֆլուորեսցենցիան շատ թույլ է՝ հիմնականում պայմանավորված k –ի մեծ արժեքով:

Ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքի գործնական որոշումը բերված է փորձարարական մասում (տե՛ս գլուխ 10, աշխատանք 1):

ԳԼՈՒԽ ՉՈՐՐՈՐԴ

ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՆԵՐԻ ԿԱՊԸ ՄՈԼԵԿՈՒԼԻ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ՀԵՏ

Այս բաժինը, բացի ֆիզիկաքիմիական նշանակությունից, կարևորվում է հատկապես կառուցվածքային օրգանական քիմիայի տեսանկյունից: Սկզբից եթ ընդգծենք, որ ֆլուորեսցենցող միացությունների գերակշիռ մասն ունեն արոմատիկ (կոշտ) կառուցվածք: Թերևս կան նաև որոշ չհագեցած ալիֆատիկ միացություններ, որոնք նույնպես ֆլուորեսցենցում են: Ընդհանուր առմամբ, π – էլեկտրոնային համակարգի զուգորդումը (տարածումը) բերում է ինչպես կլանման և ֆլուորեսցենտային սպեկտրների շեղմանը դեպի երկար ալիքի կողմը, այնպես էլ ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքի մեծացմանը: Ասվածի փաստացի արտահայտումն է արոմատիկ ածխաջրածինների շարքում՝ նավթալին, անտրացեն, նավթացեն և պենտացեն, ֆլուորեսցենցիայի դիտումը համապատասխանաբար ուլտրամանուշակագույն, կապույտ, կանաչ և կարմիր մարզերում: Նմանատիպ արոմատիկ ածխաջրածիններում իրագործվում է $\pi \rightarrow \pi^*$ անցում, որը բնութագրվում է բարձր կլանման գործակցով և ֆլուորեսցենցիայի բարձր քվանտային ելքով: Երբ հետերոատոմ է ընդգրկվում π – համակարգում, ապա ցածրագույն էներգիայով անցումը ոչ թե $\pi \rightarrow \pi^*$ -ն է, որը տեղի ունի արոմատիկ ածխաջրածիններում, այլ $n \rightarrow \pi^*$ անցումը: Այդպիսի մոլեկուլները բնութագրվում են կլանման մոլային գործակցի և ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքի փոքր արժեքներով: Նման օրինակներ են ազոտ, կարբոնիլ խումբ պարունակող

միացությունները, ինչպես նաև ազոտ պարունակող հետերոցիկլերը՝ պիրիդինը և նրա ածանցյալները:

4.1. Տեղակալված արոմատիկ ածխաջրածիններ

Այստեղ առանձին-առանձին կքննարկվի ինչպես էլեկտրոնդոնոր, այնպես էլ էլեկտրոնակցեպտոր տեղակալիչների ազդեցությունը: Ակնհայտ է, որ նման տեղակալիչները, փոխելով մոլեկուլում էլեկտրոնային բաշխվածությունը, որոշակի ազդեցություն կունենան ֆլուորեսցենցիայի բնութագրերի վրա:

Էլեկտրոնդոնոր տեղակալիչների ազդեցությունը

Որպես այդպիսին կարող են հանդես գալ –OH, –OR, $–NH_2$, –NHR, $–NR_2$ խմբավորումները: Որպես կանոն, այդ խմբավորումները բերում են կլանման մոլային գործակցի մեծացմանը և ինչպես կլանման, այնպես էլ ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների շեղմանը: Այդ միացությունների սպեկտրները լայնացված են և, ի տարբերություն համապատասխան ոչ տեղակալված արոմատիկ ածխաջրածինների, հաճախ չունեն նուրբ կառուցվածք (օրինակ՝ 1- և 2- նավթոլներն ի համեմատ նավթալենի): Հատկանշական է, որ վերը նշված տեղակալիչների թթվածնի կամ ազոտի ատոմի մոտ գտնվող ազատ էլեկտրոնային զույգն անմիջականորեն ընդգրկվում է π – արոմատիկ համակարգում և, արդյունքում, չի փոխվում $\pi \rightarrow \pi^*$ անցման բնույթն ի տարբերություն կարբոնիլ խումբ պարունակող տեղակալիչի և հետերոցիկլիկ ազոտի մոտ գտնվող էլեկտրոնային զույգի: Ակնհայտ է, որ տեղակալիչի և արոմատիկ օղակի փոխադարձ դասավորվածությունը որոշակի չափով կազդի π – արոմատիկ համակարգի և տեղակալիչի ազատ էլեկտրոնային զույգի միջև իրականացվող զուգորդման չափի վրա: Իրոք, տարածական տեսանկյունից $-NH_2$ խումբը և արոմատիկ օղակը չեն գտնվում նույն հարթության մեջ, նույնը և -OR

տեղակալիչի դեպքում է: Միչդեռ –OH խումբը արոմատիկ օղակի հետ համարյա նույն հարթության մեջ է (կոպլանար է):

4.2. Էլեկտրոնակցեպտոր տեղակալիչների ազդեցությունը

Էլեկտրոնակցեպտոր տեղակալիչներ պարունակող ֆլուորոֆորներից կարևորվում են կարբոնիլ և նիտրո խումբ պարունակող միացությունները: Շատ արոմատիկ ալդեհիդների և կետոնների էներգետիկորեն ցածր տեղակալված, այսինքն փոքր էներգիայով, կամ որ նույնն է ասել երկար ալիքային անցումը պայմանավորված է $n \rightarrow \pi^*$ անցումով: Այդ իսկ պատճառով էլ նման միացությունները, ինչպես նշվել է վերևում, բնութագրվում են ֆլուորեսցենցիայի ցածր քվանտային ելքերով: Ըստ էության, մենք այստեղ գործ ունենք $\pi - \pi^*$ և $n - \pi^*$ անցումների հետ, որոնց էներգետիկ դասավորվածության վրա որոշակի ազդեցություն ունի լուծիչի բևեռայնությունը: Հայտնի է, որ բևեռային և ջրածնական կապ առաջացնող լուծիչներում $n-\pi^*$ անցումը դիտվում է ավելի կարճ ալիքային (մեծ էներգիայով) մարզում, մինչդեռ $\pi - \pi^*$ անցումը շեղվում է դեպի ավելի երկար ալիքային (փոքր էներգիայով) մարզ: Ահա հենց վերջինի պատճառով էլ նման միացությունների ֆլուորեսցենցիան ինտենսիվ է բևեռային լուծիչներում և թույլ է ոչ բևեռային լուծիչներում:

Նշենք, որ -NO_2 խումբ պարունակող արոմատիկ ածխաջրածինների ֆլուորեսցենցիան սովորաբար չի դիտվում:

4.3. Հետերոցիկլիկ միացությունների ֆլուորեսցենցիան

Ֆլուորեսցենցող հետերոցիկլիկ միացությունների շարքին են պատկանում ազոտի, թթվածնի և ծծմբի ատոմ պարունակող արոմա-

տիկ ածխաջրածինները: Մասնավորապես՝ ազոտի ատոմ պարունակող արոմատիկ հետերոցիկլիկ միացություններից են պիրիդինը, խինոլինը, ակրիդինը: Նշված միացությունների ֆլուորեսցենցիայի բնութագրերը զգալի չափով կախված են լուծիչի բնույթից: Այսպես, ոչ բևեռային ածխաջրածնային լուծիչներում այս միացությունների ցածրագույն էներգետիկ անցումը $n - \pi^*$ է, և հետևաբար էլ ֆլուորեսցենցիան թույլ է: Մինչդեռ պրոտոնային լուծիչներում, օրինակ սպիրտներում, ազոտի ատոմի և լուծիչի մոլեկուլի միջև առաջացած ջրածնական կապի շնորհիվ $\pi - \pi^*$ անցումը, ի համեմատ $n - \pi^*$ անցման, իրագործվում է ավելի երկար ալիքային մարզում: Արդյունքում նման լուծիչում ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը զգալի չափով մեծանում է՝ ի համեմատ ածխաջրածնային լուծիչի:

Որոշ հետերոցիկլիկ միացությունների դեպքում, ինչպես օրինակ ակրիդինն է, դժվար է տարբերակել $n - \pi^*$ կլանման շերտը ավելի ինտենսիվ համարվող $\pi - \pi^*$ կլանման շերտերից: Ուշադրության են արժանի այն հետերոցիկլիկ արոմատիկ միացությունները, որտեղ ազոտի ատոմը միացած է ածխածնի ատոմին մեկ կապով: Նման օրինակներ են ինդոլը, կարբազոլը, ինչպես նաև տրիպտոֆանը: Այստեղ առանձնահատկությունը կայանում է նրանում, որ ազոտի ազատ էլեկտրոնային զույգի (ոչ կապակցող էլեկտրոններ) մասնակցությամբ իրագործվող անցումները նման են (նույնական են) $\pi - \pi^*$ անցումներին: Բանը նրանումն է, որ չկապակցող օրբիտալը, լինելով արոմատիկ օղակի հարթությանն ուղղահայաց, վերածածկվում է կից ածխածնի ատոմների π օրբիտալներով: Այդ իսկ պատճառով էլ վերը նշված միացություններն ունեն ֆլուորեսցենցիայի համեմատաբար բարձր քվանտային ելք:

Կառուցվածքային օրգանական քիմիայի տեսանկյունից հետաքրքրություն են ներկայացնում այն ֆլուորոֆորները, որոնցում գրգռումն ուղեկցվում է մոլեկուլի կառուցվածքի փոփոխությամբ: Ֆլուորոֆորի գրգռումն առաջ է բերում էլեկտրոնի տեղաշարժ մի օր-

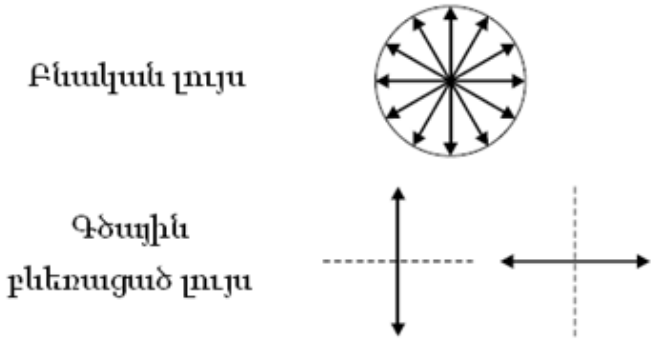
բիտալից դեպի մեկ այլ օրբիտալ: Արդյունքում, ինչպես և պետք է սպասել, տեղի ունի դիպոլ մոմենտի փոփոխություն: Այն դեպքում, երբ ֆլուորոֆորը պարունակում է էլեկտրոնդոնոր խմբեր ($–NH_2$, $–NMe_2$), որոնք համակցված են էլեկտրոնակցեպտոր խմբերին (C=O, –CN), դիպոլ մոմենտի աճը զգալի է: Նման իրավիճակում լուծիչի բևեռայնության մեծացման հետ տեղի է ունենում ֆլուորես-ցենցիայի սպեկտրի երկարալիքային շեղում (տե՛ս գլուխ 7):

ԳԼՈՒԽ ՀԻՆԳԵՐՈՐԴ

ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ԱՆԻԶՈՏՐՈՊԻԱ

5.1. Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացում. Առաքման անիզոտրոպիա

Ֆլուորեսցենցիայի անիզոտրոպիան անմիջականորեն առընչվում է գծայնորեն բևեռացած լույսի հետ: Հայտնի է, որ լույսն էլեկտրամագնիսական ճառագայթ է, որը կազմված է էլեկտրական E դաշտից և մագնիսական B դաշտից, որոնք ուղղահայաց են իրար և տարածման ուղղությանը: Բնական լույսի դեպքում այս դաշտերը չունեն նախընտրելի կողմնորոշում, սակայն գծային բևեռացած լույսի դեպքում էլեկտրական դաշտն օսցիլացվում է տրված ուղղության երկայնքով (նկ. 5.1):



Նկ. 5.1. Բնական և գծային բևեռացած լույս:

Քանի որ գրգռված ֆլուորոֆորների բաշխվածությունն անիզոտրոպ է, ուստի առաքված ֆլուորեսցենցիան նույնպես կլինի անիզոտրոպ: Գրգռված վիճակի կյանքի ընթացքում անցման մոմենտի ուղղության ցանկացած փոփոխություն կհանգեցնի այս անիզոտրոպիայի նվազեցմանը, այսինքն կհանգեցնի ֆլուորեսցենցիայի մասնակի (կամ ամբողջական) ապաբևեռացմանը:

Ֆլուորեսցենցիայի ապաբևեռացման պատճառներն են՝

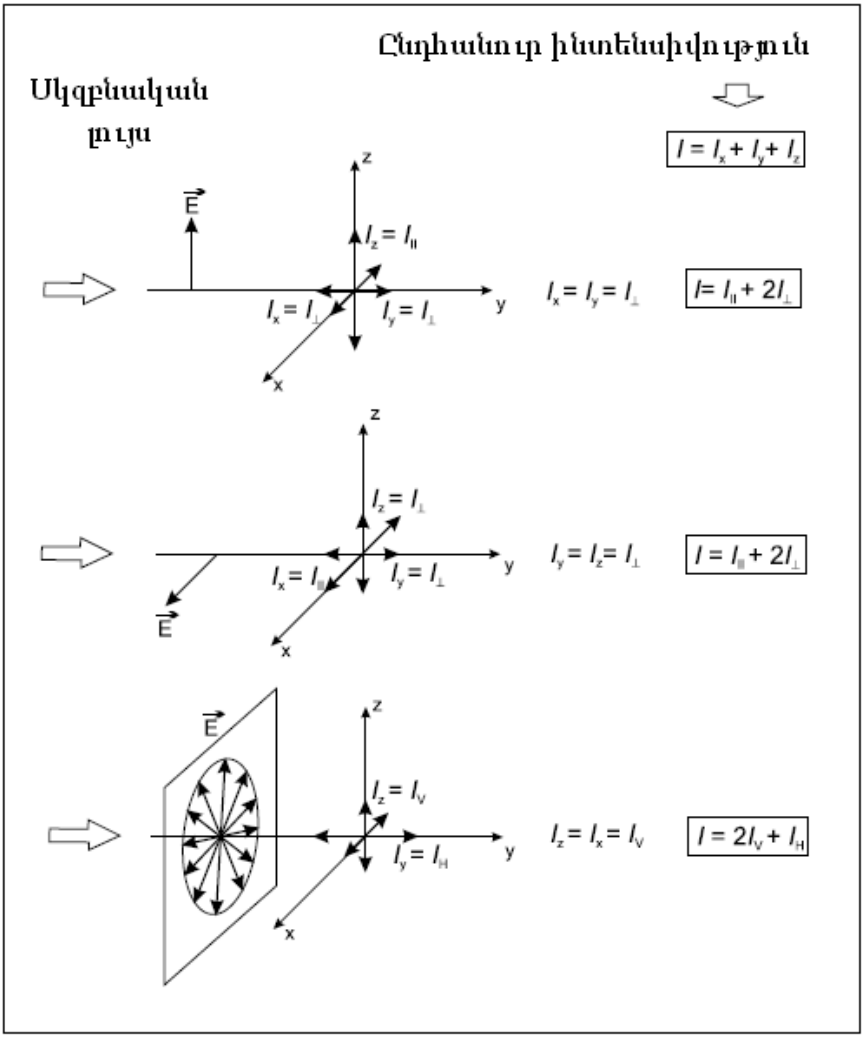
1. ոչ զուգահեռ կլանման և առաքման անցման մոմենտները,
2. պտտական տատանումները,
3. բրոունյան շարժումը,
4. գրգռման էներգիայի անցումը այլ ուղղությամբ կողմնորոշված մեկ ուրիշ մոլեկուլին:

Այսպիսով, ֆլուորեսցենցիայի բևեռացումը կարող է օգտակար տեղեկություն տալ մոլեկուլների շարժման, չափսի, ձևի և ճկունության, միջավայրի մածուցիկության և այլ պարամետրերի մասին: Հատկապես կարևորվում է այն հանգամանքը, որ լույսի առաքման անիզոտրոպիայի չափումներից կարելի է տեղեկություն ստանալ ֆլուորոֆորի պտտական շարժման վերաբերյալ:

5.2. Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացած վիճակի բնութագրերը (բևեռացման հարաբերություն, առաքման անիզոտրոպիա)

Քանի որ տարբեր մոլեկուլների առաքած լուսային ճառագայթների միջև չկա ֆազային հարաբերակցություն, ուստի ֆլուորեսցենցիան կարելի է դիտարկել որպես իրար հետ ոչ մի ֆազային հարաբերակցություն չունեցող երեք փոխուղղահայաց Ox, Oy և Oz առանցքների երկայնքով բևեռացած լույսի երեք անկախ աղբյուրների արդյունք: I_x, I_y և I_z-ը այդ ճառագայթների ինտենսիվություններն են, և ընդհանուր ինտենսիվությունը կլինի $I=I_x+I_y+I_z$: Ինտենսիվության

բաղադրիչների արժեքները կախված են սկզբնական ճառագայթի բևեռացումից և ապաբևեռացնող պրոցեսներից: Կյուրիի սիմետրիայի սկզբունքի (արդյունքը չի կարող ավելի ասիմետրիկ լինել, քան այն առաջացնող պատճառը) կիրառությունը հանգեցնում է ինտենսիվության բաղադրիչների միջև այնպիսի հարաբերության, ինչպիսին ցույց է տրված նկ. 5.2-ում: Հարկ է նշել, որ սիմետրիայի այս սկզբունքը կիրառելի է միայն լույսի կետային աղբյուրի համար, որը փորձնականորեն չի կարելի ճշգրիտ ստանալ:



Նկ. 5.2. Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության բաղադրիչների միջև կապը՝ համաչայն Կյուրիի սիմետրիայի սկզբունքի: Ֆլուորեսցենտային նմուշը գտնվում է կոորդինատային համակարգի սկզբնակետում:

Այժմ քննարկենք գրգռման որոշ տարբերակներ:

Ուղղաձիգ բևեռացած գրգռում

Երբ ընկնող լույսն ուղղաձիգ բևեռացած է, ապա Oz առանցքը, համաձայն Կյուրիի սկզբունքի, ֆլուորեսցենտային առաքման սիմետրիայի առանցքն է, այսինքն՝ $I_x=I_y$: Հետևաբար, այս առանցքի երկայնքով դիտված ֆլուորեսցենցիան բևեռացած չէ:

Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության բաղադրիչները, որոնք զուգահեռ և ուղղահայաց են ճառագայթների փնջի էլեկտրական վեկտորին, համապատասխանաբար, նշանակվում են I_{II} և $I_{\perp}$: Oz առանցքով օսցիլացվող էլեկտրական դաշտին համապատասխանող I_z ինտենսիվության բաղադրիչը չի կարող հայտնաբերվել աչքով կամ այս առանցքի երկայնքով տեղադրված դետեկտորի միջոցով: Ուստի այս առանցքի ուղղությամբ դիտվող ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը կլինի $I_x+I_y=2I_{\perp}$:

Ընդհակառակը, Ox և Oy առանցքները ֆլուորեսցենտային առաքման սիմետրիայի առանցքներ չեն: Երբ ֆլուորեսցենցիան դիտվում է բևեռացուցիչի միջոցով Ox առանցքի (կամ Oy առանցքի) երկայնքով, ապա բևեռացուցիչի ուղղաձիգ դիրքում չափված ինտենսիվությունը կլինի $I_z=I_{II}$, իսկ բևեռացուցիչի հորիզոնական դիրքում՝ $I_y=I_{\perp}$ (կամ $I_x=I_{\perp}$): Առանց բևեռացուցիչի Ox ուղղությամբ չափված ինտենսիվությունը կլինի $I_z+I_y=I_{II}+I_{\perp}$, իսկ Oy ուղղությամբ՝ $I_z+I_x=I_{II}+I_{\perp}$:

Հիմնականում ֆլուորեսցենցիան դիտվում է հորիզոնական հարթության մեջ՝ լուսային ճառագայթի տարածման ուղղության նկատմամբ 90° թեքված, այսինքն Ox առանցքի ուղղությամբ: Ինտենսիվության I_{II} և $I_{\perp}$ բաղադրիչները չափվում են ֆոտոբազմապատկիչի միջոցով, որի դիմաց պտտվում է բևեռացուցիչը: Ֆլուորեսցենցիայի ընդհանուր ինտենսիվությունը կլինի՝ $I=I_x+I_y+I_z=I_{II}+2I_{\perp}$:

Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացած վիճակը նկարագրվում է

- բևեռացման p հարաբերությամբ՝

$$p = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + I_{\perp}} \quad (5.1) \text{ և}$$

- առաքման r անիզոտրոպիայով՝

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}} \quad (5.2):$$

Բևեռացման հարաբերության արտահայտության մեջ (5.1) հայտարարը իրենից ներկայացնում է հետազոտվող ուղղությամբ ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը, մինչդեռ առաքման անիզոտրոպիայի հավասարման մեջ (5.2) հայտարարում տրված է ֆլուորեսցենցիայի ընդհանուր ինտենսիվությունը: Բևեռացման հարաբերությունը նախընտրելի է շատ քիչ դեպքերում (օրինակ ճառագայթային անցման հետազոտություններում): Ավելի հաճախ կիրառվում է առաքման անիզոտրոպիան, քանի որ այն հանգեցնում է ավելի պարզ արտահայտությունների:

r-ի և p-ի միջև կապը տրվում է (5.3) հավասարմամբ՝

$$r = \frac{2p}{3 - p} \quad (5.3):$$

Հորիզոնական բևեռացած գրգռում

Երբ սկզբնական լույսը հորիզոնական է բևեռացած, ապա ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության սիմետրիայի առանցքը դառնում է Ox առանցքը՝ $I_y=I_z$: Ուրեմն, այս առանցքի ուղղությամբ դիտվող ֆլուորեսցենցիան պետք է լինի չբևեռացած: Այս կոնֆիգուրացիան կարևոր է փորձարարական տեսանկյունից՝ որոշելու համար օպտիկական կարգավորման ոչ իդեալականության հետևանքով հնարավոր մնացորդային բևեռացումը: Այսպիսով, հորիզոնական բևեռացած ընկնող լույսով բևեռացման չափումը թույլ է տալիս կատարել ուղղումներ և ստանալ իրական առաքման անիզոտրոպիան:

Բնական լույսով գրգռում

Երբ նմուշը գրգռվում է բնական (չբևեռացած) լույսով, ապա լույսը կարելի է բաժանել երկու փոխուղղահայաց բաղադրիչների, որոնց գրգռող ազդեցությունը ֆլուորոֆորների վրա աղիտիվ է: Հորիզոնական հարթության մեջ հետազոտության դեպքում ընկնող լույսի ուղղաձիգ բաղադրիչն ունի նույն ազդեցությունը, ինչպես նկարագրված էր նախորդ դեպքում: Մինչդեռ ընկնող լույսի հորիզոնական բաղադրիչը հետազոտվող Ox առանցքի ուղղությամբ հանգեցնում է չբևեռացած ֆլուորեսցենտային առաքմանը, քանի որ Ox-ը սիմետրիայի առանցքն է՝ $I_z=I_x$:

I_V և I_H բաղադրիչները, որոնք, համապատասխանաբար, ուղղաձիգ և հորիզոնական են բևեռացած, այսպիսին են՝ $I_z=I_V=I_x$, $I_y=I_H$: Ֆլուորեսցենցիայի ընդհանուր ինտենսիվությունը կլինի՝ $2I_V+I_H$: Այս դեպքում բևեռացման հարաբերությունը և առաքման անիզոտրոպիան կլինեն՝

$$p_n = \frac{I_V - I_H}{I_V + I_H} \text{ և } r_n = \frac{I_V - I_H}{2I_V + I_H} \quad (5.4),$$

որտեղ n-ինդեքսը նշանակում է բնական (natural) գրգռող լույս: Այս երկու մեծություններն իրար հետ կապված են հետևյալ առնչությամբ՝

$$r_n = \frac{2p_n}{3 + p_n} \quad (5.5):$$

Հեշտ է ցույց տալ, որ $r_n= r/2$: Այսինքն, բնական լույսով գրգռման դեպքում դիտվող առաքման անիզոտրոպիան կազմում է ուղղաձիգ բևեռացած լույսով գրգռման դեպքում ստացվող առաքման անիզոտրոպիայի կեսը: Հաշվի առնելով իդեալական բնական (բացարձակապես չբևեռացած) լույս ստանալու դժվարությունները՝ գործնականում մշտապես կիրառվում է ուղղաձիգ բևեռացած լույս: Հարկ է նշել, որ (5.3) և (5.5) հավասարումների տարբերությունը պայմանավորված է նրանով, որ առաջին դեպքում նմուշը գրգռվում է ուղղաձիգ

բևեռացած լույսով, իսկ երկրորդ դեպքում՝ չբևեռացած (բնական) լույսով:

Երբ նմուշը պարունակում է ֆլուորոֆորների խառնուրդ, ապա դրանցից յուրաքանչյուրն ունի իր r_i առաքման անիզոտրոպիան՝

$$r_i = \frac{I_{II}^i - I_{\perp}^i}{I_{II}^i + 2I_{\perp}^i} = \frac{I_{II}^i - I_{\perp}^i}{I_i} \quad (5.6)$$

և դրանցից յուրաքանչյուրը ֆլուորեսցենցիայի ընդհանուր ինտենսիվության մեջ ունի իր՝ $f_i = I_i / I$ ($\sum_i f_i = 1$) բաժնով ներդրումը:

Գործնական տեսանկյունից չափվում են ինտենսիվության I_{II} և $I_{\perp}$ բաղադրիչները, որոնք տվյալ դեպքում իրենցից ներկայացնում են առանձին բաղադրիչների գումարները՝

$$I_{II} = \sum_i I_{II}^i \quad \text{և} \quad I_{\perp} = \sum_i I_{\perp}^i \quad (5.7)$$

և, սովորաբար, առաքման ընդհանուր անիզոտրոպիան որոշվում է նույն ձևով՝

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}} = \frac{\sum_i I_{II}^i - \sum_i I_{\perp}^i}{I} = \sum_i \frac{I_{II}^i - I_{\perp}^i}{I_i} \times \frac{I_i}{I} = \sum_i f_i r_i \quad (5.8):$$

Ամենակարևոր հետևությունն այն է, որ առաքման ընդհանուր անիզոտրոպիան առանձին անիզոտրոպիաների մասնաբաժինների գումարն է՝

$$r = \sum_i f_i r_i \quad (5.9):$$

Այս արտահայտությունը ճիշտ է ինչպես ստացիոնար, այնպես էլ ակնթարթային անիզոտրոպիայի համար:

Հարկ է նշել, որ հիմնական (ֆունդամենտալ) անիզոտրոպիան՝ r_0, որն իրենից ներկայացնում է տեսական անիզոտրոպիան ցանկացած տեսակի շարժման բացակայության պայմաններում, չի կարող գերազանցել 0.4 արժեքը: Այս արդյունքը ստացվում է՝ քննարկելով

զուգահեռ կլանման և առաքման անցման մոմենտները, որի դեպքում հիմնական անիզոտրոպիան տրվում է հետևյալ հավասարմամբ՝

$$r_0 = \frac{3\overline{\cos^2\theta} - 1}{2} = \frac{2}{5} = 0.4 \quad (5.10),$$

որտեղ θ-ն անցման մոմենտների և Oz առանցքի միջև կազմած անկյունն է, իսկ $\cos^2\theta$-ի միջին արժեքը ստացվում է 3/5: Գործնականում պտտական շարժումը կարող է քողարկվել մածուցիկ միջավայրում: Փորձնական արժեքը, որը կոչվում է սահմանային անիզոտրոպիա, միշտ ստացվում է ավելի փոքր, քան տեսականը: Երբ կլանման և առաքման անցման մոմենտները զուգահեռ են, այսինքն երբ մոլեկուլը գրգռվում է մինչև առաջին սինգլետ վիճակ, r_0 –ի տեսական արժեքը 0.4 է, սակայն փորձնական տվյալը, սովորաբար, փոփոխվում է 0.32-ից 0.39 – ի միջակայքում:

5.3. Կիրառությունները

Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացումը հզոր մեթոդ է կազմակերպված համակարգերի՝ ջրային միցելների, շրջված միցելների և միկրոէմուլսիաների, ճարպային երկշերտերի, սինթետիկ ոչ իոնային վեզիկուլների, հեղուկ բյուրեղների հոսունությունը և կողմնորոշման կարգը ուսումնասիրելու համար: Այս մեթոդը նաև շատ օգտակար է պոլիմերների մոլեկուլների սեգմենտային շարժունակությունն ուսումնասիրելու համար: Կարելի է նաև տեղեկություններ ստանալ պինդ պոլիմերների շղթաների կողմնորոշման մասին:

Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացման կիրառման ոլորտների համառոտ ցանկը ներկայացված է աղյուսակ 3-ում:

Աղյուսակ 3

Ֆլուորեսցենտային բևեռացման կիրառման ոլորտները

Ոլորտ	**Տեղեկություն**
Սպեկտրոսկոպիա	Գրգռման բևեռացման սպեկտրներ. գրգռված վիճակների տարանջատում
Պոլիմերներ	Շղթաների դինամիկա
	Պոլիմերի շրջապատի տեղային մածուցիկություն
	Մոլեկուլային կողմնորոշումները պինդ պոլիմերներում
	Պոլիմերի շղթաներով գրգռման էներգիայի տեղափոխություն
Միցելային համակարգեր	Միցելների ներքին «միկրոմածուցիկություն»
	Հոսունություն և կարգի բնութագրեր (օր. վեզիկուլների երկշերտերում)
Կենսաբանական մեմբրաններ	Հոսունություն և կարգի բնութագրեր
	Ֆազային անցման ջերմաստիճանի որոշում
	Հավելանյութերի ազդեցություն (օր. խոլեստերոլ)
Մոլեկուլային կենսաբանություն	Սպիտակուցներ (չափսը, դենատուրացիան, սպիտակուց-սպիտակուց փոխազդեցությունները և այլն)
	ԴՆԹ-սպիտակուց փոխազդեցություններ
	Նուկլեինաթթուներ (ճկունություն)
Իմունոլոգիա	Հակագեն-հակամարմին ռեակցիաներ
	Իմունոլոգիական անալիզ

Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացումը կիրառելի է նաև կապման հավասարակշռությունները հետազոտելու համար, երբ հավասարակշռությունը պայմանավորող ազատ և կապված մասնիկներն ունեն տատանման տարբեր արագություններ: Այս մեթոդով կարող են ուսումնասիրվել բազմաթիվ մոլեկուլային փոխազդեցություններ: Հարկ

է նշել, որ ի տարբերություն նշանակիր կիրառող այլ մեթոդների, ֆլուորեսցենցիայի բևեռացումն ուղղակիորեն չափում է կապված և ազատ նշանակիրների հարաբերությունը՝ առանց վերջինների նախնական ֆիզիկական բաժանման: Ավելին, չափումներն իրականացվում են իրական ժամանակում՝ տեղեկություն տալով ասոցման և դիսոցման ռեակցիաների կինետիկայի մասին:

ԳԼՈՒԽ ՎԵՑԵՐՈՐԴ

ՄԻՋՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ԱՌԱՔՄԱՆ ՎՐԱ

6.1 Ֆլուորեսցենցիայի մարում. Միջմոլեկուլային փոխազդեցություններով պայմանավորված ապագրգռման պրոցեսները

Ֆլուորեսցենցիայի մարում անվանվում են բոլոր այն պրոցեսները, որոնք փոքրացնում են տվյալ նյութի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը: Մարման օրինակներ են ռեակցիաները ֆլուորոֆորի գրգռված վիճակում, էներգիայի փոխանցումը, կոմպլեքսի առաջացումը և մարումը բախման ժամանակ: Հայտնի են մարման երկու հիմնական պրոցեսներ.

ա) մարում, պայմանավորված ֆլուորոֆորի և մարիչի միջև տեղի ունեցող պատահական բախմամբ: Դա այսպես կոչված դինամիկ մարում է, կամ էլ մարում բախումով,

բ) մարում կոմպլեքսի առաջացումով, որը կոչվում է ստատիկ մարում:

Նշենք, որ ստատիկ մարման առկայությունը հաճախ դժվարացնում է բացահայտել դինամիկ մարումով պայմանավորված ներդրումը: Բոլոր դեպքերում թե՛ դինամիկ, թե՛ ստատիկ մարման համար անհրաժեշտ է բախում ֆլուորոֆորի և մարիչի մոլեկուլների միջև:

Դինամիկ մարման ժամանակ մարիչը պետք է դիֆուզվի դեպի ֆլուորոֆորը վերջինի գրգռված վիճակում գտնվելու ժամանակահատվածում: Բախման հետևաքով ֆլուորոֆորը վերադառնում է հիմնական վիճակին՝ առանց ֆոտոնի ճառագայթման:

Ստատիկ մարման ժամանակ ֆլուորոֆորի և մարիչի միջև գոյանում է կոմպլեքս, որը չի ֆլուորեսցենցում: Մարման իրագործման հիմնական պահանջը ֆլուորոֆորի և մարիչի բախումն է: Այդ իսկ պատճառով, եթե լուծիչը շատ մածուցիկ է, ապա դիֆուզիան դանդաղում է, և մարումը թուլանում է: Հետևաբար, ուսումնասիրելով մարումը, կարելի է որոշել մարիչների դիֆուզիայի արագությունները:

Մեկ այլ կիրառական նշանակություն ունեցող մարման օրինակ է մարիչի փոխազդեցության հնարավորությունը սպիտակուցին կամ մեբրանին կապված ֆլուորոֆորի հետ: Եթե սպիտակուցը կամ մեմբրանը թափանցիկ չեն (հասանելի չեն) մարիչի համար, իսկ ֆլուորոֆորը տեղայնացված է մակրոմոլեկուլի ներսում, ապա չի կարող իրագործվել ոչ դինամիկ, ոչ էլ ստատիկ մարում: Այսպիսով, ելնելով այս դատողությունից, մարումը (մարման պրոցեսը) կարելի է օգտագործել՝ սպիտակուցում և մեմբրանում ֆլուորոֆորի տեղայնացումը և մարիչների նկատմամբ դրա հասանելիությունը ի հայտ բերելու համար:

Դինամիկ մարումն ունի մեկ այլ կարևոր նշանակություն կապված ֆլուորոֆորի և մարիչի միջև հեռավորության գնահատման հետ:

Միջին քառակուսային հեռավորությունը՝ $(\Delta x^2)^{1/2}$-ը, որին մարիչը կարող է դիֆուզվելով հասնել ֆլուորոֆորի գրգռված վիճակի կյանքի տևողության ժամանակ (τ), որոշվում է հետևյալ հավասարմամբ.

$$(\Delta x^2)^{1/2} = (2D\tau)^{1/2} \quad (6.1),$$

որտեղ D-ն դիֆուզիայի գործակիցն է: Որպես այս հավասարման կիրառման օրինակ դիտարկենք թթվածնի մոլեկուլը ջրում $25^{o}C$ ջերմաստիճանում, որի համար $D = 2.5\times10^{-5}$ սմ^2/վ: Ընդունելով, որ ֆլու-

ռեսցենցիայի իրականացման բնութագրական ժամանակը 4 նվ է, այդ ընթացքում թթվածնի մոլեկուլը կկարողանա դիֆուզվել և հայտնվել ֆլուորոֆորից մինչև 45 Å հեռավորության վրա:

6.2. Ֆլուորեսցենցիայի մարիչներ

Ամենատարածված դինամիկական մարիչներից է մոլեկուլային թթվածինը, որը մարում է համարյա բոլոր հայտնի ֆլուորոֆորների ֆլուորեսցենցիան: Այդ իսկ պատճառով, կախված հետազոտվող նմուշի բնույթից, որպեսզի ստանանք հավաստի տվյալներ ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքերի վերաբերյալ, անհրաժեշտ է հեռացնել լուծված թթվածինը: Չտեղակալված արոմատիկ ածխաջրածինների ֆլուորեսցենցիայի մարման արդյունավետ մարիչներ են հանդիսանում արոմատիկ և ալիֆատիկ ամինները: Օրինակ, անտրացենի ֆլուորեսցենցիան զգալի չափով մարվում է դիէթիլանիլինով: Այս դեպքում, մարումը իրագործվում է գրգռված վիճակում լիցքի տեղափոխումով կոմպլեքսի առաջացմամբ: Ըստ որում, գրգռված վիճակում գտնվող ֆլուորոֆորը՝ անտրացենը, հանդես է գալիս որպես էլեկտրոնակցեպտոր՝ ընդունելով էլեկտրոն ամինից:

Ոչ բևեռային լուծիչներում հաճախ դիտվում է ֆլուորեսցենցիա լիցքի տեղափոխումով առաջացած կոմպլեքսից և այդ պրոցեսը կարելի է դիտարկել որպես գրգռված վիճակում տեղի ունեցող ռեակցիա:

Որպես մարիչներ կարող են հանդես գալ նաև ծանր ատոմների իոնները, ինչպիսիք են յոդիդ և բրոմիդ անիոնները:

Դիֆուզիոն մարիչներ են հանդիսանում նաև քսենոնը, ջրածնի պերօքսիդը, ակրիլամիդը, որոշ օլեֆիններ:

Շատ մարիչներ պիտանի են սպիտակուցների ֆլուորեսցենցիայի ուսումնասիրման համար, հատկապես տրիպտոֆանային մնա-

ցորդների մակերևույթին մարիչների հասանելիության հնարավորության քննարկման ժամանակ:

6.3. Դինամիկ մարում

Ֆլուորեսցենցիայի դինամիկ (բախումային) մարումը նկարագրվում է Շտեռնի-Ֆոլմերի հավասարումով՝

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (6.2),$$

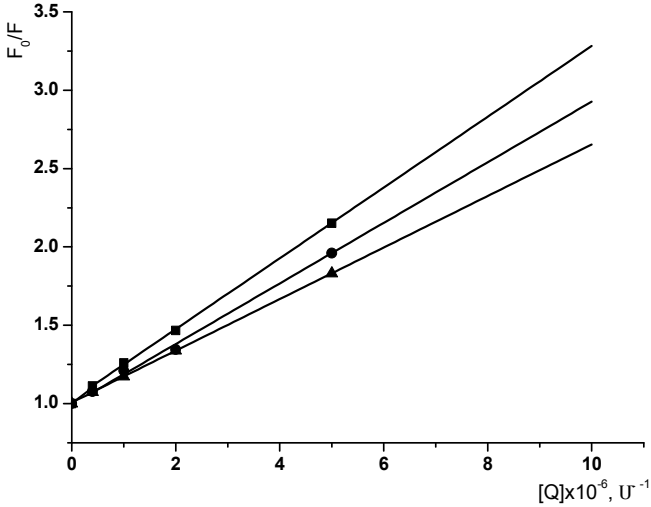
որտեղ F_0-ն և F-ը ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություններն են՝ համապատասխանաբար մարիչի բացակայության և առկայության դեպքում, k_q-ն՝ բիմոլեկուլային բախման հաստատունը, τ_0-ն՝ ֆլուորոֆորի կյանքի տևողությունը մարիչի բացակայության պայմաններում, $[Q]$-ն՝ մարիչի կոնցենտրացիան:

Շտեռնի-Ֆոլմերի մարման հաստատունը՝ K_D-ն, տրվում է հետևյալ ձևով՝

$$K_D = k_q \tau_0 \quad (6.3):$$

Եթե մարումն ընթանում է դինամիկ մեխանիզմով, ապա Շտեռնի-Ֆոլմերի հաստատունը տրվում է K_D- ով: Բոլոր մնացած դեպքերում այն տրվում է որպես K_{SV}: Շտեռնի-Ֆոլմերի հաստատունը ցույց է տալիս մարիչի նկատմամբ ֆլուորոֆորի ունեցած զգայնությունը: Մակրոմոլեկուլի ներսում գտնվող ֆլուորոֆորը, սովորաբար, անմատչելի է ջրալույծ մարիչներին, որի հետևանքով դրա արժեքը փոքր է: K_{SV}-ի մեծ արժեքներ ստացվում են, երբ ֆլուորոֆորը լուծույթում ազատ է, կամ, օրինակ, գտնվում է կենսամոլեկուլի մակերեսին: Մարման տվյալները, սովորաբար, ներկայացնում են գրաֆիկորեն՝

F_0 / F -հարաբերության կախվածությունը $[Q]$ -ից, որը բերված է նկ. 6.1-ում:



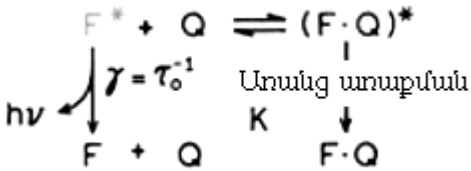
Նկ. 6.1 Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածությունը:

Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունների հարաբերության առանցքից կտրած հատվածը հավասար է 1-ի, իսկ ուղղի թեքության անկյան արժեքից կարելի է հաշվել K_D- ն: Ուղղագծային կախվածությունը, սովորաբար, ցույց է տալիս, որ լուծույթում գոյություն ունեն միայն մի տիպի ֆլուորոֆորներ, որոնք հավասարաչափ հասանելի են մարիչին: Եթե առկա են երկու տիպի ֆլուորոֆորներ, և դրանցից մեկը հասանելի չէ մարիչին, ապա Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածությունն ուղղագծայինից շեղվում է դեպի մարիչի կոնցենտրացիայի առանցքը: Նման բան դիտվում է, երբ սպիտակուցներում Trp-այինմնացորդների ֆլուորեսցենցիան մարում է բևեռային կամ լիցքակիր մարիչով: Այս մարիչները չեն ներթափանցում սպիտակուցների հի-

ռոֆոր միջավայր, այլ մարում են միայն սպիտակուցի արտաքին մակերևույթին տեղակայված Trp-ային մնացորդները: Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածությունը ուղղագծայինից շեղվում է դեպի F_0 / F առանցքը այն դեպքում, երբ համակարգում մարիչի կապման հետևանքով ի հայտ են գալիս կապման այլ կենտրոններ:

6.4. Ստատիկ մարում

Մարում կարող է տեղի ունենալ նաև ֆլուորոֆորի և մարիչի միջև հիմնական վիճակում չֆլուորեսցենցող կոմպլեքսի առաջացման հետևանքով (նկ. 6.2):



Նկ. 6.2 Ստատիկ մարման մեխանիզմը:

Ստատիկ մարման համար ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության կախվածությունը մարիչի կոնցենտրացիայից հեշտ է դուրս բերել՝ օգտագործելով կոմպլեքսի առաջացման (ասոցման) հաստատունը, որն արտահայտվում է այսպես՝

$$F + Q \xrightarrow{K} F \cdot Q \qquad (6.4),$$

$$K = \frac{[F \cdot Q]}{[F] \cdot [Q]} \qquad (6.5),$$

որտեղ $[F \cdot Q]$-ն առաջացած կոմպլեքսի, $[F]$-ը՝ չկապված ֆլուորոֆորի, $[Q]$-ն՝ մարիչի կոնցենտրացիան է: Եթե առաջացած կոմպլեքսը չի ֆլուորեսցենցում, ապա դիտվող ֆլուորեսցենցիան պայմանավորված է կոմպլեքսագոյացմանը չմասնակցած ֆլուորոֆորներով: Ֆլուորոֆորի ընդհանուր կոնցենտրացիան՝ $[F_0]$-ն կարտահայտվի հետևյալ ձևով՝

$$[F_0] = [F] + [F \cdot Q] \quad (6.6):$$

Այս արտահայտությունը տեղադրենք (6.5) հավասարման մեջ, կստանանք՝

$$K = \frac{[F_0] - [F]}{[F] \cdot [Q]} = \frac{[F_0]}{[F] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (6.7):$$

Ֆլուորոֆորի կոնցենտրացիաները կարելի է փոխարինել ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվություններով և ձևափոխել արտահայտությունը՝

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad (6.8):$$

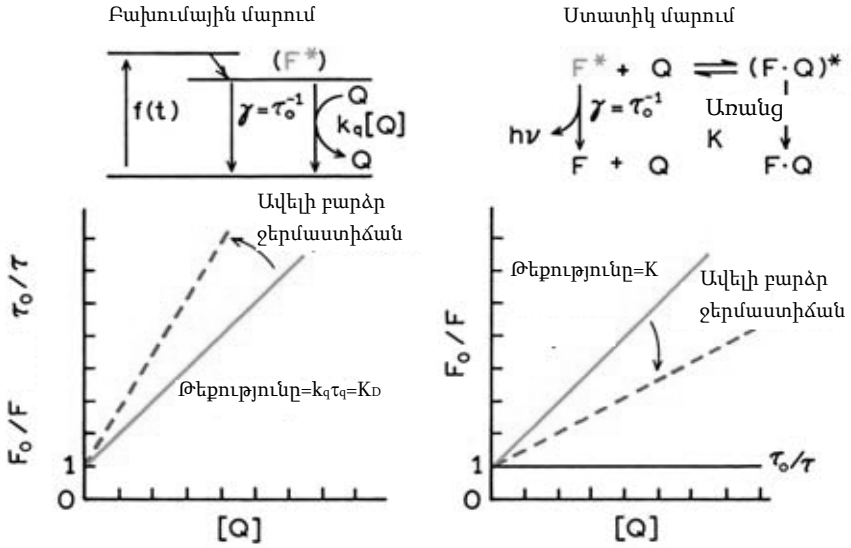
Նշենք, որ F_0 / F -ի կախվածությունը $[Q]$-ից նման է դինամիկ մարման դեպքում ստացած կախվածությանը, բացառությամբ, որ այստեղ մարման արագության հաստատունը փոխարինվում է ասոցման հաստատունով:

6.5. Ստատիկ և դինամիկ մարումների համեմատությունը

Ե՛վ ստատիկ, և՛ դինամիկ մարման ժամանակ Շտեռնի – Ֆոլմերի կախվածությունը գծային է: Մարման մեխանիզմները կարելի է տարբերել՝ ելնելով Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածության՝ ջերմաստիճանի կամ մածուցիկության փոփոխությունից ունեցած ընթացքից, և

որն առավել նախընտրելի է՝ ֆլուորոֆորի կյանքի տևողության չափումներից:

Դինամիկ մարումը կախված է դիֆուզիայից: Քանի որ ջերմաստիճանի բարձրացումը բերում է դիֆուզիայի գործակցի մեծացմանը, ապա կարելի է սպասել, որ ջերմաստիճանի բարձրացման հետ բիմոլեկուլային բախման արագության հաստատունը մեծանում է: Արդյունքում, ջերմաստիճանը բարձրացնելիս Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածությունը թեքվում է դեպի F_0/F առանցքը: Ստատիկ մարման դեպքում ջերմաստիճանը բարձրացնելիս փոքրանում է կոմպլեքսի կայունությունը (փոքրանում է կոմպլեքսի կայունության հաստատունը) և Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածությունը թեքվում է դեպի [Q]-ի առանցքը (նկ. 6.3):



Նկ. 6.3 Ջերմաստիճանի ազդեցությունը դինամիկ և ստատիկ մարումների վրա:

Ինչպես նշվեց, ֆլուորեսցենցիայի կյանքի տևողության չափումը լավագույն եղանակն է պարզելու մարումը դինամիկ է, թե՝ ստատիկ: Ստատիկ մարման ժամանակ ֆլուորոֆորների մի մասնաբաժին դուրս է գալիս դիտարկումից, քանի որ կոմպլեքսագոյացված ֆլուորոֆորները չեն ֆլուորեսցենցում և դիտվող ֆլուորեսցենցիան արդյունք է չկոմպլեքսագոյացված ֆլուորոֆորների: Ուստի կոմպլեքսի մեջ չկապված ֆլուորոֆորները գրգռված չեն և դրանց կյանքի տևողությունը կլինի τ_0: Ստացվում է, որ ստատիկ մարման դեպքում $\tau_0/\tau = 1$, մինչդեռ դինամիկ մարման դեպքում՝

$$F_0 / F = \tau_0 / \tau \quad (6.9):$$

Դինամիկ և ստատիկ մարումները կարելի է տարբերել նաև էլեկտրոնային կլանման սպեկտրների օգտագործմամբ, որտեղ ստատիկ մարման դեպքում ի հայտ կգա հիմնական վիճակում առաջացող կոմպլեքսը: Բախումային մարումը ազդում է ֆլուորոֆորի գրգռված վիճակի վրա և չի կարող ազդել էլեկտրոնային կլանման սպեկտրների վրա: Ի տարբերություն դրա, հիմնական վիճակում առաջացող կոմպլեքսը կարտահայտվի կլանման սպեկտրներում՝ կոմպլեքսագոյացված և ազատ ֆլուորոֆորների էքստինկցիայի տարբեր արժեքների հետևանքով:

Շատ դեպքերում ֆլուորոֆորը կարող է մարվել նույն մարիչի հետ և բախումների և կոմպլեքս առաջացնելու հետևանքով: Այս պարագայում Շտեռնի-Ֆոլմերի կախվածության առանձնահատկությունը կայանում է նրանում, որ այն ուղղագծայինից շեղվում է՝ ձեռք բերելով թեքվածություն դեպի F_0 / F առանցքը: Այս դեպքում մենք գործ ունենք խառը կամ կոմբինացիոն մարման հետ:

6.6. Էքսիմերների և էքսիպլեքսների առաջացումը

Բիմոլեկուլային գոյացումը, որում իրագործվում է մարումը, իրենից պետք է ներկայացնի կամ բախման կոմպլեքս, կամ էլ էքսիպլեքս (էքսիմեր): Նախ տանք վերջիններիս բնութագրումը՝ էքսիմերները դիմերներ են գրգռված վիճակում: Դրանք առաջանում են գրգռված մոլեկուլի՝ ($^1M^*$) և դրա իդենտիկ ոչ գրգռված մոլեկուլի՝ (^1M) բախման հետևանքով.

$$^1M^* + {}^1M = {}^1(MM)^* :$$

(MM)* նշանակումը հենց վերաբերում է էքսիպլեքսին, որտեղ գրգռված վիճակի էներգիան բաշխված է երկու մոլեկուլների վրա:

Իսկ էքսիպլեքսները գրգռված վիճակում առաջացած կոմպլեքսներն են: Նրանք գրգռված մոլեկուլի (լինի դա էլեկտրոնդոնոր՝ $^1D^*$, թե էլեկտրոնակցեպտոր $^1A^*$ մոլեկուլը) և ոչ գրգռված տարբերակվող մոլեկուլի (լինի դա էլեկտրոնդոնոր՝ D, թե էլեկտրոնակցեպտոր՝ A մոլեկուլը) բախման արդյունք են՝

$$^1D^* + A = {}^1(DA)^*$$

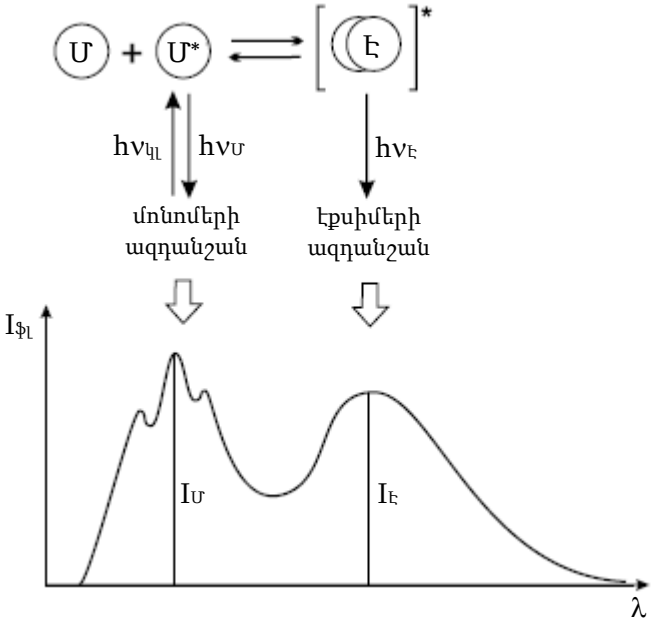
$$^1A^* + D = {}^1(DA)^* :$$

Քանի, որ էքսիմերների և էքսիպլեքսների առաջացումը դիֆուզիոն վերահսկվող պրոցեսներ են, ապա նշված գոյացումները հնարավոր է գրանցել դոնորի և ակցեպտորի համեմատաբար բարձր կոնցենտրացիաների մարզում, որը և կապահովի բավարար քանակով բախումներ մոլեկուլների գրգռված վիճակում գտնվելու ժամանակահատվածում:

Էքսիմերները՝ $^1(MM)^*$, ինչպես նաև էքսիպլեքսները՝ $^1(DA)^*$, իրենցից ներկայացնում են գոյացումներ, որոնք գտնվում են մակերևույթների պոտենցիալ էներգիայի մինիմումում և հենց այդ պատճառով էլ ունեն որոշակի երկրաչափություն:

Շատ արոմատիկ ածխաջրածիններ, ինչպես օրինակ նավթալենը կամ պիրենը, կարող են առաջացնել էքսիմերներ: Ըստ որում,

մոլեկուլները դասավորվում են միմյանց զուգահեռ, և էքսիմերին համապատասխանող ֆլուորեսցենտային ազդանշանը ի հայտ է գալիս ավելի մեծ ալիքի երկարության տակ, քան մոնոմերով պայմանավորված ֆլուորեսցենտային ազդանշանը: Մյուս կարևոր առանձնահատկությունն այն է, որ էքսիմերի ազդանշանը չունի տատանողական նուրբ կառուցվածք (նկ. 6.4)՝



Նկ. 6.4 Էքսիմերի առաջացումը՝ մոնոմերի և էքսիմերի ազդանշանների հետ միասին:

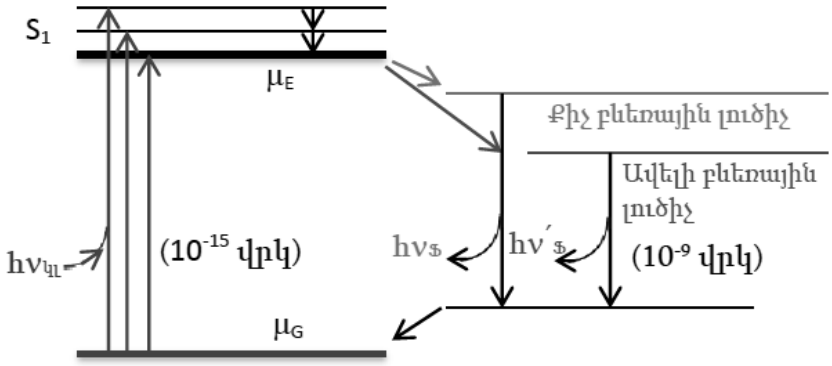
Ինչ վերաբերում է էքսիպլեքսներին, ապա նշենք, որ դրանք առաջանում են որոշակի ստեխիոմետրիայով, սովորաբար՝ 1:1 հարաբերությամբ: Էքսիպլեքսի առաջացման դասական օրինակ է գրգռված վիճակի կոմպլեքսը, որն առաջանում է անտրացենի և դիէթիլանիլինի միջև՝ շնորհիվ ամինի մոլեկուլից գրգռված անտրացենի

մոլեկուլին էլեկտրոնի անցման: Ոչ բևեռային լուծիչներում (օրինակ՝ հեքսան) էքսիպլեքսի ֆլուորեսցենցիան երևան է գալիս լայն, առանց նուրբ կառուցվածքի ազդանշանի տեսքով, որը սպեկտրում տեղակայված է ավելի երկար ալիքի երկարության տակ՝ ի համեմատ անտրացենի ազդանշանի: Լուծիչի բևեռայնության մեծացման հետ էքսիպլեքսի ազդանշանը շեղվում է դեպի երկարալիքային մարզ:

ԳԼՈՒԽ ՅՈԹԵՐՈՐԴ

ԼՈՒԾԻՉԻ ԲԵՎԵՌԱՅՆՈՒԹՅԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ՍՊԵԿՏՐՆԵՐԻ ՎՐԱ

Նախորդ բաժիններում արդեն նշվել է այն հիմնական պատճառը, համաձայն որի ֆլուորոֆորի առաքումը իրագործվում է ավելի երկար ալիքի տակ, քան կլանումը (ստոքսյան շեղում): Այդ շեղումն ավելի զգալի է դառնում լուծիչի բևեռայնության մեծացման հետ՝ պայմանավորված բևեռային լուծիչի մոլեկուլներով գրգռված վիճակի կայունացմամբ (նկ. 7.1):



Նկ. 7.1 Յաբլոնսկու դիագրամը ֆլուորեսցենցիայի համար՝ ներառյալ լուծիչի ռելաքսացիան:

Նշենք, որ սովորաբար, ֆլուորոֆորի գրգռված վիճակի դիպոլ մոմենտը՝ μ_E ավելի մեծ է, քան հիմնական վիճակինը՝ μ_G:

7.1. Լուծիչի ընդհանրական ազդեցությունը. Լիպերտի-Մատագայի հավասարումը

Ֆլուորեսցենտային սպեկտրների վրա լուծիչի ընդհանրական ազդեցությունը քննարկելիս ֆլուորոֆորը դիտվում է որպես դիպոլ, որը գտնվում է չփոփոխվող դիէլեկտրիկ հաստատուն ունեցող միջավայրում:

Ֆլուորոֆորի և լուծիչի միջև փոխազդեցություններն ազդում են հիմնական և գրգռված վիճակների էներգիաների տարբերության վրա: Առաջին մոտեցմամբ էներգիայի այս տարբերությունը կախված է լուծիչի բեկման ցուցիչից (n), դիէլեկտրիկ հաստատունից (ε) և նկարագրվում է Լիպերտի-Մատագայի հավասարումով՝

$$\bar{\nu}_{\text{կլ}} - \bar{\nu}_{\text{ֆ}} \approx 2/hc\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1}\right)\frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + const \quad (7.1)$$

որտեղ $\bar{\nu}_{\text{կլ}} - \bar{\nu}_{\text{ֆ}}$-ն կլանմանը և առաքմանը համապատասխանող ալիքային թվերի տարբերությունն է, h-ը՝ Պլանկի հաստատունը, c-ն՝ լույսի արագությունը, μ_E-ն և μ_G-ն գրգռված և հիմնական վիճակների դիպոլ մոմենտներն են, α-ն՝ խոռոչի շառավիղը, որի ներսում գտնվում է ֆլուորոֆորը:

$$\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1} - \frac{n^2-1}{2n^2+1}\right)$$

արտահայտությունը կոչվում է օրիենտացիոն բևեռացում և նշանակվում է Δf – ով:

$\left(\frac{\varepsilon-1}{2\varepsilon+1}\right)$-ը վերաբերում է այն սպեկտրալ շեղումներին, որոնք պայմանավորված են լուծիչի դիպոլների վերակողմնորոշմամբ և էլեկտրոնային խտության վերաբաշխմամբ: $\left(\frac{n^2-1}{2n^2+1}\right)$-ը համապատասխանում է էլեկտրոնային խտության վերաբաշխմանը: Այս երկու անդամների տարբերությունը բացատրում է սպեկտրալ այն շեղումները, որոնք պայմանավորված են լուծիչի մոլեկուլների վերակողմնորոշմամբ: Ըստ այս տեսության էական ստոքսյան շեղումների բերում է միայն լուծիչի մոլեկուլների վերակողմնորոշումը: Էլեկտրոնային խտության վերաբաշխումը կատարվում է ակնթարթորեն և մոտավորապես նույն չափով կայունանում են ինչպես գրգռված, այնպես էլ հիմնական վիճակները: Արդյունքում բեկման ցուցիչը և էլեկտրոնային խտության վերաբաշխումը համեմատաբար փոքր ազդեցություն են ունենում ստոքսյան շեղման վրա:

Կարելի է ընդունել, որ ֆլուորոֆորի զգայնությունը լուծիչի նկատմամբ համեմատական է $(\mu_E-\mu_G)^2$–ուն: Այս անդամը հաստատուն մեծություն է տվյալ ֆլուորոֆորի համար: Լիպերտի կախվածության՝ $\left(\bar{\nu}_{կլ}-\bar{\nu}_{ֆ}\right)=f\left(\Delta f\right)$, գծային լինելը կարելի է ընդունել որպես ապացույց այն բանի, որ համակարգում գերիշխում են ընդհանրական փոխազդեցությունները: Կախվածության շեղումները գծայնությունից ցույց են տալիս, որ համակարգում առկա են յուրահատուկ փոխազդեցություններ:

7.2. Լուծիչի յուրահատուկ ազդեցությունը

Քննարկելով լուծիչի բևեռայնության ազդեցությունը առանձնահատուկ ուշադրության են արժանի հիդրոքսիլ ֆունկցիոնալ խումբ պարունակող միացությունները, որոնք ունակ են յուրահատուկ փոխազդեցության մեջ մտնել ֆլուորոֆորների հետ՝ ջրածնական կապի առաջացումով:

Ջրածնական կապի ազդեցությունը կլանման և ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրների վրա

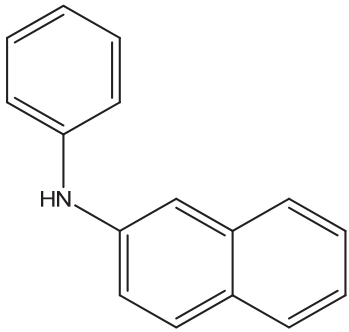
$n \rightarrow \pi^*$ անցման դեպքում գրգռման հետևանքով հետերոատոմի վրա, ինչպիսին է ազոտի ատոմը, էլեկտրոնային խտությունը նվազում է: Արդյունքում տվյալ հետերոատոմն ավելի քիչ է ունակ առաջացնել ջրածնական կապեր: Կլանման վրա այս փոփոխությունն ունի նույն ազդեցությունը, ինչ գրգռման հետևանքով դիպոլ մոմենտի փոքրացումը: Ուստի, կլանման սպեկտրում սպասվում է կապույտ շեղում և որքան մեծ է ջրածնական կապի ուժը, այնքան շեղումը մեծ է: Սա $n - \pi^*$ կապին բնութագրական չափանիշ է: Սպեկտրի շեղումը կարող է օգտագործվել ջրածնական կապի էներգիան որոշելու համար:

Հեշտությամբ կարելի է ենթադրել, որ սինգլետ $n - \pi^*$ վիճակից առաքված ֆլուորեսցենցիան միշտ ավելի քիչ զգայուն է լուծիչի՝ ջրածնական կապ առաջացնելու հատկության նկատմամբ, քան կլանումը: Եթե ազոտ պարունակող հետերոցիկլում (օր. մեթանոլի լուծույթում) $n \rightarrow \pi^*$ գրգռումը հանգեցնում է ջրածնական կապի քանդմանը (օր. N…$HOCH_3$), ապա ֆլուորեսցենտային սպեկտրը կկրի միայն թեթևակի ազդեցություն՝ պայմանավորված ջրածնական կապ առաջացնելու լուծիչի հատկությամբ, քանի որ առաքումը տեղի է ունենում $n - \pi^*$ վիճակից՝ ջրածնական կապերի բացակայությամբ:

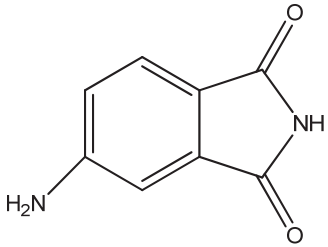
$\pi \to \pi^*$ անցման դեպքում հիմնականում հետերոատոմ (օր. N) պարունակող հետերոցիկլը գրգռված վիճակում ավելի հիմնային է, քան հիմնական վիճակում: Արդյունքում գրգռված մոլեկուլը կարող է ավելի ուժեղ ջրածնական կապ առաջացնել, քան հիմնական վիճակում գտնվող մոլեկուլը: Ուստի, $\pi^* \to \pi$ ֆլուորեսցենցիան ավելի զգայուն է ջրածնական կապի նկատմամբ, քան $\pi \to \pi^*$ կլանումը:

Յուրահատուկ փոխազդեցությունների ազդեցության օրինակներ

Յուրահատուկ փոխազդեցությունների զգալի ազդեցության լավագույն օրինակներից մի քանիսը ներկայացված են ստորև: 2-անիլինոնավթալինի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրն էականորեն փոխվում է ցիկլոհեքսանին 0.2% էթանոլ ավելացնելիս, իսկ 3% էթանոլ պարունակող լուծույթում սպեկտրը միայն աննշան է տարբերվում մաքուր էթանոլում դիտվող սպեկտրից: Այս էֆեկտն, անկասկած, պայմանավորված է յուրահատուկ փոխազդեցություններով, որոնք ի հայտ են գալիս ընտրողական սոլվատացիայի շնորհիվ: Այս հետազոտությունը ցույց է տալիս, որ ջրածնական կապ առաջացնող լուծիչի շատ քիչ քանակությունը բավարար է ֆլուորոֆորի ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրում զգալի փոփոխություններ առաջացնելու համար, մինչդեռ լուծիչի մակրոսկոպիկ հատկությունները (դիէլեկտրիկ հաստատուն, բեկման ցուցիչ) էականորեն չեն փոփոխվում:



2-անիլինոնավթալին



4-ամինոֆտալիմիդ

Մեկ այլ հետաքրքիր օրինակ է 4-ամինոֆտալիմիդը (4-ԱՖ): Քանի որ գրգռման արդյունքում դիպոլ մոմենտն աճում է՝ մոտ 4 Դ, դժվար է ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրում ակնկալել բևեռայնությամբ պայմանավորված լայն շեղում: Մասնավորապես, ոչ բևեռային դիէթիլեթերից (ε=4.2) ացետոնիտրիլին (ε=35.9) անցնելիս ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրում շեղումը միայն 33 նմ է, մինչդեռ շեղումը շատ ավելի լայն է ջրածնական կապ առաջացնող լուծիչներում, ինչպիսիք են սպիրտները և ջուրը (օր. 93 նմ մեթանոլում): Միանշանակ այսպիսի շեղումը պայմանավորված է յուրահատուկ փոխազդեցություններով: 4-ԱՖ-ի ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը բարձր է ոչ բևեռային և բևեռային ապրոտոնային լուծիչներում, սակայն շատ փոքր է պրոտոնային լուծիչներում (0.1 մեթանոլում և 0.01 ջրում), քանի որ ջրածնական կապը, հավանաբար, մեծացնում է միջհամակարգային անցումը: Ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքի այս փոփոխությունների համաձայն՝ գրգռված վիճակի կյանքի տևողությունն ավելի երկար է ապրոտոնային լուծիչներում (14-15 նվրկ), քան պրոտոնային լուծիչներում (≈1 նվրկ ջրում):

4-ԱՖ-ն կիրառվել է որպես նշանակիր միցելային միջավայրում: Նշանակիրը տեղակայվում է միցելային մակերևույթին և շատ հարմար է միցելային ագրեգատացումն ուսումնասիրելու համար: ՄԱՆ-ի

կոնցենտրացիայից կախված ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության կտրուկ փոփոխությունը թույլ է տալիս որոշել միցելագոյացման կրիտիկական կոնցենտրացիան (ՄԿԿ): 4-ԱՖ-ի էլեկտրաչեզոքությունը և դրա փոքր չափերը հանդիսանում են վերջինի ամենամեծ առավելությունները:

Հիմնվելով ֆլուորֆորի տարբեր տիպի լուծիչների հետ փոխազդեցության բնույթից և ստոքսյան շեղման չափից կարելի է որոշել ֆլուորոֆորի տեղայնացման վայրը: Ֆլուորեսցենտային սպեկտրների վրա լուծիչի ազդեցության ուսումնասիրությունը հնարավորություն է տալիս տեղեկություն ստանալ ֆլուորոֆորի շրջապատի մասին և որոշել սպիտակուցի կամ թաղանթների հետ ֆլուորոֆորի տեղայնացման վայրը:

ԳԼՈՒԽ ՈՒԹԵՐՈՐԴ

ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՈՍԿՈՊԻԱՅԻ ԿԻՐԱՌՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՒՄ

Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդը հատկապես կարևորվում է սպիտակուցների, ԴՆԹ-ի, լիպիդների, թաղանթների կայունության, կառուցվածքային փոփոխությունների և փոխազդեցությունների ուսումնասիրություններում: Նշված խնդիրների շարքում սպիտակուցները առանձնահատուկ տեղ են գրավում այս մեթոդի օգտագործման տեսակետից, քանի որ օժտված են սեփական ֆլուորեսցենցիայով, այսինքն ֆլուորեսցենցելու հատկությամբ, որը պայմանավորված է ֆլուորեսցենցող երեք ամինոթթուների՝ ֆենիլալանինի, թիրոզինի և տրիպտոֆանի առկայությամբ: Լիպիդները, թաղանթները, սախարիդները չունեն ֆլուորեսցենցելու հատկություն, իսկ ԴՆԹ-ի ֆլուորեսցենցիան շատ թույլ է, որը նպատակահարմար չէ օգտագործել քանակական ուսումնասիրությունների համար: Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիական հետազոտությունների մի կարևոր մաս կապված է ֆլուորեսցենտային նշանակիրների օգտագործման հետ: Հայտնի են բազմաթիվ ֆլուորեսցենտային նշանակիրներ:

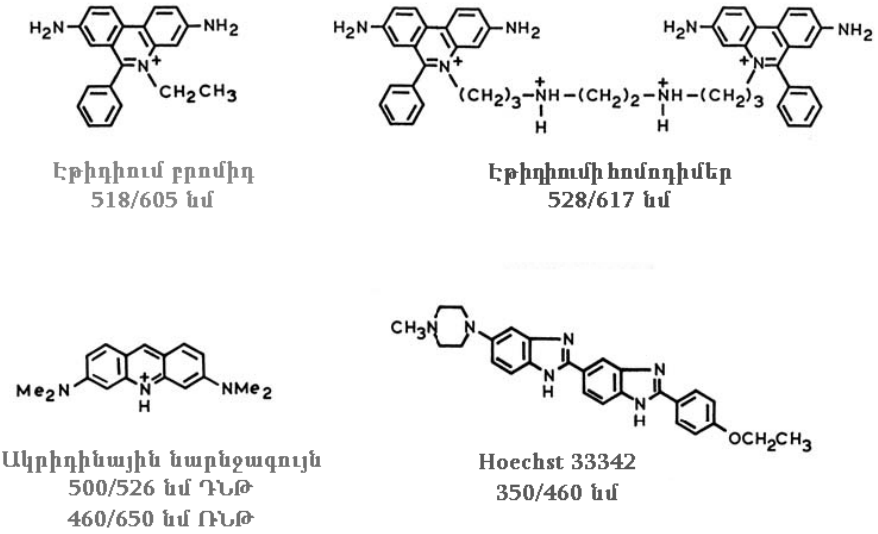
Ֆլուորոֆորները կարելի է բաժանել երկու հիմնական դասի՝ ներքին և արտաքին: Ներքին ֆլուորոֆորներ են նրանք, որոնք բնականորեն առկա են տվյալ մակրոմոլեկուլում, օրինակ, արոմատիկ ամինոթթուները, ֆլավինները, պիրիդոքսիլի ածանցյալները, քլորո-

ֆիլը, նիկոտինամիդ – ադենին - դինուկլեոտիդը (ՆԱԴ - NADH): Արտաքին ֆլուորոֆորները ավելացվում են նմուշին ֆլուորեսցենցիա առաջացնելու համար՝ երբ բնականորեն այն չկա, կամ նմուշի սպեկտրալ հատկությունները փոխելու համար: Արտաքին ֆլուորոֆորներ են դանսիլը, ֆլուորեսցեինը, ռոդամինը և շատ այլ նյութեր:

8.1. ԴՆԹ-ի նշանադրումը

ԴՆԹ-ի նշանադրումը հատկապես կարևորվում է այն տեսանկյունից, որ ԴՆԹ-ի համար դիտվում է շատ թույլ ֆլուորեսցենցիա, այն էլ հեռու ՈՒՄ մարզում, որը պրակտիկ տեսանկյունից անհարմար է օգտագործման համար: Կան բազմաթիվ ֆլուորոֆորներ, որոնք ինքնաբերաբար կապվում են ԴՆԹ-ի հետ՝ ցուցաբերելով նկատելի առաքում: ԴՆԹ-ի համար լայն տարածում գտած նշանակիրներից է էթիդիումի բրոմիդը (ԷԲ): Այն թույլ ֆլուորեսցենցում է ջրում, իսկ ԴՆԹ-ի հետ միանալիս ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունն աճում է 30 անգամ: ԷԲ-ի գրգռված վիճակի կյանքի տևողությունը ջրում մոտ 1.7 նվրկ է, ԴՆԹ-ի երկպարույրի հետ կապվելիս այն հասնում է մինչև 20 նվրկ: ԷԲ-ի կապումը իրականանում է ԴՆԹ-ի երկպարույրի հիմքերի զույգերի միջև ԷԲ-ի հարթ արոմատիկ օղակի ներդրման (ինտերկալյացիա) ճանապարհով: ԴՆԹ-ի շատ նշանակիրներ, ինչպիսին ակրիդինային նարնջագույնն է, նույնպես կապվում է ներդրման մեխանիզմով: Այլ տիպի նշանակիրներ, ինչպիսիք են DAPI-ն, Hoechst 33342-ը, կապվում են ԴՆԹ-ի փոքր ակոսում: DAPI-ն շատ զգայուն է դառնում, երբ կապվում է ԴՆԹ-ի ադենին-թիմին զույգով հարուստ մասում: Hoechst 33342-ն կապվում է հիմքերի զույգերի որոշակի դասավորվածության դեպքում: Վերջին տարիներին առաջարկվել են ԴՆԹ-ի նկատմամբ բարձր խնամակցություն ունեցող ներկեր, որոնք հիմնականում հայտնի ներկերի դի-

մերներ են, օրինակ էթիդիումի հոմոդիմերը, դրականորեն լիցքավորված երկարաշղթա TOTO-1 ներկը: Նման ներկերը մնում են կապված ԴՆԹ-ին գելային էլեկտրոֆորեզի ժամանակ՝ հնարավորություն տալով բարձր զգայունությամբ հետևելու ԴՆԹ-ի հետ կատարվող փոփոխություններին: ԴՆԹ-ի որոշ նշանակիրներ տրված են նկ. 8.1–ում՝



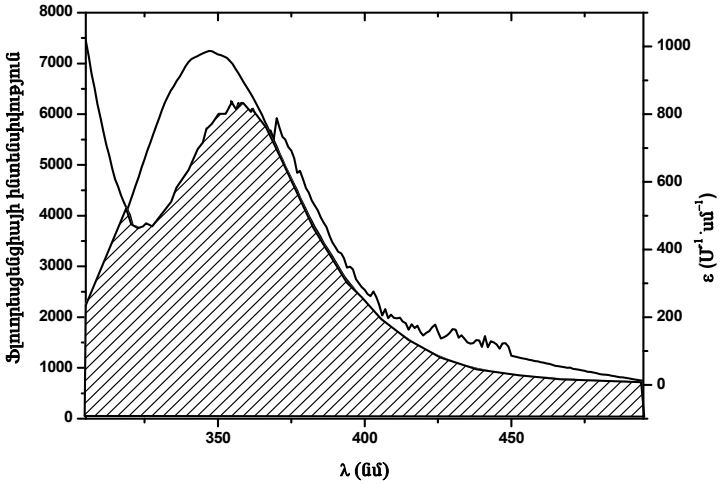
Նկ. 8.1 ԴՆԹ-ի որոշ նշանակիրներ:

8.2. Սպիտակուց-լիգանդ փոխազդեցությունների ուսումնասիրությունը

Սպիտակուց – լիգանդ փոխազդեցությունների քանակական նկարագրությունը կապված է սպիտակուցի հետ լիգանդի կապման կենտրոնների թվի, դոնոր-ակցեպտոր հեռավորության, ինչպես նաև փոխազդեցության ուժերի բնույթի պարզաբանման հետ: Ֆիզիկաքի-

միական այս պարամետրերի որոշումը հիմնված է ֆլուորեսցենտային ռեզոնանսային էներգիայի ոչ ճառագայթային անցման որոշման վրա: Ֆլուորեսցենտային առաքման ժամանակ բացի էներգիայի ճառագայթային անցումից, որը գրանցվում է որպես ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտր, իրականանում է նաև կլանված էներգիայի ոչ ճառագայթային անցում, այսինքն կլանված ռեզոնանսային էներգիայի անցում մոլեկուլի այլ մասի կամ այլ մոլեկուլի: Այս երևույթը հայտնի է որպես ֆլուորեսցենտային ռեզոնանսային էներգիայի անցման (ՖՌԷԱ) երևույթ և լայնորեն օգտագործվում է ֆլուորեսցենցիայի կիրառության շատ ոլորտներում՝ լինի դա բժշկական ախտորոշումը, ԴՆԹ-ի անալիզը և այլն: ՖՌԷԱ-ն իրականանում է գրգռված վիճակում գտնվող դոնորի մոլեկուլի (D) և հիմնական վիճակում գտնվող ակցեպտորի մոլեկուլի (A) միջև: Դոնորի ֆլուորեսցենտային սպեկտրը վերադրվում է ակցեպտորի կլանման սպեկտրի հետ (նկ. 8.2): Որքան վերադրված մակերեսը մեծ է, այնքան ռեզոնանսային էներգիայի անցումն արդյունավետ է:

ՖՌԷԱ-ի ամենատարածված օգտագործումը կոմպլեքսագոյացման ժամանակ դոնոր - ակցեպտոր (D - A) հեռավորության որոշումն է: Սպիտակուցների ուսումնասիրման ժամանակ որպես դոնոր ընդունվում է Trp-ային մնացորդը: Եթե դոնորն ու ակցեպտորը միակն են, և, եթե դրանց միջև եղած հեռավորությունը չի փոխվում ֆլուորոֆորի գրգռված վիճակի կյանքի տևողության ընթացքում, ապա D - A հեռավորությունը կարելի է որոշել՝ ելնելով էներգիայի անցման արդյունավետությունից:



Նկ. 8.2 Դոնորի մոլեկուլի ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրի և ակցեպտորի մոլեկուլի կլանման սպեկտրների վերադրումը:

Այս մեթոդը օգտագործվում է նաև այն դեպքում, երբ ակցեպտորի մեկից ավելի մոլեկուլներ են գտնվում դոնորի շրջապատում: Նման իրավիճակ առաջանում է, երբ գործ ունենք մակրոմոլեկուլների անսամբլների հետ, կամ թաղանթների դեպքում, երբ A-ն ազատորեն դիֆուզվում է դեպի լիպիդային շերտերը:

ՖՌԷԱ-ի բնութագրերն են՝ ֆյոստերյան շառավիղը՝ R_0, էներգիայի անցման արագությունը՝ $k_T(r)$, վերադրման ինտեգրալը՝ I, էներգիայի անցման արդյունավետությունը՝ E, ուղղվածության գործակիցը՝κ^2:

Այն հեռավորությունը, որի դեպքում ռեզոնանսային էներգիայի անցումը իրականանում է 50%-ով, կոչվում է ֆյոստերյան շառավիղ, որը նշանակվում է R_0: Այն հիմնականում լինում է 20-60 Å:

Դոնորից ակցեպտոր էներգիայի անցման արագությունը՝ $k_t(r)$-ը, որոշվում է ըստ հետևյալ հավասարման՝

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (8.1),$$

որտեղ τ_D-ն դոնորի մարման ժամանակամիջոցն է ակցեպտորի բացակայությամբ, R_0-ն՝ ֆյոստերյան շառավիղը, r-ը՝ դոնորի և ակցեպտորի միջև եղած հեռավորությունը: Իրարից r հեռավորությամբ տարանջատված D - A զույգի համար էներգիայի անցման արագությունը որոշվում է հետևյալ հավասարումով՝

$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6}\left(\frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4}\right) J(\lambda) \quad (8.2),$$

որտեղ Q_D-ն դոնորի քվանտային ելքն է, n-ը՝ լուծիչի բեկման ցուցիչը, N-ը՝ Ավոգադրոյի թիվը, κ^2-ն՝ դոնորի և ակցեպտորի դիպոլ մոմենտների փոխադարձ դասավորվածությունը բնութագրող գործոնը, J-ն՝ դոնորի առաքման և ակցեպտորի կլանման սպեկտրների վերադրման ինտեգրալը: J-ն արտահայտվում է հետևյալ հավասարումով՝

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (8.3),$$

որտեղ $F_D(\lambda)$-ն դոնորի ֆլուորեսցենցիայի նորմավորված ինտենսիվությունն է, $\varepsilon_A(\lambda)$ - ն՝ ակցեպտորի էքստինկցիայի գործակիցը:

ՖՌԷԱ-ի մյուս քանակական բնութագիրը էներգիայի անցման արդյունավետությունն է՝ E -ն: E - ն ֆոտոնների այն մասնաբաժինն է, որոնք առաքվել են դոնորի կողմից և փոխանցվել ակցեպտորին: E-ն որոշվում է ըստ հետևյալ հավասարման՝

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad (8.4):$$

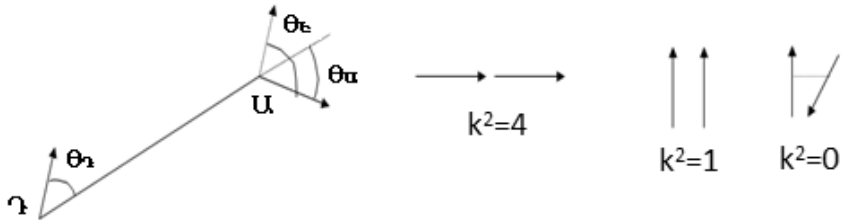
Այս հավասարումը իրենից ներկայացնում է ակցեպտորի ներկայությամբ էներգիայի անցման արագության հարաբերությունը դոնորի մարման ողջ արագությանը: Հաշվի առնելով (8.1) հավասարումը, կստանանք՝

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (8.5):$$

Այս հավասարումը ցույց է տալիս, որ էներգիայի անցման արդյունավետությունը կախված է դոնոր-ակցեպտոր հեռավորությունից: E-ն կարելի է որոշել ակցեպտորի բացակայության և ներկայության դեպքում ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունների հարաբերությունից ըստ հետևյալ հավասարման՝

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (8.6):$$

D-A հեռավորությունը հաշվելու համար անհրաժեշտ է որոշել ֆյոստերյան շառավիղը՝ R_0-ն, բեկման ցուցիչը՝ n-ը: Ջրի դեպքում այն 1.33 է, և եթե ունենք օրգանական լուծիչի խառնուրդ, ապա ընդունում ենք, որ n =1.39: Կախված դոնորի և ակցեպտորի տարածական դասավորվածությունից՝ κ^2-ին կարող է ընդունել 0-ից մինչև 4 արժեքներ (նկ. 8.3):



Նկ. 8.3 Ուղղվածության գործոնի՝ κ^2, կախվածությունը դոնորի առաքման և ակցեպտորի կլանման դիպոլների փոխադարձ դասավորվածությունից:

Ուղղվածության κ^2 գործոնը տրվում է հետևյալ արտահայտությամբ՝

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3\cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad (8.7),$$

որտեղ θ_T -ն դոնորի առաքման անցման դիպոլի և ակցեպտորի կլանման անցման դիպոլի կազմած անկյունն է, θ_D -ն և θ_A -ն՝ այս դիպոլների կազմած անկյունը: Դիպոլների գլուխ-պոչ ուղղվածության դեպքում $\kappa^2 = 4$, զուգահեռ դիպոլների համար κ^2=1, իսկ ուղղահայաց դասավորվածության դեպքում՝ $\kappa^2 = 0$: Կենսաբանական մոլեկուլների ուսումնասիրման ժամանակ օգտագործվում է $\kappa^2 = 2/3$ արժեքը:

Պարզելով կապման հաստատունի ջերմաստիճանային կախվածությունը՝ կարող ենք հաշվել սպիտակուցին լիգանդի կապման թերմոդինամիկական պարամետրերը: Սպիտակուցի և լիգանդի միջև փոխազդեցությունները կարող են լինել հիդրոֆոբ, էլեկտրոստատիկ, վան-դեր-վաալսյան, կարող են առաջանալ ջրածնական կապեր և այլն: Այս փոխազդեցությունների բնույթը կարելի է պարզել ըստ կապման պրոցեսի էնթալպիայի և էնտրոպիայի փոփոխության: Պարզվել է, որ եթե $\Delta H > 0$ և $\Delta S > 0$, ապա համակարգում առկա են հիդրոֆոբ փոխազդեցություններ, եթե $\Delta H < 0$ և $\Delta S < 0$՝ համակարգում գերիշխում են ջրածնական կապերը և վան-դեր-վաալսյան փոխազդեցությունները, իսկ եթե $\Delta H < 0$ և $\Delta S > 0$՝ էլեկտրոստատիկ փոխազդեցությունները:

Սպիտակուց – լիգանդ կապման թերմոդինամիկական պարամետրերը որոշվում են ըստ Վանտ- Հոֆի հավասարման՝

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (8.8):$$

Գիբսի էներգիայի փոփոխությունը կարելի է որոշել համաձայն հետևյալ հավասարման՝

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8.9):$$

Համաձայն Ֆյոստերի ոչ ճառագայթային էներգիայի անցման տեսության՝ էներգիայի անցման արդյունավետությունը կախված է ոչ միայն D - A հեռավորությունից, այլ նաև ֆյոստերյան հեռավորությունից՝

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (8.10)$$

R_0^6-ն հաշվարկվում է ըստ՝

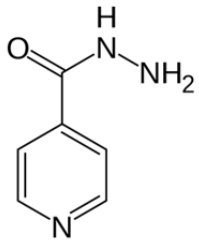
$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} k^2 N^{-4} \Phi J \quad (8.11),$$

հավասարման, որտեղ κ^2=2/3, N=1.336, Φ=0.18, J - ն վերադրման ինտեգրալն է: Եթե դոնոր-ակցեպտոր հեռավորությունը՝ r -ը, փոքր է 7 նմ-ից, ապա էներգիայի անցումը իրականացվում է մեծ արդյունավետությամբ: ՖՌԷԱ չափումների ժամանակ սպիտակուցի և լիգանդի քանակները պետք է լինեն էկվիմոլային:

Որպես ֆյոստերյան ռեզոնանսային էներգիայի անցման մասնավոր օրինակ քննարկենք ցուլի շիճուկային ալբումինի (ՑՇԱ) և իզոնիազիդի միջև փոխազդեցությունը: Քանի որ ՑՇԱ-ն պարունակում է երկու տրիպտոֆանային մնացորդներ, ուստի սպիտակուցի ֆլուորեսցենցիան կարելի է օգագործել այս փոխազդեցությունը ուսումնասիրելու համար:

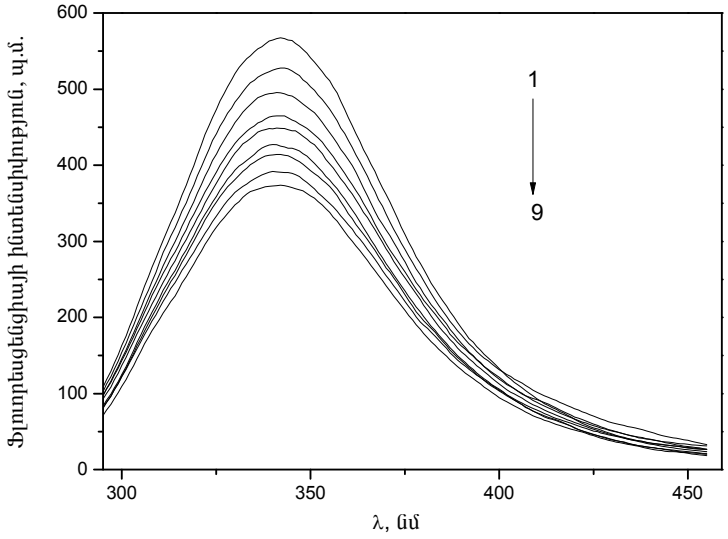
Իզոնիազիդը (իզոնիկոտինաթթվի հիդրազիդ, INH) ունի մեծ ակտիվություն *Micobacterium tuberculosis*–ի նկատմամբ (տուբերկուլյոզ հիվանդությունն առաջացնող միկրոօրգանիզմ) և մինչ այսօր

լայնորեն կիրառվում է որպես հակատուբերկուլյոզային դեղամիջոց (մոլեկուլային կառուցվածքը նկ. 8.4-ում):



Նկ. 8.4 Իզոնիազիդի մոլեկուլային կառուցվածքը:

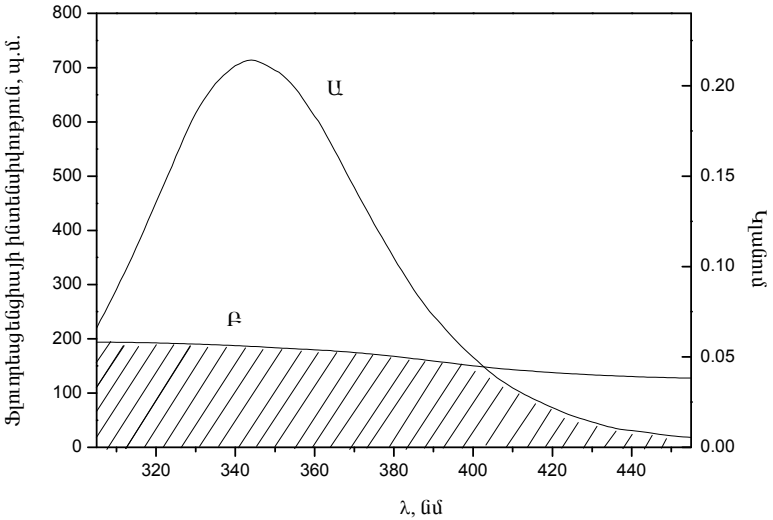
Ուսումնասիրվել է իզոնիազիդի կոնցենտրացիայից կախված ՑՇԱ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարումը՝ որպես գրգռման ալիք օգտագործելով 280 նմ: Իզոնիազիդի ազդեցությունը ՑՇԱ-ի ֆլուորեսցենցիայի վրա ներկայացված է նկ. 8.5-ում:



Նկ. 8.5 ՅՇԱ-ի ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրները իզոնիազիդի տարբեր կոնցենտրացիաների ներկայությամբ 295 Կ-ում; c(ՅՇԱ)=5×10^{-7} Մ, c(իզոնիազիդ) 1-ից 9՝ 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10×10^{-5} Մ:

Ինչպես հետևում է նկ. 8.5-ից, ՅՇԱ-ի ֆլուորեսցենցիան նվազում է իզոնիազիդի կոնցենտրացիայի մեծացման հետ: ՅՇԱ-ի մարումը իզոնիազիդով տեղի է ունենում ստատիկ մեխանիզմով՝ պայմանավորված յուրահատուկ փոխազդեցություններով և ՅՇԱ-ի և իզոնիազիդի միջև կոմպլեքսի առաջացմամբ:

Էներգիայի անցման արդյունավետությունը՝ E, որոշվում է ըստ (8.10) հավասարման: J-ն, որը դոնորի առաքման սպեկտրի և ակցեպտորի կլանման սպեկտրի վերածածկումն է (նկ. 8.6), կարելի է հաշվել ըստ (8.3) հավասարման: Տվյալ դեպքում՝ k^2=2/3, n=1.3325 և Φ=0.18:



Նկ. 8.6 ՑՇԱ-ի ֆլուորեսցենցիայի (Ա) և իզոնիազիդի կլանման (Բ) սպեկտրների վերածածկը, C(ՑՇԱ)/C(իզոնիազիդ)=1/1 (295 Կ):

(8.3), (8.10) և (8.11) հավասարումների միջոցով որոշվել են հետևյալ պարամետրերը՝ $J=1.65\times10^{-15}$ սմ^3·լ·մոլ$^{-1}$, $R_0=1.92$ նմ, $E=0.21$ և $r=2.41$ նմ: Ինչպես երևում է ստացված տվյալներից, դոնոր-ակցեպտոր հեռավորությունը 7 նմ-ից փոքր է և մյուս կողմից $0.5R_0<r<1.5R_0$ պայմանին բավարարելը վկայում է այն մասին, որ ՑՇԱ-ից իզոնիազիդին էներգիայի անցման հավանականությունը մեծ է: Ֆյոստերի ոչ ճառագայթային էներգիայի անցման տեսության օգտագործմամբ պարզեցքին, որ ՑՇԱ-իզոնիազիդ փոխազդեցության արդյունքում առաջանում է կոմպլեքս հիմնական վիճակում և որոշեցինք իզոնիազիդի ՑՇԱ-ի տրիպտոֆանային մնացորդից ունեցած հեռավորությունը:

Նույն սկզբունքով որոշվել է դոնորի և ակցեպտորի միջև եղած հեռավորությունը նաև մարդու շիճուկային ալբումին (ՄՇԱ) – դաբաղաթթու զույգի համար, որտեղ որպես դոնոր հանդես է գալիս ՄՇԱ-ն, իսկ ակցեպտորը դաբաղաթթուն է: Այս հետազոտությունների արդյունքում ստացվել է, որ

$r=2.76$ նմ, $R_0=2.69$ նմ և $E=0.456$, այսինքն $0.5R_0<r<1.5R_0$ պայմանը բավարարված է, ինչը վկայում է այն մասին, որ ՄԾԱ-ից էներգիայի անցումը դաբաղաթթվին արդյունավետ է, իսկ ֆլուորեսցենցիայի մարումը տեղի է ունենում ստատիկ մեխանիզմով:

8.3. Սպիտակուցների բնափոխման ուսումնասիրություններ

Սպիտակուցների բնափոխումը սպիտակուցի կառուցվածքի կրած որևէ փոփոխություն է, որը կապված չէ կովալենտային կապերի խզման հետ: Դա կարող է բերել մոլեկուլի չորրորդային, երրորդային, երկրորդային կառուցվածքի փոփոխության: Սպիտակուցներում ոչ կովալենտային փոխազդեցությունների առավել կարևոր տիպերն են. ա) էլեկտրոնային ամպերի ձգմամբ և վանմամբ դիսպերս փոխազդեցությունները, բ) էլեկտրոստատիկ փոխազդեցությունները, գ) ջրածնական կապերը, դ) հիդրոֆոբ փոխազդեցությունները:

Սպիտակուցների բնափոխման ամենատարածված ձևերից է ջերմային բնափոխումը, երբ բարձր կամ ցածր ջերմաստիճանների ազդեցությանը ենթարկվելիս այն կորցնում է ֆերմենտատիվ ակտիվությունը, փոքրանում է սպիտակուցի լուծելիությունը: Սպիտակուցների ցածր ջերմաստիճաններում բնափոխվելու պատճառը կայանում է նրանում, որ սպիտակուցը կոմպակտ պահող հիդրոֆոբ փոխազդեցությունները ջերմաստիճանի նվազման հետ թուլանում են: Սպիտակուցային շղթան սեղմող հիդրոֆոբ ճնշումը կտրուկ իջնում է ջերմաստիճանի իջեցման հետ և սպիտակուցը կարող է «եռալ»: Եթե ջերմաստիճանը բարձրացնելիս սպիտակուցը կարծես «հալվում» է և դրա ծավալը մեծանում է ոչ մեծ չափով, ապա ցածր ջերմաստիճանային բնափոխման ժամանակ սպիտակուցը ամբողջությամբ բացվում է, և դրա զբաղեցրած ծավալը մեծանում է մի քանի անգամ: Սպիտակուցների սառը բնափոխման համար էական նշանակություն

ունի սառեցման արագությունը: Սովորաբար օգտագործվում է սառեցման երկու ռեժիմ՝ դանդաղ (մեկ, երկու աստիճան րոպեում) և արագ (քսան հինգ - հիսուն աստիճան րոպեում): Սառեցման ռեժիմի ընտրությունը պայմանավոված է դրված խնդրով և ունի իր օգտագործման ոլորտը:

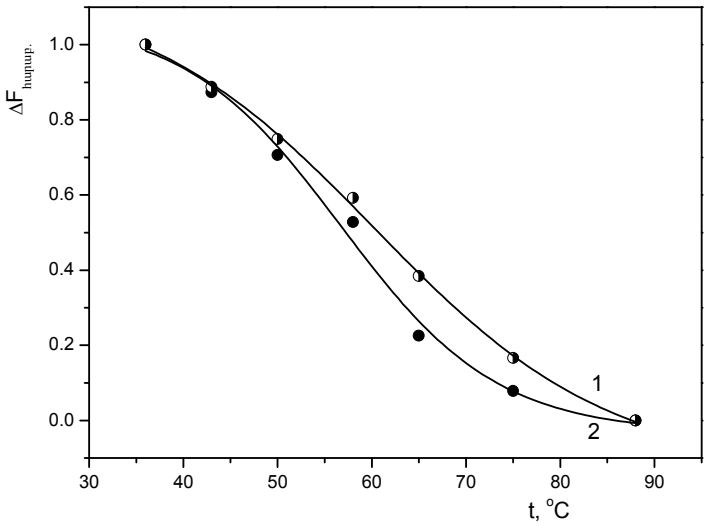
Որոշ մեթոդներ հնարավորություն են տալիս հայտնաբերել սպիտակուցի անգամ չնչին կառուցվածքային փոփոխությունները: Այդ մեթոդներից են էլեկտրոնային կլանման, ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրոսկոպիկ մեթոդները: Ֆլուորեսցենտային սպեկտրալ շատ բնութագրեր կարելի է օգտագործել սպիտակուցների բնափոխումը (դենատուրացիան) և վերականգնումը (ռենատուրացիան) ուսումնասիրելու համար: Դրանցից են ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրի բնութագրերը, ֆլուորոֆորի կյանքի տևողությունը, Շտեռնի-Ֆոլմերի հաստատունը, ՖՌԷԱ-ն և այլն:

Սպիտակուցի մոլեկուլի բնափոխման ուսումնասիրությունը թույլ է տալիս բացահայտել սպիտակուցի կառուցվածքի և դրա կայունության միջև եղած կապը և հասկանալ, թե որ գործոններն են որոշում սպիտակուցի մոլեկուլի բնական կոնֆորմացիայի կայունությունը: Բնափոխման ընթացքում բացի սպիտակուցի ակտիվությունից զգալի փոփոխության են ենթարկվում նաև կողմնային շղթաների շուրջը գտնվող միջավայրի կարգավորվածությունը և սպիտակուցի գլոբուլյար կառուցվածքը: Գլոբուլյար կառուցվածքի փոփոխության արդյունքում տեղի է ունենում մակրոմոլեկուլի վերադասավորում, երրորդային և նույնիսկ երկրորդային կառուցվածքների փոփոխություն: Մեծ ազդեցություն ունի նաև լուծիչի կառուցվածքը: Ջրի բազմաթիվ մակրոսկոպիկ հատկություններ էականորեն փոփոխվում են էլեկտրոլիտների առկայությամբ: Փոքր և/կամ բազմալիցք իոնները (Li^+, Na^+, Mg^{2+}, OH^-, F^-) հանդես են գալիս որպես կառուցվածքագոյացնողներ, մինչդեռ միալիցք մեծ իոններն (K^+, Rb^+, Cs^+, Cl^-, NO_3^-) ունեն կառուցվածքը քանդող ազդեցություն:

Քննարկենք ՄԾԱ-ի ջերմային բնափոխումը կալիումի քլորիդի ներկայությամբ: ՄԾԱ-ն մոդելային միացություն է, որի օգնությամբ կարելի է ուսումնասիրել սպիտակուցներում այնպիսի ֆազային անցումներ, ինչպիսիք են բնափոխումը և դինամիկ ֆազային անցումը: ՄԾԱ-ն մարդու արյան պլազմայում ամենամեծ քանակությամբ պարունակվող սպիտակուցն է (արյան պլազմայում պարունակվող բոլոր սպիտակուցների 55-65 %-ը) և հանդիսանում է տարբեր էնդոգեն և էկզոգեն միացությունների տրանսպորտային սպիտակուց: ՄԾԱ-ի պոլիպեպտիդային շղթան կազմված է 585 ամինոթթվային մնացորդներից: Նրանում պարունակվում է միայն մեկ տրիպտոֆանային մնացորդ, որի ֆլուորեսցենցիան զգայուն է սպիտակուցի մակրոմոլեկուլի վերադասավորման նկատմամբ:

Հայտնի է, որ սպիտակուցներին բնութագրական ֆլուորեսցենցիան պայմանավորված է ֆենիլալանինի (Phe), թիրոզինի (Tyr) և տրիպտոֆանի (Trp) մնացորդներով: Սպիտակուցների կլանումը 280 նմ-ի տակ հիմնականում պայմանավորված է Trp-ային մնացորդով, քանի որ Tyr-ի ֆլուորեսցենցիան մարում է մի շարք գործոնների ազդեցության պատճառով (ռեզոնանսային էներգիայի անցում տրիպտոֆանային մնացորդ, հարևան պոլիպեպտիդային շղթաներով մարում և այլն), իսկ ֆենիլալանինը փորձի պայմանների մեծամասնության դեպքում չի գրգռվում: Ավելին, սպիտակուցներում Phe-ի քվանտային ելքը փոքր է:

Հիմնվելով 3D ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրների պրոյեկցիայի վրա, կառուցվել են ՄԾԱ-ի ջերմային բնափոխման ֆլուորեսցենտային պրոֆիլները (նկ. 8.7):

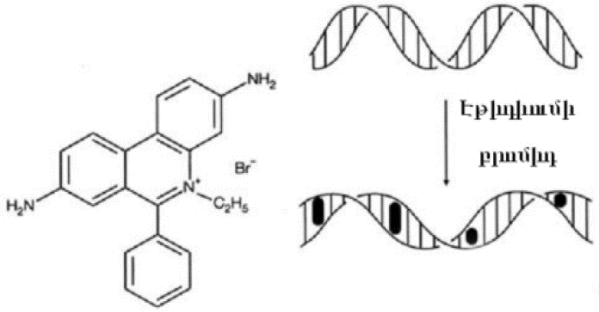


Նկ. 8.7 Մարդու շիճուկային ալբումինի ջերմային բնափոխման ֆլուորեսցենտային պրոֆիլները՝ $\lambda_{գրգռ}/\lambda_{առաք}$=230/340 նմ (1) և 280/344 նմ (2), C(ՄՇԱ)=0.4 մգ/մլ, C(KCl)=0.1 Մ:

Ինչպես երևում է նկարից, ՄՇԱ-ի հալման ֆլուորեսցենտային պրոֆիլներն ունեն սիգմոիդալ տեսք, ընդ որում 2-րդ կորը, որը վերաբերում է սպիտակուցի մոլեկուլում առկա արոմատիկ մնացորդներին, նկարագրվում է ավելի լավ արտահայտված սիգմոիդալ թռիչքով, քան 2-րդ կորը, որն իրենից ներկայացնում է պոլիպեպտիդային շղթայի կրած փոփոխությունները: Դա պայմանավորված է նրանով, որ ջերմաստիճանի բարձրացման հետ սպիտակուցի կողմնային շղթաները ենթարկվում են ավելի խոր կառուցվածքային փոփոխության, քան պոլիպեպտիդային շղթան:

8.4. ԴՆԹ-ի ջերմային բնափոխման ուսումնասիրությունը

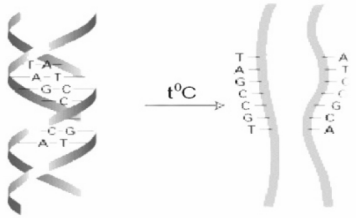
Կարելի էր սպասել, որ ԴՆԹ-ի մոլեկուլի կազմի մեջ մտնող ազոտային հիմքերը (ադենին - A, թիմին - T, գուանին - G, ցիտոզին - C) պետք է ապահովեին ԴՆԹ-ի ֆլուորեսցենտելու հատկությունը, սակայն ԴՆԹ-ն ունի շատ թույլ արտահայտված սեփական ֆլուորեսցենցիա, իսկ հաճախ գրեթե չի ֆլուորեսցենցում: Այդ պատճառով ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով ԴՆԹ-ն ուսումնասիրելու համար օգտագործում են արտաքին նշանակիրների մեթոդը: Ինչպես արդեն նշվել է, ԴՆԹ-ի համար որպես ֆլուորեսցենցող նշանակիր կարելի է օգտագործել ակրիդինային նշանակիրներ, էԲ-ն և այլ հարթ կառուցվածք ունեցող կատիոնային միացություններ: էԲ-ն ունի ցիկլային կառուցվածք և կազմված է իրար միացած անիլինային և պիրիդինային խմբերից: էԲ-ի մոլեկուլն ունի հիդրոֆոբ բնույթ և, ներթափանցելով երկպարույր ԴՆԹ-ի ներքին տիրույթ, փոխազդում է ԴՆԹ-ի հիմքերի հետ՝ շնորհիվ վան-դեր-վաալյան փոխազդեցությունների (նկ. 8.4):



Նկ. 8.8 Էթիդիումի բրոմիդի կառուցվածքը և կապումը ԴՆԹ-ին:

ԴՆԹ-ին կապվելիս էԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունն աճում է մոտ 30 անգամ: Ինչպես գիտենք, ջրի մոլեկուլները հանդիսանում են ֆլուորեսցենցիայի ուժեղ մարիչներ: Կապվելով ԴՆԹ-ի մոլեկուլին՝ էԲ-ն անցնում է ԴՆԹ-ի հիդրոֆոբ տիրույթ, ինչը թույլ է

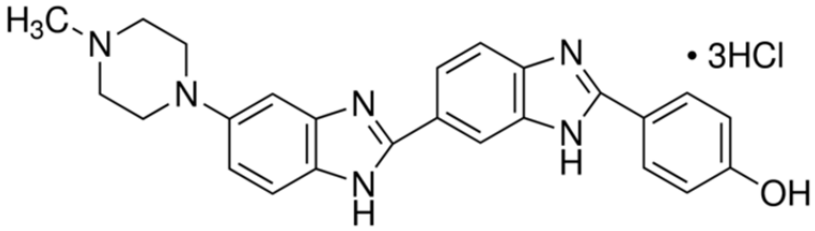
տալիս դրան ազատվել լուծիչի (ջրի) մոլեկուլներից: Ջրի մոլեկուլներով մարման բացակայությունն էլ հենց պայմանավորում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճը: Բնափոխման ժամանակ, երբ ԴՆԹ-ի երկպարույրը քանդվում է՝ առաջացնելով երկու առանձին շղթաներ, երկպարույրի բացմանը զուգընթաց ազոտական հիմքերի միջև գտնվող ԷԲ-ի մոլեկուլները դուրս են գալիս ԴՆԹ-ի հիդրոֆոբ տիրույթից դեպի լուծիչ: Դրա արդյունքում տեղի է ունենում ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարում ջրի մոլեկուլներով և ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոքրացում: Ջերմաստիճանը բարձրացնելիս ԴՆԹ-ի երկպարույրը պահող ջրածնական կապերը սկսում են քանդվել այն հատվածներում, որտեղ դրանք ավելի թույլ են, սովորաբար A - T զույգերի մոտ: Դրա հետևանքով երկպարույրը ձեռք է բերում հանտելային կառուցվածք և առաջանում են, այսպես կոչված, խոռոչներ: Այնուհետև ավելի բարձր ջերմաստիճաններում քանդվում են ԴՆԹ-ի երկպարույրի կառուցվածքը պայմանավորող բոլոր ջրածնական կապերը և առաջանում են երկու առանձին շղթաներ (նկ. 8.9):



Նկ. 8.9 ԴՆԹ-ի բնափոխման սխեմատիկ պատկերը:

Քննարկենք ԴՆԹ-ի փոխազդեցությունը ֆլուորեսցենտային հայտնի նշանակիր բենզիմիդ տրիքլորիդի (Hoechst 33258) հետ (նկ. 8.10): Այսպիսի ուսումնասիրությունների կարևորությունը կայանում է նրանում, որ հնարավորություն է ընձեռվում բացահայտել ԴՆԹ-ի

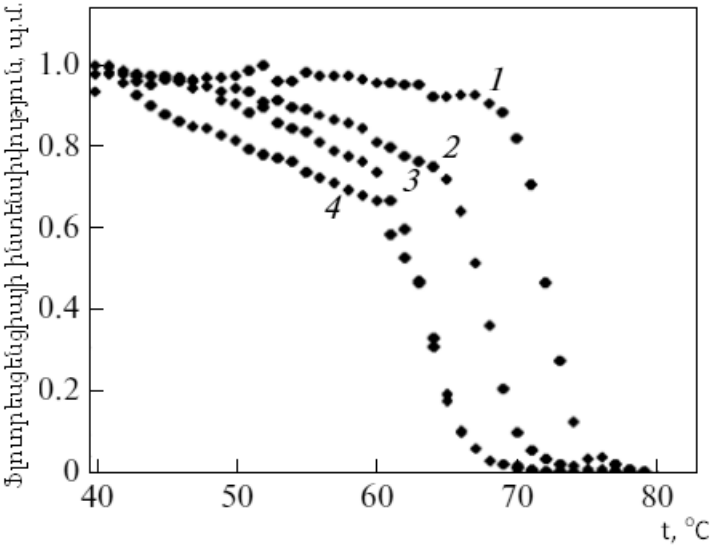
մոլեկուլի վրա հետերոցիկլիկ միացությունների ազդեցության մեխանիզմը, ԴՆԹ-ի մոլեկուլում հիմնային զույգերի հաջորդականությունը, հնարավոր վնասվածքների առկայությունը և այլն:



Նկ. 8.10 H33258-ի մոլեկուլային բանաձևը:

H33258-ԴՆԹ կոմպլեքսի առաջացումը հնարավոր է ուսումնասիրել ինչպես էլեկտրոնային կլանման, այնպես էլ ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրոսկոպիայի մեթոդներով: Փորձերը ցույց են տվել, որ մաքուր ԴՆԹ-ի համեմատ, H33258-ԴՆԹ կոմպլեքսի հալման կորերը տեղաշարժվում են դեպի բարձր ջերմաստիճանային տիրույթ: Այսինքն H33258-ն կայունացնում է ԴՆԹ-ի երկպարույրը: Պարզվել է նաև, որ, շնորհիվ լիգանդի մոլեկուլի չափսերի համապատասխանությանը փոքր ակոսի չափսերին, H33258-ն ընտրողականորեն կապվում է ԴՆԹ-ի երկպարույրի փոքր ակոսում: Ավելին, կապման ընթացքում նշված լիգանդը ցուցաբերում է մեծ խնամակցություն ադենին և թիմին հիմնային զույգի նկատմամբ:

ԴՆԹ-ի հալումն ուսումնասիրվել է առանց ԴՄՍՕ-ի և ԴՄՍՕ-ի ներկայությամբ՝ բացահայտելու համար ԴՄՍՕ-ի ազդեցությունը: H33258-ի և ԴՆԹ-ի հիմնային զույգերի հարաբերությունը (r) պահպանվել է հաստատուն՝ r=0.1, իսկ ԴՄՍՕ-ի ծավալային բաժինը փոփոխվել է 0-ից 20 %: Հարկ է նշել, որ H33258-ն կապվում է ԴՆԹ-ին տրված r-ի արժեքի դեպքում ՝ մեծացնելով H33258-ի քվանտային ելքը:



Նկ. 8.11 ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսի հալման նորմավորված կորը ԴՄՄՕ-ի կոնցենտրացիայից կախված՝ (1) 5, (2) 10, (3) 15 և (4) 20%:

Նկ. 8.11-ում ներկայացված է ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսի հալման կորը: H33258-ի կապումը ԴՆԹ-ին հանգեցնում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության կրկնակի և նույնիսկ եռակի մեծացմանը, իսկ ջերմաստիճանի բարձրացմամբ տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի բնափոխում, և H33258-ի ինտենսիվությունը նվազում է (նկ. 8.11): ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները ԴՄՄՕ-ի քանակությունից կախված ներկայացված են աղյուսակ 4-ում:

Աղյուսակ 4

ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանները լուծույթում ԴՄՍՕ-ի տարբեր քանակությունների առկայությամբ

ω_V (ԴՄՍՕ), %	$t_{հալ}$, ^oC
0	75.35
5	71.87
10	67.62
15	63.15
20	62.40

Արդյունքները ցույց են տալիս, որ ԴՄՍՕ-ի ավելացմամբ ԴՆԹ-H33258 կոմպլեքսի հալման ջերմաստիճանը նվազում է, ինչը վկայում է այն մասին, որ ԴՄՍՕ-ն զգալիորեն նվազեցնում է կոմպլեքսի ջերմային կայունությունը:

ԳԼՈՒԽ ԻՆՆԵՐՈՐԴ

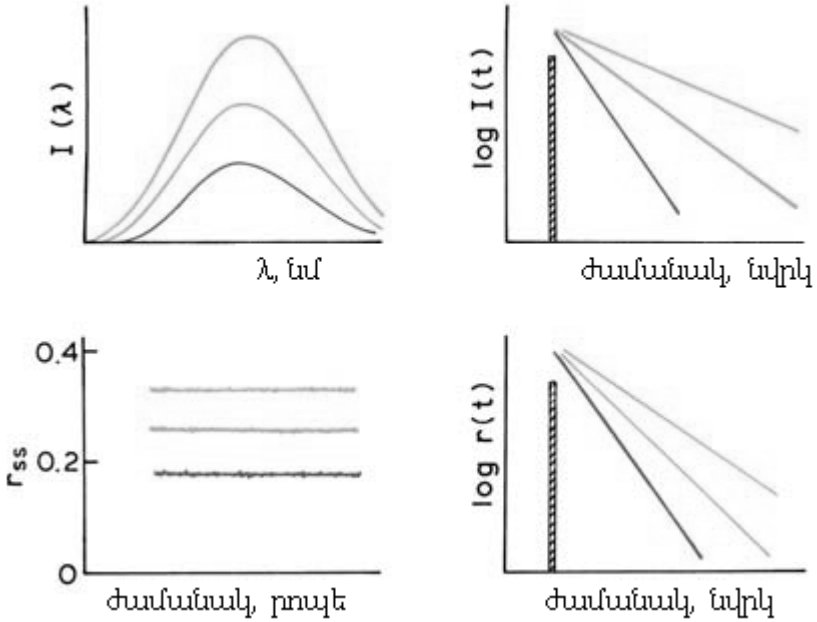
ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՆԵՐԻ ԳՐԱՆՑՄԱՆ ՏԵԽՆԻԿԱՆ

9.1. Ստացիոնար և ժամանակային տարրալուծված ֆլուորեսցենցիա

Ֆլուորեսցենտային ուսումնասիրություններ կարելի է իրականացնել երկու տիպի չափումների միջոցով՝ ստացիոնար և ժամանակային տարրալուծված: Ստացիոնար չափումների ժամանակ նմուշը ենթարկվում է շարունակական ճառագայթման, և գրանցվում է առաքման սպեկտրը: Ֆլուորեսցենցիայի երևույթի նանովայրկյանային սանդղակի հետևանքով հիմնականում օգտագործում են ստացիոնար ֆլուորեսցենցիայի չափումները, երբ նմուշը մեկ անգամ ճառագայթման ենթարկելուց հետո անմիջապես հաստատվում է ստացիոնար վիճակ:

Ժամանակային տարրալուծված ֆլուորեսցենցիան օգտագործում են ֆլուորեսցենտային ինտենսիվության, անիզոտրոպիայի, մարման չափումներ կատարելիս: Այս չափումների համար նմուշը ենթարկվում է լույսի իմպուլսային ճառագայթման, ընդ որում իմպուլսի տևողությունը ավելի կարճ է, քան նմուշի ֆլուորեսցենցիայի մարման ժամանակամիջոցը: Սպեկտրը գրանցվում է մեծ արագությամբ, որը հնարավորություն է տալիս անիզոտրոպիայի ինտենսիվությունը գրանցել նանովայրկյանային ժամանակային սանդղակում: Նկ. 9.1-ում բերված է ստացիոնար և ժամանակային տարրալուծված ֆլուորեսցենտային սպեկտրների համեմատությունը:

Կարևոր է ճիշտ պատկերացնել ստացիոնար և ժամանակային տարբերակված չափումների միջև եղած տարբերությունը: Ստացիոնար չափումները պարզապես նմուշի ժամանակային առումով միջինացված ֆլուորեսցենցիայի մարման արտահայտությունն են:



Նկ. 9.1 Ստացիոնար և ժամանակային տարբերակված ֆլուորեսցենտային սպեկտրների համեմատություն:

Ընդունենք, որ ֆլուորոֆորն օժտված է τ մարման ժամանակով և θ պտտական կորելյացիոն ժամանակով: Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության մարումը և անիզոտրոպիայի մարումը տրվում են հետևյալ ձևով՝

$$I(t) = I_0 \; e^{-t/\tau} \qquad (9.1)$$

$$r(t) = r_0 \ e^{-t/\theta} \qquad (9.2),$$

որտեղ I_0-ն և r_0–ն t=0 պահին ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունները ու անիզոտրոպիաները են, որոնք անմիջապես հետևում են գրգռման իմպուլսին: (9.1) և (9.2) հավասարումները կարելի է օգտագործել ցույց տալու համար, թե ինչպես է մարման ժամանակամիջոցը որոշում, թե ինչ կարելի է դիտարկել ֆլուորեսցենցիայի միջոցով: Ստացիոնար անիզոտրոպիան՝ r –ը, տրվում է $r(t)$ –ի միջինացված արժեքով.

$$r = \frac{\int_0^\infty r(t)I(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} \qquad (9.3):$$

Այս հավասարման մեջ հայտարարը նորմավորում է անիզոտրոպիան՝ ամբողջ ինտենսիվությունից անկախ լինելու համար: Համարիչն արտահայտում է ցանկացած t պահին անիզոտրոպիայի չափը ըստ ստացիոնար անիզոտրոպիայի ինտենսիվության:

(9.1) և (9.2) հավասարումները (9.3)-ում տեղադրելուց կստանանք Պերինի հավասարումը՝

$$r = \frac{r_0}{1+(\tau/\theta)} \qquad (9.4):$$

Ահա մի պարզ օրինակ, թե ինչպես է ստացիոնար ինտենսիվությունը՝ I_{SS}, կապված մարման ժամանակի հետ: Ստացիոնար ինտենսիվությունը տրվում է հետևյալ հավասարումով՝

$$I_{SS} = \int_0^\infty I_0 e^{-t/\tau} dt = I_0 \tau \qquad (9.5):$$

I_0–ի արժեքը կարող է կախված լինել ֆլուորոֆորի կոնցենտրացիայից և սարքավորման որոշ պարամետրերից: Ուստի, մոլեկուլային մակարդակով ստացիոնար ինտենսիվությունը համեմատական է կյանքի տևողությանը:

Ժամանակային տարրալուծված չափումների կարևորությունը

Նանովայրկյանային ժամանակային տարրալուծված չափումներ կատարելու համար պահանջվում են կոմպլեքս և թանկարժեք սարքեր, մինչդեռ ստացիոնար ֆլուորեսցենտային չափումների համար դրանց կարիքը չկա: Անհրաժեշտություն է առաջանում իրականացնել նաև ժամանակային տարրալուծված չափումներ: Հարցը նրանում է, թե որ ֆլուորեսցենտային չափումների ժամանակ մոլեկուլային մակարդակով մատչելի ինֆորմացիան կորչում է ժամանակային միջինացման արդյունքում: Օրինակ, ֆլուորեսցենցող մակրոմոլեկուլների անիզոտրոպիայի մարումը հաճախ նկարագրվում է ավելի բարդ հավասարումներով, քան մեկ էքսպոնենտային (9.2) հավասարումն է: Անիզոտրոպիայի մարման որոշակի ձևն իր մեջ պարունակում է տեղեկություն մակրոմոլեկուլի ձևի և ճկունության վերաբերյալ: Դժբախտաբար այս տեղեկությունը կորչում է անիզոտրոպիայի ժամանակային միջինացման դեպքում (9.3): Ինտենսիվության փոքրացումը նույնպես պարունակում է տեղեկություն, որը կորչում է անիզոտրոպիայի ժամանակային միջինացման դեպքում: Շատ հաճախ մակրոմոլեկուլները կարող են գտնվել մեկից ավելի կոնֆորմացիոն վիճակներում, և մարման ժամանակամիջոցը կարող է կախված լինել կոնֆորմացիոն վիճակից: Ինտենսիվության մարումը կարող է ի հայտ բերել մարման երկու ժամանակ, ուստի և մակրոմոլեկուլի երկու կամ ավելի կոնֆորմացիոն վիճակներ: Ստացիոնար ինտենսիվությունը կներկայացնի միայն երկու մարման ժամանաների միջինացված ինտենսիվություն: Այլ առավելություններ ևս կան: Ռեզոնանսային էներգիայի փոխանցման դեպքում ինտենսիվության մարումը կապված է այն հանգամանքի հետ, թե ինչպես են ակցեպտորները դասավորված դոնորների նկատմամբ: Մարման հետ առնչվող ժամանակային տարրալուծված չափումները կապված են ֆլուորոֆորների դիֆուզիայի կամ հիմնական վիճակում կոմպլեքսի առաջացման հետ:

ԳԼՈՒԽ ՏԱՍՆԵՐՈՐԴ

ԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ ԵՎ ՎԱՐԺՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

10.1 Գործնական աշխատանքներ

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 1. Ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքի որոշումը

Տվյալ նյութի ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը որոշում են՝ համեմատելով արդեն հայտնի ստանդարտի քվանտային ելքի հետ: Հաճախ օգտագործվող ստանդարտների բնութագրերը բերված են աղյուսակ 5-ում:

Աղյուսակ 5

Որոշ միացությունների ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքերը

Միացություն	Լուծիչ	λ գր., նմ	T,°C	Քվանտային ելքը
Քինինի սուլֆատ	0.1Մ H_2SO_4	350	22	0.557
		366	-	0.53 ± 0.023
Ֆլուորեսցեին	0.1 Մ NaOH	496	22	0.95
2-ամինոպիրիդին	0.1 Ն H_2SO_4	285	-	0.60 ± 0.05
Տրիպտոֆան	Ջուր	280	-	0.13 ± 0.01
Թիրոզին	Ջուր	275		0.14 ± 0.01
Ֆենիլալանին	Ջուր	260		0.024
Ֆենոլ	Ջուր	275	23	0.14 ± 0.01
Ռոդամին 6G	Էթանոլ	488	-	0.94
Ռոդամին 10	Էթանոլ	450-465	25	1.0
Ռոդամին B	Էթանոլ			0.97
Կրեզիլ մանուշակագույն	Մեթանոլ	540-640	22	0.54

Այս միացությունների քվանտային ելքերը հիմնականում կախված չեն գրգռման ալիքի երկարությունից: Քվանտային ելքի որոշման համար համեմատում են որոշվող և որպես ստանդարտ օգտագործված նյութերի կլանման և առաքման ինտեգրալ ինտենսիվությունները: Անհայտ քվանտային ելքը հաշվարկվում է ըստ հետևյալ հավասարման՝

$$\Phi = \Phi_R \frac{I_R}{I} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n} \quad (10.1),$$

որտեղ Φ-ը քվանտային ելքն է, I -ն՝ ինտեգրալ ինտենսիվությունը, OD - ն՝ օպտիկական խտությունը և n - ը՝ բեկման ցուցիչը: R ցուցիչը վերաբերում է անհայտ քվանտային ելք ունեցող ֆլուորոֆորին: Այս արտահայտության մեջ ենթադրվում է, որ ստանդարտը և հետազոտվող նյութը գրգռված են նույն ալիքի երկարությամբ:

Փորձարարական մաս

Պատրաստել անհայտ քվանտային ելքով ֆլուորոֆորի լուծույթ և գրանցել դրա էլեկտրոնային կլանման սպեկտրը: Անհրաժեշտության դեպքում լուծույթը նոսրացնել, որպեսզի օպտիկական խտության (D) արժեքը լինի 2-ից փոքր: Կլանման սպեկտրից որոշել կլանման մաքսիմումին համապատասխանող ալիքի երկարությունը, ըստ որի կատարել հայտնի քվանտային ելքով ստանդարտ ֆլուորոֆորի ընտրություն (տե՛ս աղյուսակ 5): Այնուհետև, անհայտ քվանտային ելքով ֆլուորոֆորի լուծույթը նոսրացնել այնքան, մինչև λ_{max}-ին համապատասխանող օպտիկական խտության արժեքը լինի փոքր 0.05-ից: Պատրաստել ստանդարտ ֆլուորոֆորի լուծույթը աղյուսակում նշված լուծիչում և էլեկտրոնային կլանման սպեկտրով ստուգել, որպեսզի ստանդարտի լուծույթն ունենա նույն օպտիկական խտությունը, ինչ նմուշը:

Հաջորդ փուլում գրանցել նմուշի և ստանդարտի ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրները: Որպես գրգռման ալիքի երկարու-

թյուն՝ ընտրել ստանդարտի համար աղյուսակում բերված գրգռման ալիքի երկարությունը և (10.1) բանաձևի օգնությամբ հաշվել անհայտ ֆլուորոֆորի ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը՝ նախապես որոշելով ստանդարտ լուծույթի և նմուշի լուծիչների բեկման ցուցիչները:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 2. Սպիտակուց-լիգանդ կապման հաստատունի և կապման կենտրոնների թվի որոշումը

Ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության հարաբերական անկման և մարիչի կոնցենտրացիայի միջև կախվածությունը ստատիկ մարման դեպքում բնութագրվում է հետևյալ հավասարումով՝

$$\lg\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \lg K_A + n\lg[Q] \quad (10.2),$$

որտեղ K_A-ն կապման հաստատունն է, n-ը՝ կապման կենտրոնների թիվը: Ուստի $\lg\left(\frac{F_0 - F}{F}\right)$-ը՝ կախվածությունը $\lg[Q]$-ից կարելի է օգտագործել կապման հաստատունի և կապման կենտրոնների թիվը հաշվելու համար:

Փորձարարական մաս

Փորձերի համար անհրաժեշտ են.

- ցուլի շիճուկային ալբումինի (ՑՇԱ) 5.10^{-7} Մ լուծույթ,
- ասկորբինաթթվի 5.10^{-3} Մ մայր լուծույթ,
- ֆիզիոլոգիական լուծույթ:

Ասկորբինաթթվի մայր լուծույթից 7-ական մկլ ավելացնելով 3.5 մլ սպիտակուցի լուծույթին, տիտրել 1.0 -ից մինչև 1.0 Մ կոնցենտրացիոն տիրույթում: Ֆլուորեսցենտային չափումները կատարել 300-450 նմ տիրույթում և գրգռման ալիքի երկարությունը ընտրել 280 նմ:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3. Սպիտակուց-լիգանդ կապման թերմոդինամիկական պարամետրերի և փոխազդեցության ուժերի բնույթի որոշումը

Պարզելով կապման հաստատունի ջերմաստիճանային կախվածությունը՝ կարող ենք հաշվել սպիտակուցին լիգանդի կապման թերմոդինամիկական պարամետրերը: Սպիտակուցի և լիգանդի միջև փոխազդեցությունները կարող են լինել հիդրոֆոբ, էլեկտրոստատիկ, վան-դեր-վաալսյան, կարող են առաջանալ ջրածնական կապեր և այլն: Այս փոխազդեցությունների բնույթը կարելի է պարզել ըստ կապման պրոցեսի էնթալպիայի և էնտրոպիայի փոփոխության: Պարզվել է, որ եթե $\Delta H > 0$ և $\Delta S > 0$, ապա համակարգում առկա են հիդրոֆոբ փոխազդեցություններ, եթե $\Delta H < 0$ և $\Delta S < 0$՝ համակարգում գերիշխում են ջրածնական կապերը և վան-դեր-վաալսյան փոխազդեցությունները, իսկ եթե $\Delta H < 0$ և $\Delta S > 0$՝ էլեկտրոստատիկ փոխազդեցությունները:

Սպիտակուց–լիգանդ կապման թերմոդինամիկական պարամետրերը որոշում են ըստ Վանտ- Հոֆի հավասարման՝

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (10.3):$$

Գիբսի էներգիայի փոփոխությունը կարելի է որոշել համաձայն հետևյալ հավասարման՝

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10.4):$$

Փորձարարական մաս

Ասկորբինաթթվի և ՑՇԱ-ի կապման հաստատունը որոշել 296 Կ-ում, ըստ աշխատանք 2-ի նկարագրության: Կառուցել Վանտ-Հոֆի կախվածությունը, որի օգնությամբ որոշել կոմպլեքսագոյացման պրոցեսի էնթալպիայի և էնտրոպիայի փոփոխությունները: Եզրակացություն անել փոխազդեցության ուժերի բնույթի վերաբերյալ:

Տալ կապման կենտրոնների թվի ջերմաստիճանից ունեցած կախվածության բացատրությունը:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 3. D-A հեռավորության որոշումը

Համաձայն Ֆյոստերի ոչ ճառագայթային էներգիայի անցման տեսության՝ էներգիայի անցման արդյունավետությունը կախված է ոչ միայն D-A հեռավորությունից, այլ նաև ֆյոստերյան հեռավորությունից՝

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (10.5),$$

R_0^6 -ն հաշվարկվում է ըստ հետևյալ հավասարման՝

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} k^2 N^{-4} \Phi J \quad (10.6),$$

որտեղ κ^2=2/3, N=1.336, Φ = 0.18, J -ն վերադրման ինտեգրալն է: Եթե դոնոր-ակցեպտոր հեռավորությունը՝ $r < 7$, ապա էներգիայի անցումը իրականացվում է մեծ արդյունավետությամբ: ՖՌԷԱ չափումների ժամանակ սպիտակուցի և ասկորբինաթթվի քանակները պետք է լինեն էկվիմոլային:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 4. Սպիտակուցի կոնֆորմացիայի փոփոխությունների ուսումնասիրությունները

Ասկորբինաթթվի հետ ՑՇԱ-ի կապման հետևանքով առաջացած կոնֆորմացիոն փոփոխությունները կարելի է ուսումնասիրել սինքրոն ֆլուորեսցենցիայի մեթոդով: Սինքրոն ֆլուորեսցենտային սպեկտրները կարող են տեղեկություն տալ մակրոմոլեկուլի, մասնավորապես ֆլուորոֆորի միկրոշրջապատի կառուցվածքային փոփոխությունների մասին: Ըստ Միլերի տեսության, երբ $\Delta\lambda$ -ն գրգռման և առաքման ալիքների միջև կազմում է 15 նմ, սինքրոն ֆլուորեսցեն-

ցիան տալիս է բնութագրական տեղեկություն Tyr-ային մնացորդների համար, իսկ $\Delta\lambda$ = 60 նմ-ի դեպքում ստացվող տեղեկությունն իր մեջ նաև ամփոփում է Trp-ային մնացորդների ազդեցությունը:

Փորձարարական մաս

Պատրաստել ՑՇԱ-ի 5×10^{-7}մոլ/լ և ասկորբինաթթվի 9.0 մոլ/լ կոնցենտրացիայով լուծույթներ: 1 - 6 նմուշների համար փորձանոթների մեջ լցնել 3.5 մլ ՑՇԱ-ի լուծույթ և յուրաքանչյուրին ավելացնել ասկորբինաթթվի նշված քանակները 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 մոլ/լ: Գրանցել սպեկտրները $\Delta\lambda$ =15 նմ և $\Delta\lambda$ = 60 նմ պայմաններում:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 5. Սինքրոն ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիան գինու և գինու թորվածքների անալիզի համար

Գինին և մաճառը բազմաբաղադրիչ համակարգեր են, որոնք օժտված են ֆլուորեսցենցելու հատկությամբ՝ պայմանավորված գալաթթվի, վանիլաթթվի, պ-կումարաթթվի, ֆերուլաթթվի առկայությամբ: Սակայն մեկ ալիքային գրգռմամբ առաքման սպեկտրները հաճախ անբավարար են: Նման դեպքում կարելի է օգտագործել սինքրոն ֆլուորեսցենցիան: Այն հիմնված է գրգռման և առաքման ալիքների միաժամանակյա սինքրոն սկանավորման վրա՝ պահպանելով հաստատուն տարբերություն դրանց միջև: Այս մեթոդը կարելի է օգտագործել կոնյակի, կարմիր գինու նմուշների որակը գնահատելու համար, ինչպես նաև հայտնաբերելու այնպիսի կեղծումներ, որոնք պայմանավորված են կաղնե տակառներում ծերացվող մաճառին կարամելի ավելացմամբ: Սպեկտրները գրանցել 220-700 նմ տիրույթում՝ օգտագործելով $\Delta\lambda$ =10-100 նմ, քայլ:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 6. Սպիտակուցի բարձր ջերմաստիճանային բնափոխումը

Փորձարարական մաս

Պատրաստել ալբումինի 5×10^{-7} մոլ/լ կոնցենտրացիայով 5 մլ լուծույթ: Որպես լուծիչ օգտագործել ֆիզիոլոգիական լուծույթը: Սպիտակուցի լուծույթը պատրաստելուց հետո այն տեղափոխել 1սմ լայնություն ունեցող կյուվետի մեջ, տեղադրել ֆլուորոմետրի համապատասխան բաժանմունքում, միացնել ջուրը մղող թերմոստատը, ֆիքսել ջերմաստիճանը 36°C և սկսել փորձը: Սպեկտրների գրանցման պայմանները չպետք է փոխել փորձի կատարման ընթացքում. գրգռման ալիքի երկարությունը՝ λ = 280 նմ, սպեկտրների գրանցման տիրույթը՝ 290-500 նմ, ջերմաստիճանի բարձրացման արագությունը 2°C/րոպե, ջերմաստիճանային տիրույթը 36-80°C:

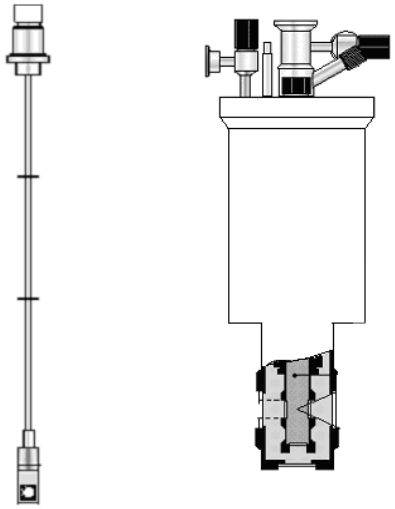
Ստացված արդյունքների հիման վրա կառուցել սպիտակուցի բնափոխման կորը՝ ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից: Ըստ հալման կորի պարզել սպիտակուցի բնափոխման մեխանիզմը և որոշել հալման ջերմաստիճանը ըստ սիգմոիդալ թռիչքի միջնակետի:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7. Սպիտակուցի ցածր ջերմաստիճանային բնափոխում. Դանդաղ սառեցման ռեժիմ

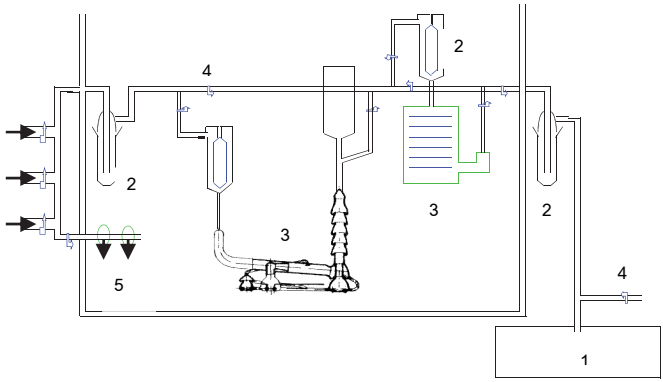
Փորձարարական մաս

Պատրաստել ալբումինի 5×10^{-7} մոլ/լ կոնցենտրացիայով 5 մլ լուծույթ: Որպես լուծիչ օգտագործել 20%-ոց ջուր-դիմեթիլսուլֆօքսիդային (ԴՄՍՕ) լուծույթը: Այն ցածր ջերմաստիճաններում (մինչև -56°C) չի բյուրեղանում, այլ առաջացնում է ապակենման վիճակ, որը հնարավորություն է տալիս ուսումնասիրել սպիտակուցների հետ կատարվող կառուցվածքային փոփոխությունները ցածր ջերմաստիճաններում: Այս չափումների համար օգտագործվում է Optistat^{DN}

կրիոստատը, որի սխեմատիկ պատկերը բերված է նկ. 10.1-ում: Լուծույթով կյուվետը տեղադրվում է կրիոստատի մեջ, որտեղ ցածր ջերմաստիճանները ապահովվում են հեղուկ ազոտով սառեցման պայմաններում: Նախօրոք կրիոստատը վակուումացվում է հատուկ սարքի միջոցով, որի սխեման բերված է նկ. 10.2-ում:



Նկ. 10.1 Optistat^{DN} կրիոստատի սխեմատիկ պատկերը:



Նկ. 10.2 Optistat^{DN} կրիոստատի վակուում սարքի սխեման. 1. ռոտացիոն պոմպ, 2. որսիչ, 3. դիֆուզիոն պոմպ, 4. ծորակ, 5. վակուումետր:

Կրիոստատը տեղադրվում է ֆլուորոմետրի հատուկ բաժանմունքում և ջերմաստիճանը կարգավորող հատուկ սարքավորման միջոցով (Intelligent Temperature Controller) հաստատուն ֆիքսված ջերմաստիճանի պայմաններում գրանցվում են ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրները: Սպեկտրների գրանցման պայմաններն են. գրգռման ալիքի երկարությունը՝ λ=280 նմ, սպեկտրների գրանցման միջակայքը 290-500 նմ, ջերմաստիճանի փոփոխման արագությունը 5°C/րոպե, ջերմաստիճանային տիրույթը +20-ից մինչև -20 °C: Կառուցել հալման կորը և որոշել հալման ջերմաստիճանը:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 7. Ցածր ջերմաստիճանային բնափոխում. Արագ սառեցման ռեժիմ

Փորձարարական մաս

Պատրաստել ալբումինի 5×10^{-7} մոլ/լ կոնցենտրացիայով 5 մլ լուծույթ: Որպես լուծիչ օգտագործել ԴՄՍՕ-ի 20%-ոց ջրային լուծույթը:

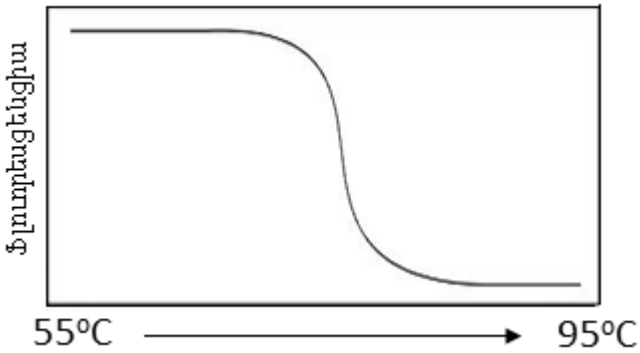
Գրանցել ֆլուորեսցենտային սպեկտրը մինչ սառեցումը: Լուծույթները սառեցնել մինչև բյուրեղացման ջերմաստիճան՝ ընկղմելով հեղուկ ազոտի մեջ: Սառեցման արագությունը 50°C/րոպե: Պահել հեղուկ ազոտի մեջ 30 րոպե, որից հետո հալեցնել լուծույթը նույն արագությամբ: Նորից գրանցել ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրը: Կրկնել սառեցման/հալեցման պրոցեսը 2 անգամ՝ Ըստ ֆլուորեսցենտային սպեկտրի ինտենսիվության փոփոխության գնահատել ոչ-դարձելի դենատուրացված սպիտակուցի քանակը: Իրականացնել 3D սպեկտրների գրանցում հետևյալ ռեժիմով. $\lambda_{գր.}$=200-500 նմ, $\lambda_{ար.}$=200-500 նմ, $\Delta\lambda$ =10 նմ: Մուտքային և ելքային ճեղքերի բացվածքը 5 նմ: Անել եզրակացություններ պոլիպեպտիդային շղթաների դասավորվածության մասին:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 8. ԴՆԹ-ի ջերմային բնափոխման ուսումնասիրությունը

Ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով ԴՆԹ-ն ուսումնասիրելու համար օգտագործում են արտաքին նշանակիրների մեթոդը: ԴՆԹ-ի համար որպես ֆլուորեսցենցող նշանակիր կարելի է օգտագործել ակրիդինային նշանակիրներ, էթիդիումի բրոմիդը (ԷԲ) և այլ հարթ կառուցվածք ունեցող կատիոնային միացություններ: ԷԲ-ն ունի ցիկլային կառուցվածք և կազմված է իրար միացած անիլինային և պիրիդինային խմբերից: ԷԲ-ի մոլեկուլը ունի հիդրոֆոբ բնույթ և, ներթափանցելով երկպարույր ԴՆԹ-ի ներքին տիրույթ, առաջացնում է վան-դեր-վաալսյան կապեր ԴՆԹ-ի հիմքերի հետ (տե՛ս նկ. 8.8): ԴՆԹ-ին կապվելիս ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունն աճում է մոտ 30 անգամ: Ինչպես գիտենք, ջրի մոլեկուլները հանդիսանում են ֆլուորեսցենցիայի ուժեղ մարիչներ: Կապվելով ԴՆԹ-ի մոլեկուլին՝ ԷԲ-ն անցնում է ԴՆԹ-ի հիդրոֆոբ տիրույթ, ինչը թույլ է տալիս նրան ազատվել լուծիչի (ջրի) մոլեկուլներից: Ջրի մոլեկուլ-

ներով մարման բացակայությունն էլ հենց պայմանավորում է ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության աճը: Բնափոխման ժամանակ, երբ ԴՆԹ-ի երկպարույրը քանդվում է՝ առաջացնելով երկու առանձին շղթաներ, երկպարույրի բացմանը զուգընթաց ազոտական հիմքերի միջև գտնվող ԷԲ-ի մոլեկուլները դուրս են գալիս ԴՆԹ-ի հիդրոֆոբ տիրույթից դեպի լուծիչ: Դրա արդյունքում տեղի է ունենում ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի մարում ջրի մոլեկուլներով և ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության փոքրացում: Ջերմաստիճանը բարձրացնելիս ԴՆԹ-ի երկպարույրը պահող ջրածնական կապերը սկսում են քանդվել այն հատվածներում, որտեղ դրանք ավելի թույլ են, սովորաբար A - T զույգերի մոտ: Դրա հետևանքով երկպարույրը ձեռք է բերում հանտելային կառուցվածք՝ առաջանում են, այսպես կոչված, խոռոչներ: Այնուհետև ավելի բարձր ջերմաստիճաններում քանդվում են ԴՆԹ-ի երկպարույրի կառուցվածքը պայմանավորող բոլոր ջրածնական կապերը և առաջանում են երկու առանձին շղթաներ (տե՛ս նկ. 8.9):

Կառուցելով ԷԲ-ի ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության կախվածությունը ջերմաստիճանից՝ ստանում ենք ԴՆԹ-ի բնափոխման (հալման) կորը (նկ. 10.3), որից էլ որոշում ԴՆԹ-ի բնափոխման (հալման) ջերմաստիճանը:



Նկ. 10.3 ԴՆԹ-ի թերմիկ դենատուրացման կորը:

ԴՆԹ-ի հալման ջերմաստիճանը այն ջերմաստիճանն է, որի դեպքում ԴՆԹ-ի մոլեկուլների 50%-ը գտնվում է երկպարույրի, իսկ մնացած 50%-ը՝ առանձին շղթաների ձևով:

Փորձարարական մաս

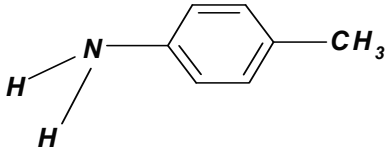
Վերցնել 1.35 մլ ցիտրատային բուֆերի լուծույթ (0.015 Մ NaCl և 0.0015 Մ $Na_3C_6H_5O{\cdot}5.5H_2O$, pH=7.5), ավելացնել 0.4 մլ դիմեթիլֆորմամիդ: Լուծույթը լավ խառնել և վրան ավելացնել 0.23 մլ 23×10^{-6} մոլ/լ կոնցենտրացիայով ԷԲ-ի լուծույթ: Այն թողնել մինչև համասեռ լուծույթի ստացվելը և վրան ավելացնել 0.02 մլ ԴՆԹ-ի 2.5×10^{-5} մոլ/լ կոնցենտրացիայով լուծույթ: Ստացված լուծույթը լցնել ֆլուորեսցենտային կյուվետի մեջ և տեղադրել սպեկտրաֆոտոմետրի նմուշադրման բաժանմունքում, որտեղ ջերմաստիճանի բարձրացումը կարգավորվում է LAUDA A100 թերմոստատի միջոցով: Չափումները կատարել 50–90°C ջերմաստիճանային տիրույթում՝ ջերմաստիճանի բարձրացման արագությունը 2°C/րոպե: ԷԲ-ի գրգռման ալիքի երկարությունը՝ $\lambda_{գր.}$ = 520 նմ: Յուրաքանչյուր ջերմաստիճանի համար ֆլուորեսցենտային սպեկտրից գրանցել 585 նմ ալիքի երկարությանը

համապատասխանող ինտենսիվության արժեքը: Ստացված արժեքները նորմավորել Origin8 համակարգչային ծրագրի միջոցով և կառուցել ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվության ջերմաստիճանային կախվածությունը, որն իրենից ներկայացնում է ԴՆԹ-ի բնափոխման կորը: Ստացված կորից որոշել ԴՆԹ-ի բնափոխման ջերմաստիճանը:

ԱՇԽԱՏԱՆՔ 9. Պ-տոլուիդինի փոխազդեցության ուսումնասիրությունը տարբեր տիպի լուծիչների հետ

Փորձարարական մաս

Աշխատանքի նպատակն է պարզել տարբեր բնույթի լուծիչների հետ պ-տոլուիդինի փոխազդեցությունը՝ օգտագործելով ֆլուորեսցենտային սպեկտրոսկոպիայի մեթոդը: Պատրաստել պ-տոլուիդինի - ($C_6H_4CH_3NH_2$)



10^{-4} մոլ/լ կոնցենտրացիայի լուծույթներ հետևյալ լուծիչներում՝ հեքսան, ցիկլոհեքսան, բենզոլ, 1,4-դիօքսան, ակրիլոնիտրիլ, ԴՄՍՕ, դիմեթիլֆորմամիդ, MeOH, EtOH, PrOH, i-PrOH, t-BuOH:

Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրները

Գրանցել լուծույթների էլեկտրոնային կլանման սպեկտրները: Սպեկտրների գրանցման պայմաններն են. $\lambda = 200 - 400$ նմ, t=20°C, $\ell = 1$ սմ: Նախ գրանցել լուծիչի սպեկտրը, ապա՝ լուծույթինը: Լուծույթի սպեկտրից հանելով լուծիչի սպեկտրը՝ կստանանք լուծված նյութի սպեկտրը:

Ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրները

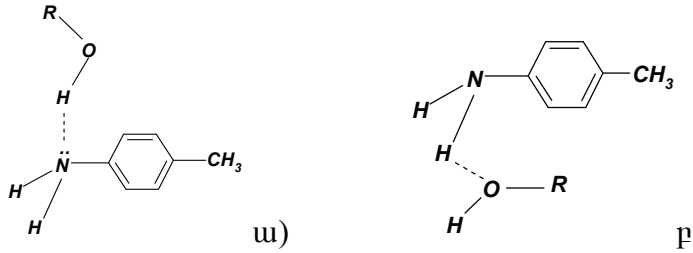
Գրանցել ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրները՝ որպես գրգռման ալիքի երկարություն ընտրելով էլեկտրոնային կլանման սպեկտրների առավել երկարալիքային մարզի կլանման մաքսիմումի արժեքը: Օգտագործել քառակուսային կտրվածքով, 1սմ օպտիկական ճանապարհով ստանդարտ կվարցե կյուվետներ: էլեկտրոնային կլանման սպեկտրներից որոշել λ_a-ն, ֆլուորեսցենտային սպեկտրներից՝ λ_f-ը: Հաշվել $\Delta\nu = \left(\overline{\nu}_a - \overline{\nu}_f\right)$, Δf-ը և կառուցել Լիպերտի կախվածությունը: Գնահատել ոչ յուրահատուկ և յուրահատուկ փոխազդեցությունները, տալ բացատրություն:

Աղյուսակ 6-ում բերված են մի շարք լուծիչների դիէլեկտրիկ թափանցելիության, բեկման ցուցիչի արժեքները:

Ելնելով ստացած արդյունքներից քննարկել տարբեր տիպի լուծիչների հետ պ-տոլուիդինի փոխազդեցությունը (յուրահատուկ, ոչ յուրահատուկ), ինչպես նաև առանձնահատուկ ուշադրություն դարձնել բևեռային պրոտոնային լուծիչների հետ փոխազդեցությանը:

Էլեկտրոնային կլանման սպեկտրներ

Պ-տոլուիդինը հիմնական վիճակում ընդունակ է լուծիչի մոլեկուլների հետ առաջացնել ջրածնական կապ՝ հանդես գալով որպես ջրածնական կապի և′ դոնոր, և′ ակցեպտոր (նկ. 10.4):



Նկ. 10.4 Հիմնական վիճակում պ-տոլուիդինի և պրոտոնային լուծիչի մոլեկուլների միջև հնարավոր ջրածնական կապերը (ա, բ):

Պարզաբանել հիմնական վիճակում պ-տոլուիդինի հետ տարբեր տիպի լուծիչների փոխազդեցությունը, սպիրտների շարքում՝ շղթայի երկարացման և ճյուղավորման դեպքում:

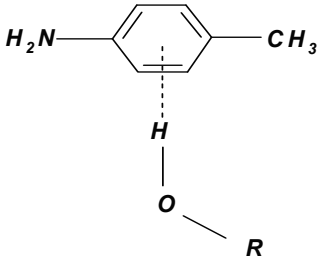
Աղյուսակ 6

Լուծիչների դիէլեկտրիկ թափանցելիության, բեկման ցուցիչի արժեքները

Լուծիչ		ε	***n*** **(20;D)**	Δ**f, սմ**$^{-1}$	λ **կլ., նմ**	λ **ֆլ., Նմ**	$\Delta\bar{\nu} \times 10^3$**, սմ**$^{-1}$
ոչ բևեռային	Ցիկլոհեքսան		1.4262				
	Հեքսան		1.3749				
	Բենզոլ		1.5011				
	Տոլուոլ		1.4969				
	1,4-դիօքսան		1.4224				
	Քլորոֆորմ		1.4458				
	Դիէթիլեթեր		1.3526				
	Բուտիլ-ացետատ		1.3930				
բևեռային ապրոտոնային	ԴՄՍՕ		1.4783				
	ԴՄՖԱ		1.4475				
	Ացետոնիտրիլ		1.3441				
բևեռային պրոտոնային	Էթանոլ		1.3614				
	Մեթանոլ		1.3284				
	Պրոպանոլ-2		1.3772				
	Իզոպրոպանոլ		1.3774				
	երր-բուտանոլ		1.3846				
	Բուտանոլ		1.4157				
	Ջուր		1.3329				

Ֆլուորեսցենտային առաքման սպեկտրներ

Պ-տոլուիդինի հիմնական վիճակի դիպոլ մոմենտը փոքր է գրգռված վիճակի դիպոլ մոմենտից, բացի այդ գրգռված վիճակում պ-տոլուիդինի արոմատիկ օղակի բացասական մարզի և պրոտոնային լուծիչների մոլեկուլների միջև առաջանում է լրացուցիչ ջրածնական կապ, որը սխեմատիկորեն պատկերված է նկ. 10.4-ում:



Նկ. 10.4 Գրգռված վիճակում պ-տոլուիդինի և պրոտոնային լուծիչի մոլեկուլների միջև առաջացած ջրածնական կապի սխեմատիկ պատկերը:

Ստացած արդյունքների հիման վրա անել եզրակացություններ օգտագործված ֆլուորոֆորի հնարավոր տեղայնացման վերաբերյալ:

10.2. Սպիտակուցների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի վերլուծության կանոնները

Տվյալ բաժնում ներկայացված են փորձնականորեն դիտված որոշ օրինաչափություններ:

1. Եթե հայտնի է, որ սպիտակուցը չի պարունակում հատուկ ֆլուորեսցենցող բաղադրիչներ, ապա դրա ողջ ֆլուորեսցենցիան պայմանավորված է Trp-ային, Tyr-ային և Phe-ային մնացորդներով:
2. Լուծիչի բևեռայնության նվազեցման դեպքում տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրում λ_{max}-ը տեղաշարժվում է դեպի

կարճալիքային տիրույթ, իսկ λ_{max}-ին համապատասխանող ինտենսիվությունն աճում է.

(ա) Եթե λ_{max}-ը շեղված է դեպի սպեկտրի կարճալիքային մարզը, երբ սպիտակուցը գտնվում է բևեռային լուծիչում, ապա տրիպտոֆանը գտնվում է սպիտակուցի մոլեկուլի ներսում ոչ բևեռային միջավայրում:

(բ) Եթե λ_{max}-ը շեղված է դեպի սպեկտրի կարճալիքային մարզը, երբ սպիտակուցը գտնվում է ոչ բևեռային միջավայրում, ապա կամ տրիպտոֆանը գտնվում է սպիտակուցի մոլեկուլի մակերևույթին, կամ այն հայտնվում է մակերևույթին՝ շնորհիվ լուծիչի կողմից հարուցված կոնֆորմացիոն փոփոխության:

3. Եթե միացությունը, որը հայտնի է որպես մարիչ (այսինքն մարում է ազատ ամինոթթվի ֆլուորեսցենցիան), ինչպիսիք են յոդիդ, նիտրատ կամ ցեզիումի իոնները, մարում են տրիպտոֆանի կամ թիրոզինի ֆլուորեսցենցիան, ապա այս ամինոթթուները պետք է լինեն սպիտակուցի մակերևույթին: Մարում կարող է տեղի չունենալ մի քանի պատճառներով՝

(ա) ամինոթթուն գտնվում է սպիտակուցի մոլեկուլի ներսում,

(բ) ամինոթթուն գտնվում է այնպիսի խոռոչում, որի չափսերը շատ փոքր են մարիչին ներս թողնելու համար,

(գ) ամինոթթուն գտնվում է ուժեղ լիցքավորված տիրույթում և այդ լիցքը կարող է վանել մարիչին: Օրինակ՝ յոդիդ իոնը (բացասական լիցքավորված մարիչ) չի կարող մարել տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիան, եթե վերջինը գտնվում է բացասականորեն լիցքավորված տիրույթում: Cs^+ իոնը ոչ էֆեկտիվ է դրական լիցքավորված տիրույթում գտնվող ֆլուորոֆորի դեպքում: Չեզոք մարիչը, ինչպիսին է ակրիլամիդը, անտարբեր է լիցքի նկատմամբ:

4. Եթե միացությունը չի ազդում ազատ ամինոթթվի քվանտային ելքի վրա, սակայն ազդում է սպիտակուցի ֆլուորեսցենցիայի

վրա, ապա այն հանգեցնում է սպիտակուցի կոնֆորմացիայի վերադասավորմանը:

5. Եթե տրիպտոֆանը և թիրոզինը գտնվում են բևեռային միջավայրում, ապա ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց դրանց ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքերը (Φ) նվազում են, մինչդեռ ոչ բևեռային միջավայրում Φ-ի փոփոխությունն աննշան է:
6. Ե՛վ տրիպտոֆանի, և՛ թիրոզինի Φ-ն նվազում է, եթե այս ամինոթթուների α-կարբոքսիլային խմբերը պրոտոնացված են:
7. Տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիան մարում է հարևան պրոտոնադրոնոր խմբերի ազդեցությամբ:
8. Եթե փոքր մոլեկուլի կլանման սպեկտրը վերադրվում է տրիպտոֆանի առաքման սպեկտրի հետ, իսկ ֆլուորոֆորների միջև հեռավորությունը փոքր է, ապա տեղի է ունենում մարում: Ուստի, եթե նման մոլեկուլի կապումը սպիտակուցին հանգեցնում է տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայի մարմանը, ապա տրիպտոֆանը գտնվում է կամ կապման տեղում, կամ դրան շատ մոտ:

10.3. Վարժություններ

1. Սպիտակուցի ներկայությամբ տեղի է ունենում 1-անիլին-8-նավթալինսուլֆոնատ անիոնի (ԱՆՍ) ֆլուորեսցենցիա: Հայտնի է, որ ԱՆՍ-ն թույլ ֆլուորեսցենցում է ջրում, իսկ ոչ բևեռային միջավայրում նրա ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքը զգալի աճում է: Եթե սպիտակուցի կոնցենտրացիան մեծացվի մինչ ԱՆՍ-ի ավելացումը, ապա ֆլուորեսցենցիան կթուլանա: Տալ ֆլուորեսցենցիայի թուլացման հնարավոր բացատրությունը:

2. Լուծիչի կողմից տրիպտոֆանային մնացորդների հասանելիությունը որոշելու համար կարելի է օգտագործել ֆլուորեսցենցիայի մարումը յոդիդ իոններով:
   Հայտնի է, որ սպիտակուցը պարունակում է միայն մեկ տրիպտոֆանային մնացորդ, որի ֆլուորեսցենցիան չի մարվում յոդիդ իոններով: Ինչպիսի՞ն են մարման բացակայության հնարավոր բացատրությունները:
   Հայտնի է, որ սպիտակուցը պարունակում է ութ տրիպտոֆանային մնացորդներ, և յոդիդ իոնները մարում են ֆլուորեսցենցիայի 25%-ը: Կարելի է ենթադրել, որ տրիպտոֆանային մնացորդներից երկուսը հասանելի են մարիչին: Նշել մի քանի գործոններ, որոնք կարող են այս ենթադրությունը դարձնել անհիմն:

3. Յոդիդ իոններով մարման արդյունքում ֆլուորեսցենցիայի ինտենսիվությունը նվազում է: Կարելի՞ է արդյոք ակնկալել կլանման և առաքման սպեկտրների ձևի փոփոխություն:

4. Տալ ֆլուորոֆորի ֆլուորեսցենցիայի քվանտային ելքի մեծացման հնարավոր մեխանիզմների մի քանի նկարագրություններ, երբ ֆլուորոֆորը կապվում է մեկ այլ մոլեկուլի հետ: Ինչու՞ երբեմն կարող են դիտվել շեղումներ կլանման և/կամ առաքման սպեկտրներում: Տեղաշարժը ո՞ր ուղղությամբ է տեղի ունենում՝ դեպի կարճալիքային, թե՞ երկարալիքային մարզ:

5. Արդյոք միշտ է ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրը նույնը, ինչ կլանման սպեկտրը: Պատասխանը հիմնավորել:

6. Տասը տրիպտոֆանային մնացորդներ պարունակող սպիտակուցն ունի ուժեղ տրիպտոֆանային ֆլուորեսցենցիա: Փոքր մոլեկուլը, որն ունակ է ուժեղ կապվել սպիտակուցին, փոփոխության չի ենթարկում դրա ֆլուորեսցենցիան, չնայած, հայտնի է, որ կապման տիրույթում առկա են տրիպտոֆանային երկու մնացորդներ: Տալ այս երևույթի հնարավոր մի քանի բացատրություն:

7. Ֆլուորոֆորը կովալենտային կապով կապված է սպիտակուցին: Որոշվել է ֆլուորեսցենցիայի բևեռացումը այն բուֆերի իոնային ուժից կախված, որում պատրաստվել է սպիտակուցը: Պարզվել է, որ իոնային ուժի մեծացման հետ ֆլուորեսցենցիայի բևեռացումը զգալիորեն նվազում է: Ինչպե՞ս է իոնային ուժի աճն ազդում սպիտակուցի վրա:

8. Սպիտակուցի մոլեկուլը պարունակում է մեկ որոշակի դիրքում կովալենտային կապով կապված F ֆլուորոֆոր: Տրիպտոֆանը գրգռելիս տրիպտոֆանային ֆլուորեսցենցիան շատ թույլ է, մինչդեռ F-ը շատ ուժեղ ֆլուորեսցենցում է: Բացա-

տրել հետևյալ դիտարկումներից յուրաքանչյուրը (նշենք, որ դրանք այլընտրանքային և իրար բացառող դիտարկումներ են):

Յոդիդ իոնը մարում է ոչ թե տրիպտոֆանի, այլ F-ի ֆլուորեսցենցիան:

Յոդիդ իոնը մարում է և՛ տրիպտոֆանի, և՛ F-ի ֆլուորեսցենցիան:

pH-ի բարձրացումը մինչև 9 հանգեցնում է F-ի ֆլուորեսցենցիայի անհետացմանը և տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայի ուժեղացմանը (դիցուք, pH-ը չի ազդում ազատ տրիպտոֆանի և չկապված F-ի վրա):

pH-ի բարձրացումը մինչև 9 հանգեցնում է տրիպտոֆանի ֆլուորեսցենցիայի անհետացմանը և F-ի ֆլուորեսցենցիայի զգալի ուժեղացմանը:

10.4. Պատասխաններ

1. Մեծ կոնցենտրացիաների դեպքում սպիտակուցը դիմերվում է: Արդյունքում կամ դիմերման կենտրոնը ԱՆՍ-ի հետ կապման կենտրոնն է, կամ դիմերման հետևանքով տեղի են ունենում այնպիսի կոնֆորմացիոն փոփոխություններ, որոնք հանգեցնում են մակերևույթի բևեռայնության աճին:
2. Տրիպտոֆանը կարող է գտնվել սպիտակուցի մոլեկուլի ներսում այնպիսի խոռոչում, որի չափսերը փոքր են յողիդ իոնների ներթափանցման համար, կամ այն գտնվում է բացասական լիցքավորված ամինոթթուների հարևանությամբ: Տրիպտոֆանային մնացորդների քվանտային ելքերը կարող են տարբերվել իրարից: Մակերևույթին գտնվող մնացորդների մի մասը կարող է գտնվել բացասականորեն լիցքավորված տիրույթում:
3. Ոչ:
4. Կոմպլեքսը կարող է ունենալ այլ էներգետիկ մակարդակներ, կամ կարող է փոքր լինել մարման հավանականությունը: Հաշվի առնելով էներգետիկ մակարդակների տարբերությունները՝ կարող են տեղի ունենալ սպեկտրալ շեղումներ ցանկացած ուղղությամբ:
5. Ոչ, քանի որ որոշ անցումներ չեն հանգեցնում ֆլուորեսցենցիայի:
6. Տրիպտոֆանային մնացորդների ֆլուորեսցենցիան կարող է արդեն լինել մարած: Լիգանդը կարող է մարող գործոններից մեկը հեռացնել, սակայն փոխարենը՝ մեկ այլ գործոն ներմուծել: Լիգանդի կապումը կարող է հանգեցնել սպիտակուցի ամբողջ մոլեկուլի կոնֆորմացիայի փոփոխությանը: Արդյունքում կապման տիրույթում եղած մնացորդների ֆլուորեսցենցիայի մարումը փոխհատուցվում է այն մնացորդների ֆլուո-

ռեսցենցիայի ուժեղացմամբ, որոնք գտնվում էին մոլեկուլի մեկ այլ մասում և, որոնց ֆլուորեսցենցիան արդեն մասնակիորեն մարվել էր մինչ լիգանդի կապումը:

7. Իոնային ուժի մեծացմանը զուգընթաց սպիտակուցի մոլեկուլը բացվում է, ինչի հետևանքով ֆլուորոֆոր պարունակող տիրույթներն ավելի ճկուն են դառնում: Մյուս դեպքում սպիտակուցը կարող է դառնալ շատ կոմպակտ և սիմետրիկ, ինչը նույնպես նպաստում է արագ պտույտին:
8. Առաջին դիտարկման դեպքում ֆլուորոֆորը գտնվում է տրիպտոֆանին շատ մոտ և տեղի է ունենում էներգիայի միգրացիա: Ֆլուորոֆորը գտնվում է մակերևույթին, հետևաբար մակերևույթին է գտնվում նաև տրիպտոֆանը: Հնարավոր է, որ տրիպտոֆանը չի գտնվում բացասական լիցքավորված տիրույթում և մարումից նրան պաշտպանում է ֆլուորոֆորը:

   Երկրորդ դեպքը կարելի է բացատրել առաջինի նման, բացառությամբ այն հանգամանքի, որ բախումների արդյունքում ֆլուորոֆորը չի պաշտպանում տրիպտոֆանին մարումից:

   Երրորդ դեպքում, երբ pH-ը 9 է, տեղի է ունենում կոնֆորմացիոն վերադասավորում, ինչի հետևանքով F-ը հեռանում է տրիպտոֆանից:

   Չորրորդ դեպքում, երբ pH-ը 9 է, տրիպտոֆանը և ֆլուորոֆորը իրար շատ մոտ են գտնվում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, New York, 2006, p. 954.
2. B. Valeur, Molecular Fluorescence, Principles and Applications, Wiley-VCH, 2002, p. 387.
3. J. R. Albani, Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy Blackwell Publishing, 2007, p. 260.
4. H. Xu, Q. Liu, Y. Zuo, Y. Bi, S. Gao, J. Solution Chem., 2009, V. 38, p. 15-25.
5. J. B. Xiao, X. Q. Chen, X. Y. Jiang, M. Hilczer, M. Tachiya, J. Fluoresc., 2008, v. 18, p. 671- 678.
6. A. S. Ladokhin, Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis, Encyclopedia of Analytic Chemistry, R. A. Meyers (Ed.) pp. 5762-5779. Published Online: 15 SEP 2006, DOI: 10.1002/9780470027318.a1611.
7. D. E. Schlamadinger, D. I. Kats, J.E.Kim, Quenching of Triptophan Fluorescence in Unfolded Cytochrome c: A Biophysical Experiment for Physical Chemistry Students, J. Chem. Educ., 2010, v. 87, N9, p. 961-964.
8. C. Jagannath, V.M. Reddy, P.R. Gangadharam, Enhancement of drug susceptibility of multi-drug resistant strains of Mycobacterium tuberculosis by ethambutol and dimethyl sulphoxide. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 35, 1995, pp. 391-390.
9. S.A. Markarian, M.G. Aznauryan, Study on the interaction between Isoniazid and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy: The Effect of Dimethylsulfoxide, *Molecular Biology Reports*, v. 39, 2012, pp. 7559-7567.

10. L.S. Sargsyan, K.R. Grigoryan, S.A. Markarian, T. Burkholz, C. Jacob, Fluorescence characterization of human hemoglobin binding with tannic acid, *Chem. J. Arm.*, v. 67, No 2-3, 2014, pp. 181-187.
11. R. Jaenick, Folding and Association versus misfolding and aggregation of proteins, Phil. Trans. *R. Soc. Lond. B*, vol. 348, 1995, pp. 97-105.
12. R. Chang, Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences, University Science Books, USA, 2005, p. 1018.
13. T. Peters, All about Albumin. Genetics and Medical Applications, Academic Press, New York, 1996, p. 432.
14. K.R. Grigoryan, H.A. Shilajyan, Study of thermal denaturing of human serum albumin in the presence of potassium chloride by the excitation/emission matrix method, *J. App. Spectroscopy*, vol. 80, No 5, 2013, pp. 786-789.
15. K.Yu. Amirbekyan, A.P. Antonyan, P.O. Vardevanyan, Sh.A. Markarian, Molecular Interactions between Benzimide Trichloride (Hoechst 33258) and DNA in Dimethyl Sulfoxide Aqueous Solutions, According to Spectroscopy Data, *Russ. J. Phys. Chem. A,* v. 87, No 12, 2013, pp. 2027-2029.
16. S. Trond, B.S. Harald, Multiple binding modes for Hoechst 33258 to DNA, *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 33, 1985, p. 333-338.

ՀԱՎԵԼՎԱԾՆԵՐ

Հավելված 1

Հիմնարար հաստատուններ

Ֆիզիկական հաստատուն	**Պայմանական նշան**	**Արժեքը և միավորը**
Լույսի արագությունը (վակուումում)	C	$2.997\,924\,58\times10^{8}$ մ.վ$^{-1}$
Գազային հաստատուն	R	8.314 472 Ջ.մոլ$^{-1}$Կ$^{-1}$
Բոլցմանի հաստատուն	$k = RN_A^{-1}$	$1.380\,650\,3\times10^{-23}$ Ջ.Կ$^{-1}$
Պլանկի հաստատուն	h	$6.626\,068\,76\times10^{-34}$ Ջ.վ
Ավոգադրոյի թիվը	N_A	$6.022\,141\,99\times10^{23}$ մոլ$^{-1}$
Թափանցելիությունը վակուումում	μ_0	$4\pi\times10^{-7}$ Հն.մ$^{-1}$
Դիէլեկտրիկ թափանցելիությունը վակուումում	$\varepsilon = \mu_0^{-1}c^{-2}$	$8.854\,187\,816\times10^{-12}$Ֆ.մ$^{-1}$

Արժեքները վերցված են Mohr P. and Taylor B.N., J. Phys. Chem. Ref. Data, 28, 1715 (1999) և Rev. Mod. Phys., 72, 351 (2000).

Հավելված 2

Որոշ միավորների փոխադարձ կապը

Միավոր	**սմ$^{-1}$**	**ՄՀց**	**կՋ**	**էՎ**	**կՋ·մոլ$^{-1}$**
1սմ$^{-1}$	1	29 979.25	1.986×10^{-26}	$1.239\ 84\times10^{-4}$	$1.196\ 27\times10^{-2}$
1ՄՀց	$3.335\ 64\times10^{-5}$	1	$6.626\ 08\times10^{-31}$	$4.135\ 67\times10^{-9}$	$3.990\ 31\times10^{-7}$
1կՋ	$5.034\ 11\times10^{25}$	$1.509\ 19\times10^{30}$	1	$6.241\ 51\times10^{21}$	$6.022\ 14\times10^{23}$
1էՎ	8065.54	$2.417\ 99\times10^{8}$	$1.602\ 18\times10^{-22}$	1	96.485
1կՋ·մոլ$^{-1}$	83.5935	$2.506\ 07\times10^{6}$	$1.660\ 54\times10^{-24}$	$1.036\ 43\times10^{-2}$	1

Արժեքները վերցված են J. *Michael Hollas, Modern Spectroscopy, Fourth Edition, John Wiley& Sons, Ltd., 2004, p.452.*

Հավելված 3

Կենսաբանական կարևոր նշակություն ունեցող միացությունների սպեկտրների բնութագրերը

Միացություն	λ_{max}, **նմ**	ε, **լ·մոլ$^{-1}$·սմ$^{-1}$**
NAD, NADP	260	15 000
NADH, NADPH	260 340	15 000 6 200
FMN, FAD	260 375 445 450	15 000 10 000 (FMN) 9 000 (FAD) 12 500 (FMN) 11 000 (FAD)
Պիրիդոքսալ	250	3 000
	320	6 000
Խոլեստերոլ	235	20 000
Կալցիֆերոլներ	265	18 300
β-կարոտին	450	120 000
Ռետինոլ	330	45 000
Աղենոզին	267	12 300
Գուանոզին	248	11 000
Ցիտիդին	271	9 100
Թիմիդին	267	9 650
Ուրիդին	262	8 500

Հավելված 4

Նախածանցներ և բազմապատկիչներ

Բազմա-պատկիչ	**Նախածանց**	**Սիմվոլ**	**Բազմա-պատկիչ**	**Նախածանց**	**Սիմվոլ**
10^{-1}	Դեցի	D	10^{1}	Դեկա	Da
10^{-2}	Սանտի	C	10^{2}	Հեկտա	H
10^{-3}	Միլի	M	10^{3}	Կիլո	K
10^{-6}	Միկրո	μ	10^{6}	Մեգա	M
10^{-9}	Նանո	n	10^{9}	Գիգա	G
10^{-12}	Պիկո	P	10^{12}	Տերա	T
10^{-15}	Ֆեմտո	F	10^{15}	Պետա	P

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

ՆԱԽԱԲԱՆ 3
ԳԼՈՒԽ ԱՌԱՋԻՆ
ՆԵՐԱԾՈՒԹՅՈՒՆ 6
1.1 Ֆլուորեսցենցիան և գրգռված մոլեկուլների ապագրգռումը.....6
1.2 Ֆլուորեսցենտային նշանակիրներ.....14
ԳԼՈՒԽ ԵՐԿՐՈՐԴ
ՈՒԼՏՐԱՄԱՆՈՒՇԱԿԱԳՈՒՅՆ ԵՎ ՏԵՍԱՆԵԼԻ ԼՈՒՅՍԻ
ԿԼԱՆՈՒՄԸ. ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՅԻՆ ԱՆՑՈՒՄՆԵՐԻ
ԴԱՍԱԿԱՐԳՈՒՄԸ ԲԱԶՄԱՏՈՄ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐՈՒՄ 17
2.1 Էլեկտրոնային անցումների ինտենսիվությունը, Լամբերտ-
Բերի օրենքը, օսցիլյատորի ուժ 24
ԳԼՈՒԽ ԵՐՐՈՐԴ
ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՆ ԵՎ ԳՐԳՌՎԱԾ ՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ
ԱՊԱԳՐԳՌՄԱՆ ԱՅԼ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐԸ.....30
3.1 Ֆլուորեսցենտային առաքման բնութագրերը 30
3.2 Առաքման սպեկտրի անկախ լինելը գրգռման ալիքի
երկարությունից. Հայելային սիմետրիայի կանոնը 34
3.3 Ֆլուորեսցենցիայի տևողությունը և քվանտային ելքերը 37
ԳԼՈՒԽ ՉՈՐՐՈՐԴ
ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՆԵՐԻ ԿԱՊԸ ՄՈԼԵԿՈՒԼԻ
ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔԻ ՀԵՏ 40
4.1 Տեղակալված արոմատիկ ածխաջրածիններ 41
4.2 Էլեկտրոնակցեպտոր տեղակալիչների ազդեցությունը 42
4.3 Հետերոցիկլիկ միացությունների ֆլուորեսցենցիան.....42
ԳԼՈՒԽ ՀԻՆԳԵՐՈՐԴ
ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ԱՆԻԶՈՏՐՈՊԻԱ 45
5.1 Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացում. Առաքման անիզոտրոպիա 45

5.2 Ֆլուորեսցենցիայի բևեռացած վիճակի բնութագրերը (բևեռացման հարաբերություն, առաքման անիզոտրոպիա) 46
5.3 Կիրառությունները 53
ԳԼՈՒԽ ՎԵՑԵՐՈՐԴ
ՄԻՋՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ԱՌԱՔՄԱՆ ՎՐԱ 56
6.1 Ֆլուորեսցենցիայի մարում. Միջմոլեկուլային փոխազդեցություններով պայմանավորված ապագրգռման պրոցեսները 56
6.2 Ֆլուորեսցենցիայի մարիչներ 58
6.3 Դինամիկ մարում 59
6.4 Ստատիկ մարում.....61
6.5 Ստատիկ և դինամիկ մարումների համեմատությունը 62
6.6 Էքսիմերների և էքսիպլեքսների առաջացումը 65
ԳԼՈՒԽ ՅՈԹԵՐՈՐԴ
ԼՈՒԾԻՉԻ ԲԵՎԵՌԱՅՆՈՒԹՅԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՖԼՈՒՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ՍՊԵԿՏՐՆԵՐԻ ՎՐԱ.....68
7.1 Լուծիչի ընդհանրական ազդեցությունը. Լիպերտի-Մատագայի հավասարումը.....69
7.2 Լուծիչի յուրահատուկ ազդեցությունը 71
ԳԼՈՒԽ ՈՒԹԵՐՈՐԴ
ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՈՍԿՈՊԻԱՅԻ ԿԻՐԱՌՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՒՄ.....75
8.1 ԴՆԹ-ի նշանադրումը.....76
8.2 Սպիտակուց-լիգանդ փոխազդեցությունների ուսումնասիրությունը 77
8.3 Սպիտակուցների բնափոխման ուսումնասիրություններ.....87
8.4 ԴՆԹ-ի ջերմային բնափոխման ուսումնասիրությունը.....91

ԳԼՈՒԽ ԻՆՆԵՐՈՐԴ
ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՏԱՅԻՆ ՍՊԵԿՏՐՆԵՐԻ ԳՐԱՆՑՄԱՆ ՏԵԽՆԻԿԱՆ 96
9.1. Ստացիոնար և ժամանակային տարրալուծված ֆլուորեսցենցիա 96
ԳԼՈՒԽ ՏԱՍՆԵՐՈՐԴ
ԳՈՐԾՆԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐ ԵՎ ՎԱՐԺՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ 100
10.1 Գործնական աշխատանքներ 100
10.2 Սպիտակուցների ֆլուորեսցենցիայի սպեկտրի վերլուծության կանոնները 115
10.3 Վարժություններ 118
10.4 Պատասխաններ 121
ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ 123
ՀԱՎԵԼՎԱԾՆԵՐ 125

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ ՇԻՐԱԶ ԱԼԵՔՍԱՆԴՐԻ
ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ ԿԱՐԻՆԵ ՌԱՖԱՅԵԼԻ

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՖԼՈՒՈՐԵՍՑԵՆՑԻԱՅԻ ՀԻՄՈՒՆՔՆԵՐԸ

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Պատվականյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Վ. Դերձյանի

Ստորագրված է տպագրության՝ 01.06.2017:
Չափսը՝ 60x84 $^{1}/_{16}$: Տպ. մամուլը՝ 8.25:
Տպաքանակը՝ 100 :

ԵՊՀ հրատարակչություն
ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1
www.publishing.ysu.am

ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆ 2017
publishing.ysu.am