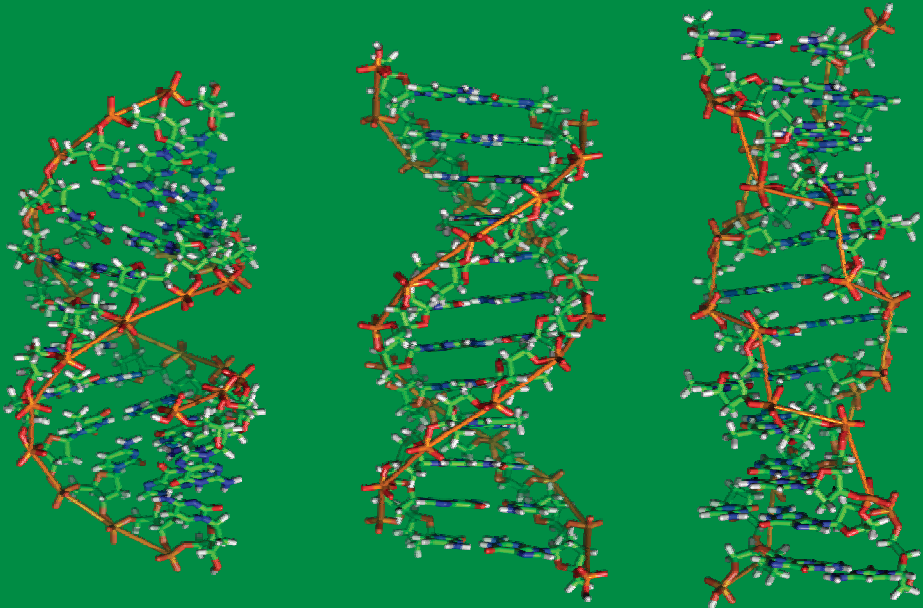


Պ.Յ. Վարդևանյան, Ա.Պ. Անտոնյան, Մ. Ա. Փարսադանյան

ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԳԻԶԻԿԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ

ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈԴԱԿԱՆԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ



ՄԱՍ 2

ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Պ.Հ.ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ, Ա.Պ.ԱՆՏՈՆՅԱՆ,
Մ.Ա. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ

**ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱՅԻ
ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈՂԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ**

ՄԱՍ 2

*ՄԱԿՐՈՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ՀԵՏ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ
ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ pK-ի ՈՐՈՇՈՒՄԸ: ԹԹՎԱՀԻՄՆԱՅԻՆ
ՀԱՎԱՍԱՐԱԿՇՈՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ
ՄՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴՈՎ*

ԵՐԵՎԱՆ
ԵՊՀ ՀՐԱՏԱՐԱԿՉՈՒԹՅՈՒՆ
2014

ՀՏԴ 577.32(072)

ԳՄԴ 28.071

Վ 304

Տպագրության է երաշխավորել ԵՊՀ կենսաֆիզիկայի ամբիոնը

Գրախոսներ՝

Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ – ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կենսաբանական

գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր

Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ – ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր

Հեղինակներ՝

Պ.Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ – կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր

Ա.Պ. ԱՆՏՈՆՅԱՆ – կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ

Մ.Ա. ՓԱՐՄԱՆԴԱՆՅԱՆ – կենսաբանական գիտությունների թեկնածու, դոցենտ

ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ Պ.Հ.

- Վ. 304 Մոլեկուլային կենսաֆիզիկայի լաբորատոր աշխատանքների ուսումնամեթոդական ձեռնարկ/ Պ.Հ. Վարդանյան, Ա.Պ. Անտոնյան, Մ.Ա. Փարսադանյան: Մաս 2 (Մակրոմոլեկուլների հետ լիզանդների կոմպլեքսների pK-ի որոշումը: Թթվահիմնային հավասարակշռության վերլուծությունը սպեկտրաֆոտոմետրիայի մեթոդով): Եր., ԵՊՀ հրատ., 2014, - 64 էջ:

Ձեռնարկը նվիրված է կենսաբանական հետազոտություններում, մասնավորապես, կենսաբանական ակտիվությամբ օժտված մոլեկուլների և մակրոմոլեկուլների թթվա-հիմնային հավասարակշռության, pK-ի որոշման մեջ սպեկտրաֆոտոմետրիայի մեթոդի կիրառությանը: Այդ մեթոդը հնարավորություն է ընձեռում ուսումնասիրելու կենսաբանական համակարգերի կառուցվածքը տարբեր մակարդակներում, ինչպես նաև դրանցում տեղի ունեցող տարաբնույթ գործընթացները:

Ձեռնարկը պարունակում է «Մոլեկուլային կենսաֆիզիկա» ծրագրով նախատեսված դասընթացի մեջ ներառված մակրոմոլեկուլների կառուցվածքի և գործառության հետազոտմանը վերաբերող մի շարք հարցեր:

ՀՏԴ 577.32(072)

ԳՄԴ 28.071

ISBN 978-5-8084-1852-3

© ԵՊՀ հրատարակչություն, 2014

© Հեղ. խումբ, 2014

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

1. ՍղեպՏՐԱՍԿՈՂԻԱՅԻ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՀԱՍԿԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ.....	5
2. ՍղեպՏՐԱՍԿՈՂԻԱՅԻ ԳԼԽԱՎՈՐ ՕՐԵՆՔԸ	11
3. ՍղեպՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԵՐԻ ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՄԿՋԲՈՒՆՔԸ	14
4. ՍղեպՏՐԱՍԿՈՂԻԿ ՓՈՐՁԵՐԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ	19
5. ԲԱԶՄԱԲԱՂԱԴՐԻՉ ՀԱՍԱԿԱՐԳԵՐԻ ՍղեպՏՐՆԵՐԻ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ	23
6. ԴԻՖԵՐԵՆՑԻԱԼ ՄԵԹՈԴԸ ԿԼԱՆՄԱՆ ՍղեպՏՐԱՍԿՈՂԻԱՅՈՒՄ	25
6.1. ԴԻՖԵՐԵՆՑԻԱԼ ԿԼԱՆՄԱՆ ՍղեպՏՐԱՍԿՈՂԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴԻ ՀԻՄՈՒՆՔՆԵՐԸ.....	25
6.2. ԴԻՖԵՐԵՆՑԻԱԼ ՍղեպՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԵՐԸ և ԴՐԱՆՑ ԿԻՐԱՌՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՒՄ	32
7. ԹՈՒՅԼ ԹԹՈՒՆԵՐԻ ԴԻՍՈՑՄԱՆ ԱՍՏԻՃԱՆԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԹԹՎԱՀԻՄՆԱՅԻՆ ՀԱՎԱՍԱՐԱԿՇՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ	39
7.1. ԴԻՆԻՏՐՈՖԵՆՈԼԻ ԴԻՍՈՑՄԱՆ ՀԱՍՏԱՏՈՒՆԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ՍղեպՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԻԿ ՄԵԹՈԴՈՎ	43
7.2. ՄԵԹԻԼԵՆ ՆԱՐՆՋԱԳՈՒՅՆԻ ԴԻՍՈՑՄԱՆ ՀԱՍՏԱՏՈՒՆԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ	47
7.3. ԴՆԹ-ԼԻԳԱՆԴ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ pH ՏԻՏՐՈՒՄԸ: pK _a -Ի ՈՐՈՇՈՒՄԸ.....	52
7.4. ՍղեպՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ pH-ՏԻՏՐՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ	58
ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ.....	62

1. ՄՊԵԿՏՐԱՍԿՈՊԻԱՅԻ ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՀԱՄԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Սպեկտրասկոպիան (spectrum – լատիներեն՝ պատկերացում, կերպար, skopeo – հունարեն՝ դիտում) ունի լայն կիրառություն: Վերլուծական նպատակներով այն կիրառվում է քիմիական միացությունների նույնականացման, ինչպես նաև լուծույթներում և խառնուրդներում նյութերի կոնցենտրացիաները որոշելու համար: Օպտիկական սպեկտրասկոպիայի կիրառությունը թույլ է տալիս ուսումնասիրելու մոլեկուլների կառուցվածքը և էներգետիկ հատկությունները, տարբեր, այդ թվում, թթվահիմնային պրոցեսների հավասարակշռությունը, քիմիական ռեակցիաների կինետիկան և այլն: Սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունների օբյեկտ կարող են հանդիսանալ կամայական ագրեգատային վիճակներում գտնվող միացությունները:

Սպեկտրասկոպիայի հիմնադիրներից է Իսահակ Նյուտոնը: Ուսումնասիրելով լույսի ճառագայթի անցումը թափանցիկ պրիզմայի միջով՝ նա հայտնաբերեց, որ սպիտակ թվացող լույսը կարելի է տրոհել կարմիր, նարնջագույն, դեղին, կանաչ, երկնագույն, կապույտ, մանուշակագույն բաղադրիչների և, ըստ էության, նա բացահայտեց լույսի դիսպերսիան (1672թ.): Հետագայում հաստատվեց նաև այն, որ տեսանելի լույսի տիրույթից դուրս գոյություն ունի ճառագայթում, որն անտեսանելի է մարդու աչքի համար: 1800թ. Ուիլյամ Հերշելը, սովորական ջերմաչափերի միջոցով ուսումնասիրելով տեսանելի լույսի սպեկտրը, բացահայտեց, որ տեսանելի տիրույթի կարմիր ճառագայթման սահմանից այն կողմ ջերմաչափերը տաքանում են այնպիսի ճառագայթման շնորհիվ, որը նա անվանեց “calorific rays”: Ներկայումս ճառագայթման այդ տիրույթն անվանում են ինֆրակարմիր: 1802թ. Բոհան Ռիտտերը կրկնեց Հերշելի փորձերը՝ կիրառելով ոչ թե ջերմաչափ, այլ արծաթի քլորիդ, որը լույսի ներգործությամբ տրոհվում է: Պարզվեց, որ AgCl-ի տրոհման արագությունն աճում է սպեկտրի կարմիր եզրից դեպի մանուշակագույնը և առավելագույնն է դառնում տեսանելի լույսի սպեկտրի տիրույթից դուրս: Այսպես բացահայտվել են ուլտրամանու-

շակագույն ճառագայթները: Այս փորձերը սկիզբ դրեցին լայնածավալ սպեկտրասկոպիկ հետազոտությունների:

Ժամանակակից սպեկտրասկոպիան հիմնված է քվանտային տեսության պատկերացումների վրա, համաձայն որոնց ցանկացած ատոմային կամ մոլեկուլային համակարգ կայուն է միայն որոշակի ստացիոնար վիճակներում: Համակարգի էներգիայի ցանկացած փոփոխություններ պայմանավորված են մի վիճակից մյուսը թռիչքաձև անցմամբ: Նման անցումները կարող են լինել ինչպես ճառագայթմամբ, այնպես էլ առանց ճառագայթման: Ըստ էության այն անցումները, որոնց դեպքում նյութը կլանում կամ արձակում է էլեկտրամագնիսական ճառագայթներ, հանդիսանում են սպեկտրասկոպիայի հետազոտության օբյեկտ:

Էլեկտրամագնիսական էներգիայի քվանտի կլանումը հանգեցնում է նրան, որ համակարգը (ատոմ, մոլեկուլ, իոն, ռադիկալ և այլն) հիմնական վիճակից անցնում է գրգռված վիճակի.

$$A + h\nu \rightarrow A^*$$

Կլանված էներգիայի քվանտի մեծությունը որոշվում է որպես համակարգի վերջնական և սկզբնական վիճակների էներգիաների տարբերություն՝ ըստ Պլանկի բանաձևի.

$$h\nu = \frac{hc}{\lambda} = E_k - E_i = \Delta E \quad (1)$$

ուստի ճառագայթումը կարելի է բնութագրել ինչպես էներգիայով (կՋ/մոլ) և ինտենսիվությամբ (Վտ/մ²), այնպես էլ ալիքային պարամետրերով՝ ալիքի երկարությամբ λ (նմ), հաճախությամբ ν (Հց), ալիքային թվով ν (սմ⁻¹): Սպեկտրալ հատկություններից կախված էլեկտրամագնիսական ալիքների տիրույթների դասակարգումը բերված է աղյուսակ 1-ում: Կլանման սպեկտրասկոպիան ուսումնասիրում է քիմիական միացությունների կլանման ունակությունը: Կլանման սպեկտրները ստացվում են հետազոտվող նյութի որոշակի հաստությամբ շերտի միջով էլեկտրամագնիսական ճառագայթման բաց թողման դեպքում:

Յուրաքանչյուր նյութ բնութագրվում է խիստ անհատական կլանման սպեկտրով:

Աղյուսակ 1

Էլեկտրամագնիսական ալիքների սպեկտրալ տիրույթների դասակարգումը

Սպեկտրների տիրույթը	Սպեկտրալ բնութագրիչները	
	λ, (նմ)	ν, (սմ ⁻¹)
Վակուումային Ուլտրամանուշակագույն	10-200	5·10 ⁴ -10 ⁶
Ուլտրամանուշակագույն	200-400	2,5·10 ⁴ -5·10 ⁴
Տեսանելի	400-750	1,3·10 ⁴ -2,5·10 ⁴
Մոտակա ինֆրակարմիր	750-2,5·10 ⁴	400-1,3·10 ⁴
Հեռու ինֆրակարմիր	2,5·10 ⁴ -10 ⁶	10-400

Կլանումը սպեկտրի տեսանելի և ուլտրամանուշակագույն տիրույթներում պայմանավորված է մոլեկուլների անցմամբ էլեկտրոնային-գրգռված վիճակի, որն ուղեկցվում է նաև տատանողական և պտտական ենթավիճակների փոփոխություններով, ուստի հասարակ մոլեկուլների էլեկտրոնային սպեկտրները գազային փուլում մեծ քանակությամբ պարունակում են տատանողական-պտտական կառուցվածքի նեղ շերտեր: Գազի ճնշման մեծացման կամ խտացված վիճակի անցման դեպքում դրանց քանակն ավելանում է, իսկ գծերը վերադրվում են և առաջանում են լայն շերտեր, որոնցից յուրաքանչյուրը բնութագրվում է առավելագույն կլանմանը համապատասխանող ալիքի երկարության՝ $\lambda_{\max}$ -ի որոշակի արժեքով:

Ավանդաբար օրգանական մոլեկուլների էլեկտրոնային կառուցվածքի ուսումնասիրության ժամանակ տարբերակվում են մոլեկուլային ուղեծրերի հետևյալ տիպերը՝ σ և σ^* , π և π^* , ինչպես նաև n (չկապող): Առաջինները գոյություն ունեն ցանկացած օրգանական մոլեկուլում, երկրորդները՝ հիմնականում բազմակի կապերով համակարգերում,

իսկ երրորդները՝ էլեկտրոնների չընդհանրացված զույգեր պարունակող հետերոատոմներ ունեցող մոլեկուլներում (O, N, S, Cl, Br և այլն): Օպտիկական գրգռման դեպքում հնարավոր են հետևյալ տիպի անցումներ՝ $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$: $\sigma \rightarrow \sigma^*$ և $n \rightarrow \sigma^*$ անցումները հիմնականում ընկած են վակուումային ուլտրամանուշակագույն տիրույթում և բնորոշ են սաահմանային ածխաջրերին և դրանց հալոգենային ածանցյալներին, ինչպես նաև կարբոնիլային միացություններին: Օրինակ, էթանի դեպքում $\lambda_{\max}=135$ նմ, ացետոնի դեպքում՝ $\lambda_{\max}=190$ նմ: $\sigma \rightarrow \sigma^*$ անցումների դեպքում կլանման սպեկտրները հիմնականում ունեն բարձր ինտենսիվություն, մինչդեռ $n \rightarrow \sigma^*$ անցումների դեպքում ինտենսիվությունը համեմատաբար փոքր է:

Չհագեցած միացությունների մոլեկուլներում տեղի են ունենում $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ անցումներ, որոնք ընկած են մոտակա ուլտրամանուշակագույն և տեսանելի տիրույթներում: Ավելի երկարալիք տիրույթի կլանման սպեկտրներ ունեն այն մոլեկուլները, որոնցում առկա են զուգորդված կապերի երկարաձգված համակարգեր կամ արոմատիկ օղակներ: Մոլեկուլում միմյանց հետ փոխազդող բազմաթիվ π -էլեկտրոնների առկայությունը մեծացնում է մոլեկուլի էլեկտրոնային ամպի հնարավոր կոնֆիգուրացիաների թիվը, ինչն իր հերթին նվազեցնում է նրա հիմնական վիճակի էներգիան և գրգռված վիճակի անցման համար անհրաժեշտ քվանտի էներգիայի մեծությունը: Օրինակ, արոմատիկ մոլեկուլների շարքում՝ բենզոլ, նավթալին, անտրացեն, կլանման շերտի մաքսիմումը շեղվում է դեպի երկարալիք տիրույթ ($\lambda_{\max}=268, 311, 476$ նմ համապատասխանաբար): Հիմնականում $\pi \rightarrow \pi^*$ թույլատրված անցումների համար պատասխանատու շերտերն ունեն կլանման մեծ ինտենսիվություն, մինչդեռ $n \rightarrow \sigma^*$ անցումների ինտենսիվությունը մեծ չէ:

Լիցքի տեղափոխման հետ կապված անցումները դասվում են առանձին խմբի: Եթե օպտիկական գրգռումն ուղեկցվում է էլեկտրոնային խտության վերաբաշխումով երկու քիչ թե շատ տարանջատված էլեկտրոնային համակարգերի միջև տվյալ մոլեկուլում, ապա այսպիսի անցումը կոչվում է լիցքի ներմոլեկուլային տեղափոխություն: Լիցքի

ներմուլեկուլային տեղափոխությամբ պայմանավորված կլանման երկարալիք շերտ ունեցող մոլեկուլի տիպիկ օրինակ է նիտրոբենզոլը (որտեղ էլեկտրոնների դոնոր է ֆենիլային օղակը, իսկ ակցեպտոր է նիտրո խումբը): Եթե լիցքի տեղափոխությունն իրականանում է երկու տարբեր մոլեկուլների միջև, ապա այս դեպքում տեղի ունի լիցքի միջմուլեկուլային տեղափոխություն: Այս դեպքում ի հայտ է գալիս կլանման շերտ, որը բացակայում է այդ միացությունների սեփական կլանման սպեկտրներում: Շատ դեպքերում այդ պրոցեսին կարող է մասնակցել նաև լուծիչի մոլեկուլը: Տիպիկ օրինակ է I՝ մասնիկը, որի ջրային լուծույթում դիտվող կլանման շերտը $\nu=44200\text{սմ}^{-1}$ դեպքում պայմանավորված է էլեկտրոնի տեղափոխությամբ ջրի մոլեկուլի վրա:

Ատոմների խմբերը, որոնք ցուցաբերում են կլանում, կոչվում են քրոմոֆոր (գույնի կրիչներ): Սովորաբար դրանք բևեռային կամ չհագեցած կապերով խմբեր են: Օրինակ՝ $\text{-C}\equiv\text{C-}$; >C=O ; $\text{-C}_6\text{H}_5$; -N=N- ; NO_2 , որոնց համապատասխանող λ_{max} -ներն են՝ 180; 280; 270; 370; 270 նմ:

Եթե երկու քրոմոֆորներ իրարից բաժանված են բավականին երկար ածխաջրածնային շղթայով, ապա դրանց կլանումը գործնականում կլինի գումարվելի (ադիտիվ), մինչդեռ մոտ տեղաբաշխման դեպքում դրանք կարող են գուգորդման միջոցով ազդել մեկը մյուսի վրա՝ էականորեն փոխելով մոլեկուլի սպեկտրը: Որոշ տեղակալիչներ, չլինելով քրոմոֆորներ, կարող են մեծացնել միացության կլանումը: Այսպիսի խմբերը կոչվում են աուքսոքրոմային (գունաուժեղացուցիչներ): Դրանց թվին են պատկանում, օրինակ, ամինո-, հիդրօքսի- և մեթօքսի- խմբերը:

Արտաքին աղբյուրից ընկնող լույսի կլանման ունակությունը միացության կողմից բնութագրվում է օպտիկական խտությամբ: Սովորաբար օպտիկական խտությունը նշանակվում է A-ով (ռուսալեզու գրականության մեջ՝ D-ով):

Ըստ սահմանման, օպտիկական խտությունը միացության անթափանցելիության չափն է, որը հավասար է միացության շերտի վրա ընկնող լույսի ինտենսիվության I_0 -ի և միացության միջով անցնող և կլանման ու ցրման արդյունքում դուրս եկող լույսի ինտենսիվության՝ I-ի հարաբերության տասնորդական լոգարիթմին:

$$A = \lg \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (2)$$

A-ի կախվածությունը λ -ից կամ ν -ից կոչվում է տվյալ միացության կլանման սպեկտր: Միացության միջով անցնելու արդյունքում լույսի սպեկտրային կազմը փոխվում է, ինչը սովորաբար ընկալում է որպես նմուշի գույն (աղ. 2):

Աղյուսակ 2

Գլանվող լույսի և միացության գույնի համապատասխանությունը

Գլանվող լույսի միջակայքը, նմ	Գլանվող լույսը	Անցնող լույսի գույնը
400-440	Մանուշակագույն	Դեղնա-կանաչ
440-480	Կապույտ	Դեղին
480-490	Կանաչա-երկնագույն	Նարնջագույն
490-500	Երկնագույնա-կանաչ	Կարմիր
500-560	Կանաչ	Ծիրանագույն
560-580	Դեղին-կանաչ	Մանուշակագույն
580-595	Դեղին	Կապույտ
595-610	Նարնջագույն	Կանաչ-երկնագույն
610-680	Կարմիր	Երկնագույն-կանաչ
680-750	Ծիրանագույն	Կանաչ

2. ՍՊԵԿՏՐԱՍԿՈՊԻԱՅԻ ԳԼԽԱՎՈՐ ՕՐԵՆՔԸ

Սպեկտրասկոպիայում բոլոր քանակական չափումների հիմքում ընկած է Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը (հապավումը՝ ԲԼԲ օրենք), որը կապ է հաստատում միացության կողմից լույս կլանելու ունակության և տվյալ միացության կոնցենտրացիայի միջև:

Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը կարելի է դուրս բերել՝ ելնելով հետևյալ պատկերացումներից. Դիտարկենք λ ալիքի երկարությամբ մոնոքրոմատիկ լույսի անցումը հետազոտվող միացությամբ կյուվետի միջով: Եթե այն կլանում է տվյալ ալիքի երկարությամբ լույսը, ապա կյուվետից դուրս եկող լուսային հոսքի ինտենսիվությունը՝ I_λ , ավելի փոքր կլինի կյուվետի վրա ընկնող լույսի I_0 ինտենսիվությունից: Լույսի կլանումը dI_λ տվյալ միացության dx հաստությամբ անվերջ բարակ շերտում համեմատական է այդ շերտի վրա ընկնող լուսային հոսքին՝ I_λ -ին և լույսը կլանող մասնիկների C մոլային կոնցենտրացիային: Իրոք, լույսի յուրաքանչյուր քվանտ, անցնելով լուծույթի dx շերտի միջով, իր ճանապարհին հանդիպում է կլանող մասնիկների որոշակի քանակության, որը կարելի է հաշվարկել որպես ($N_A \cdot \sigma \cdot C \cdot dx$), որտեղ N_A -ն Ավոգադրոյի թիվն է, σ -ն՝ այն շերտի արդյունավետ կտրվածքն է, որում քվանտը բախվում է միացության մասնիկի հետ: Այդ շերտում քվանտների հոսքի լրիվ թուլացումը ($-dI_\lambda$) կորոշվի հոսքի I_λ ելքային ինտենսիվությամբ՝ բազմապատկած մեկ քվանտի կլանման հավանականության ($N_A \cdot \sigma \cdot C \cdot dx$) հետ: ε' -ով նշանակելով $N_A \cdot \sigma$ համեմատականության գործակիցը՝ կստանանք dx շերտի կողմից լույսի կլանումը որոշող արտահայտությունը.

$$dI_\lambda = -\varepsilon' \cdot I_\lambda \cdot C \cdot dx: \quad (3)$$

Երբ դիտարկվող շերտի հաստությունը փոխվում է 0-ից մինչև 1, որտեղ 1-ը միացության հաստությունն է կյուվետում, լույսի ինտենսիվությունը կնվազի I_0 -ից մինչև I : Այդ սահմաններում ինտեգրումը՝

$$-\int_{I_0}^I \frac{dI_\lambda}{I_\lambda} = \varepsilon' \cdot C \int_0^l dx \quad (4)$$

կրերի միացության կողմից լույսի թուլացումը նկարագրող կախվածությանը.

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon' \cdot C \cdot l}; \quad (5)$$

Միացության կողմից լույսի թուլացումը նկարագրող կախվածությունը կարելի է ներկայացնել լոգարիթմական տեսքով.

$$\lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l = A_\lambda, \quad (6)$$

որտեղ I_0 -ն և I -ն նմուշի վրա ընկնող և նմուշով անցնող լույսի ինտենսիվություններն են, C -ն՝ մոլային կոնցենտրացիան, l -ը՝ օպտիկական ճանապարհի երկարությունը, ε_λ -ն՝ համեմատականության գործակիցը, որը կոչվում է կլանման մոլային գործակից կամ միացության էքստինկցիայի գործակից: Այսպիսով, օպտիկական խտությունը գծայնորեն կապված է կոնցենտրացիայի հետ հետևյալ առնչությամբ.

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l \quad (7)$$

Սպեկտրասկոպիայում ընդունված է կյովետի I երկարությունը չափել սմ-երով, միացության կոնցենտրացիան՝ մոլ/լ-երով, իսկ օպտիկական խտությունը անչափելի մեծություն է, ուստի էքստինկցիայի գործակցի չափման միավորը կլինի $l \cdot \text{մոլ}^{-1} \cdot \text{սմ}^{-1}$: էքստինկցիայի գործակցի հակադարձ մեծությունը հավասար է 1.0 մոլ/լ կոնցենտրացիայով լուծույթի շերտի հաստությանը, որում լույսի ինտենսիվությունը նվազում է 10 անգամ: (3) և (5) բանաձևերը իրենցից ներկայացնում են ԲԼԲ օրենքի դիֆերենցիալ և ինտեգրալ ձևակերպումները:

Միացության կողմից լույսի կլանման պրոցեսի համար բնութագրական է գումարելիությունը. եթե նմուշում առկա են մի քանի կլանող ձևեր, ապա տվյալ ալիքի երկարության դեպքում օպտիկական խտությունը կորոշվի դրանցից յուրաքանչյուրի կլանումների գումարով.

$$A_{\lambda} = l \cdot \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot C_i \quad (8)$$

ուստի լուծույթների ուսումնասիրության ժամանակ անհրաժեշտ է հաշվի առնել, որ լուսային հոսքը կարող է կլանվել նաև լուծիչի մոլեկուլների կողմից, որոնց կոնցենտրացիան սովորաբար մի քանի կարգով գերազանցում է լուծված միացության կոնցենտրացիան: Այսպիսով, լուծույթում որևէ միացության կլանման սպեկտրը ստանալու համար անհրաժեշտ պայման է տվյալ սպեկտրալ հատվածում կիրառվող լուծիչի ատավելագույն թափանցելիությունը՝ $\varepsilon_{\lambda}^S \ll \varepsilon_{\lambda}^i$: Ինչպես երևում է աղյուսակ 3-ից, ավելի հաճախ կիրառվող լուծիչները սպեկտրի տեսանելի և մոտակա ուլտրամանուշակագույն տիրույթներում չունեն կլանում:

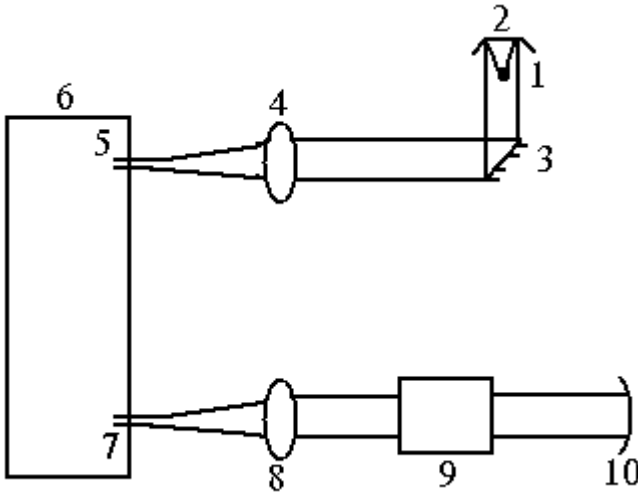
Աղյուսակ 3

Լուծիչների կողմից ՈւՄ ճառագայթման բաց թողման սահմանը

Լուծիչ	Նախք, նմ	Լուծիչ	Նախք, նմ
Ացետոն	326	Տոլուոլ	280
Ացետոնիտրիլ	210	Քացախաթթու	270
Բենզոլ	276	4-քլորային ածխածին	265
Ջուր	200	Ցիկլոհեքսան	210
ն-Հեքսան	210	Քլորոֆորմ	245
Մեթանոլ	215	Էթանոլ	210
Ծմբական թթու	210		

3. ՍՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԵՐԻ ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ՄԿՁԲՈՒՆՔԸ

Դիտարկենք միաճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրի կառուցվածքը (նկ. 1):

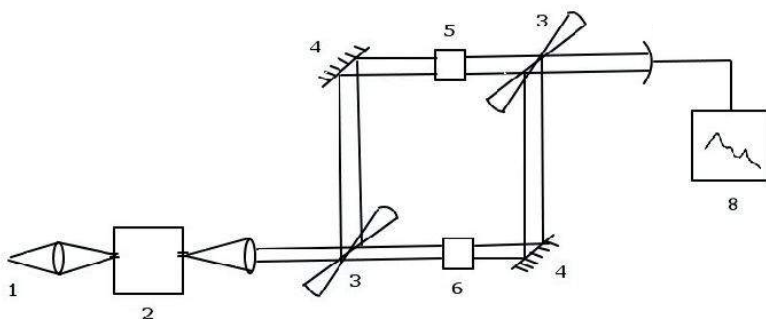


Նկ. 1. Միաճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրի կառուցվածքային գծապատկերը:

Լույսի աղբյուրը (1) տեղադրված է էլիպտիկ հայելու (2) կիզակետում: Որպես կանոն, տեսանելի լույսի աղբյուր է վոլֆրամային, հալոգենային լամպը, որը լույսի հաստատուն հոսք է տալիս 360-950նմ միջակայքում: Որպես ՈւՄ ճառագայթման աղբյուր ծառայում է ջրածնական կամ դեյտերիումային լամպը՝ անընդհատ սպեկտրով 200-360նմ տիրույթում: Լույսի փունջը հարթ ապակու (3) միջոցով շրջվում է և ուսպնյակի (4) միջոցով ընկնում է մոնոքրոմատորի (6) ելքային ճեղքի (5) վրա, որը գտնվում է ուսպնյակի կիզակետում: Մոնոքրոմատորներում որպես նրբացրող տարր օգտագործվում է պրիզմա կամ դիֆրակցիոն ցանց: Ալիքի անհրաժեշտ երկարություն կարելի է ստանալ փոփոխելով ընկնող բազմաալիք լույսի էներգիայի հոսքի անկյունը նրբացրող տարրի հարթության նկատմամբ կամ պտտելով մոնոքրոմատորի պրիզման: Ելքային ճեղքից (7) դուրս է գալիս որոշակի ալիքի երկա-

րությամբ լուսային էներգիայի մոնոքրոմատիկ հոսք: Օպտիկական համակարգը (8) այնպես է ձևավորվում լուսային հոսքը, որ հետագոտվող լուծույթի նվազագույն թույլատրելի ծավալի և կյուվետային բաժնում (9) կյուվետի բազմակի անգամ տեղադրման դեպքում հոսքի երկրաչափությունը չի փոխվում: Նմուշի միջով լույսը անցնելով՝ այնուհետև ընկնում է ֆոտոէլեմենտի (10) վրա:

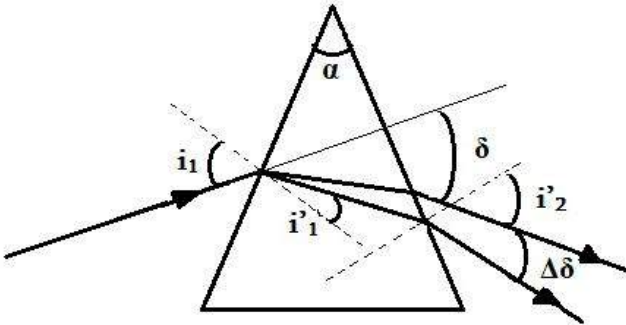
Նկար 2-ում բերված է երկճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրի գծապատկերը, որտեղ հետագոտվող և ստուգիչ նմուշների վերլուծությունները կատարվում են միաժամանակ:



Նկ. 2. Երկճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրի կառուցվածքային գծապատկերը:

Լույսն աղբյուրից (1) ընկնում է մոնոքրոմատորի (2) վրա և բաժանվում է երկու փնջերի, որոնք պատվում են սեկտորաձև հայելու (3) միջոցով: Ստացված լուսային փնջերը շրջվում են անշարժ հայելիների միջոցով (4), անցնում են ստուգիչ (5) և հետագոտվող (6) նմուշների միջով, այնուհետև մեկ այլ պատվող հայելի միավորում է դրանք մեկ փնջի մեջ և լույսն ընկնում է ֆոտոընդունիչի (7) վրա: Եթե տվյալ ալիքի երկարության տակ ստուգիչի և հետագոտվող նմուշների կլանումները նույնն են, ապա ֆոտոէլեմենտի վրա ընկնում է հաստատուն լուսային հոսք, իսկ եթե տարբեր են՝ փոփոխական: Ֆոտոէլեմենտի հոսանքը ուժեղանում է էլեկտրոնային սխեմայով և առաջացող էլեկտրական ազդակը հասնում է ինքնագրին (8), որը գրանցում է բացթողնման կամ օպտիկական խտության կախվածությունը ալիքային թվից:

Նրբացրող տարրեր: Սպեկտրային պրիզմաներ: Պրիզմաների միջոցով ճառագայթների բաժանումը մոնոքրոմատիկ բաղադրիչների ու բեկման ցուցիչից պրիզմայի միջով անցած ճառագայթի δ անկյան շեղման կախվածության արդյունք է, որը տարբեր λ ալիքի երկարություն ունեցող ճառագայթների համար ունի տարբեր արժեքներ (նկ. 3):



Նկ.3. Պրիզմայով անցնող լույսի բեկումը:

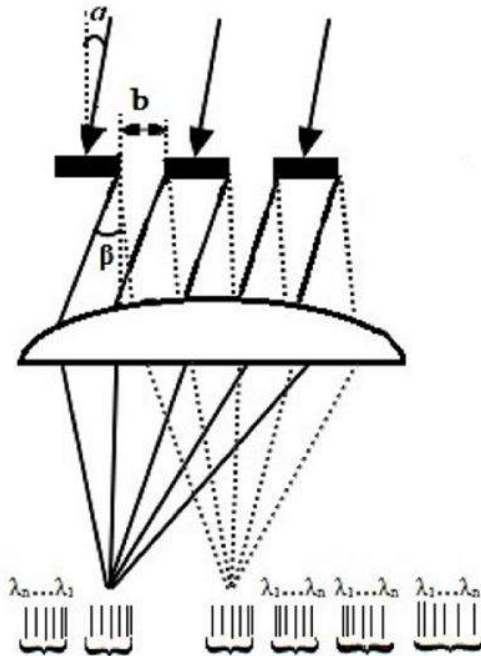
Պրիզմայի որակը բնութագրվում է $\Delta\delta/\Delta\lambda$ անկյունային նրբացրումով, ինչը կախված է պրիզմայի նյութից, այսինքն n և $\Delta n/\Delta\lambda$ մեծություններից, α բեկման անկյունից և i_1 անկման անկյունից (և, հետևաբար, պրիզմայի առաջին և երկրորդ կողմերի վրա բեկման i_1' և i_2' անկյուններից) .

$$\frac{\Delta\delta}{\Delta\lambda} = \frac{\sin \alpha}{\sin i_1' \cdot \cos i_2'} \cdot \frac{\Delta n}{\Delta\lambda}, \quad (9)$$

Կախված պահանջվող սպեկտրի տիրույթից՝ օգտագործում են տարբեր նյութերից պատրաստված պրիզմաներ. տեսանելի տիրույթի համար՝ ապակուց, ՈւՄ տիրույթի համար՝ բյուրեղային կվարցից և ֆլյուորիտից: Առավել շատ օգտագործում են հետևյալ պրիզմաները. 1) պարզ եռակողմ պրիզմա 60° բեկման անկյամբ, 2) Աբբեի պրիզմա, որում լույսի փունջը շեղվում է 90° անկյամբ, 3) Ամիչիի պրիզմա՝ բաղ-

կացած երեք կամ ավելի միմյանց սոսնձված ուղղանկյուն պրիզմաներից և այլն:

Դիֆրակցիոն ցանցն իրենից ներկայացնում է հարթ կամ գոգավոր օպտիկական հարթության վրա նստեցված, բազմաթիվ իրար զուգահեռ և իրարից հավասարաչափ հեռացած նրբագծերից կազմված պարբերական կառուցվածք: Քննարկենք, թե ինչպես է լույսն անդրադառնում այդ օպտիկական համակարգից (նկ. 4):



Նկ. 4. Ցանցի վրա լույսի դիֆրակցիայի սխեման:

Եթե մոնոքրոմատիկ լույսի զուգահեռ փունջը ընկնում է մեծ հարթ հայելու վրա α անկյան տակ, ապա անդրադարձած լույսը նույնպես զուգահեռ փունջ է: Այլ է պատկերը, երբ կիրառվում է բավականին նեղ շերտիկի տեսքով հայելի, որի լայնությունը ավիքի երկարության կարգի է, այսինքն մոտ 1000 նմ: Լույսի զուգահեռ փունջն այդ շերտիկից անդրադարձումից հետո կորցնում է իր զուգահեռությունը: Դիֆրակ-

ցիայի այս երևույթը դիտվում է նաև, երբ լույսն անցնում է նեղ ճեղքով: Եթե մակերևույթի վրա կան բազմաթիվ պարբերական հայելային նըր-բագծեր (կամ ճեղքեր), ապա տեղի է ունենում տատանումների ինտեր-ֆերենցիոն գումարում, որոնք դուրս են գալիս β դիտարկվող ուղղու-թյամբ b լայնության ունեցող յուրաքանչյուր ճեղքից (նկ. 4): Արդյուն-քում էկրանի վրա առաջանում են լուսավորվածության մաքսիմումներ, որոնք նկարագրվում են դիֆրակցիոն ցանցի հավասարմամբ .

$$d(\sin \alpha + \sin \beta) = m\lambda, \quad (10)$$

որտեղ α -ն լույսի փնջի անկման անկյունն է, β -ն ցանցի նկատմամբ տարված նորմալի և դիֆրակցիոն փնջի տարածման ուղղության միջև անկյունն է, d -ն ցանցի պարբերականությունն է, m -ը ամբողջ թիվ է և կարող է ընդունել $0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ արժեքներ և հավասար է այն ալիքների երկարությունների թվին, որոնց չափով ցանցի տվյալ ճեղքի որոշակի տարրից դուրս եկող ալիքը հետ է ընկնում հարևան ճեղքի նույնատիպ տարրից դուրս եկող ալիքներից:

Նկարից երևում է, որ անկման հաստատուն α անկյան դեպքում գլխավոր մաքսիմումների դիրքը կախված է ալիքի երկարությունից: Այդ պատճառով ցանցով բազմաալիք փնջի անցումից հետո յուրաքանչ-յուր մաքսիմումում դիտվում է լույսի սպեկտրալ բաժանում (նկ..4): Մաքսիմումները համարակալում են m թվին համապատասխան, իսկ m -ը անվանում են սպեկտրի կարգ: $\alpha = \beta$ դեպքում կոհիտվի զրոյական դի-ֆրակցիոն մաքսիմում, որը չի պարունակում լույսի սպեկտրալ բա-ժանում: Նրա երկու կողմից տարածվում են առաջին $m = \pm 1$, երկրորդ $m = \pm 2$ և ավելի բարձր կարգի սպեկտրներ: Սպեկտրի տեսանելի և ՈւՄ տիրույթների համար հատուկ են այնպիսի դիֆրակցիոն ցանցեր, որոնք 1մմ վրա պարունակում են 300-ից 1200 նրբաշերտեր:

4. ՄՊԵԿՏՐԱՄԿՈՊԻԿ ՉԱՓՈՒՄՆԵՐԻ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

ԲԼԲ օրենքը կանխատեսում է նյութի օպտիկական խտության գծային կախվածությունը նրա մոլային կոնցենտրացիայից, ε -ը ուղիղ համեմատական է նյութի կոնցենտրացիային, որը հաստատուն է և կախված չէ փորձի իրականացման պայմաններից: Մակայն գործնականում հանդիպում են գծային կախվածությունից շեղման դեպքեր:

Դիտարկենք, թե որ գործոնները կարող են ազդել ε -ի մեծության վրա: Այն կարող է կախված լինել ընկնող լույսի λ_0 ինտենսիվությունից: λ_0 -ի բարձր արժեքների դեպքում էլեկտրոններով հիմնական վիճակի հազեցվածությունը կարող է կտրուկ նվազել, ինչը բերում է ε -ի նվազմանը ընդիույ մինչև 0-ական արժեքը: Նման երևույթները հետազոտվում են ոչ գծային սպեկտրասկոպիայում: Մակայն հիմնականում օպտիկական սպեկտրասկոպիայում նման հզոր ճառագայթման աղբյուրներ չեն օգտագործվում և ընդունվում է, որ ε -ը կախված չէ ընկնող լույսի ինտենսիվությունից:

ε -ի թվային արժեքի վրա կարող են ազդել արտաքին պայմանները՝ ջերմաստիճանը, ճնշումը (գազերի համար), լուծիչը: Այսպես, ջերմաստիճանի բարձրացմանը զուգընթաց կարող է դիտվել կլանման շերտի լայնացում, որը պայմանավորված է հիմնական վիճակում էլեկտրոններով տատանողական մակարդակների հազեցվածության փոփոխությամբ: Լուծիչի բևեռայնության փոփոխությունը (մասնավորապես, բևեռային լուծիչի փոխարինումը ոչ բևեռային լուծիչով) կարող է ազդել հետազոտվող կլանման շերտի $\lambda_{\text{մաքս}}$ -ի դիրքի վրա: Օրինակ, մասնիկի կլանման շերտը ջրից ացետոն տեղափոխելիս շեղվում է 4800 սմ⁻¹-ով: Նման տեղաշարժերը բացատրվում են ներմոլեկուլային փոխազդեցությունների առաջացմամբ, որոնք բերում են արտաքին սովորական թաղանթի կառուցվածքի փոփոխության:

ԲԼԲ օրենքից շեղումը կարող է նաև պայմանավորված լինել քիմիական պատճառներով, որը լուծիչում տարբեր կլանող մասնիկների միջև բարդ փոխազդեցությունների արդյունք է: Այդ դեպքում նյութերի

կոնցենտրացիայի փոփոխությունը կարող է հանգեցնել հավասարակշռության դիրքի տեղաշարժմանը, ինչն իր ազդեցությունն է ունենում կլանման սպեկտրի վրա: Այս դեպքում նույնիսկ նոսր լուծույթներում չի պահպանվում ε -ի հաստատունությունը:

Մյուս գործոնը այն է, որ լույսի փոխազդեցությունը նյութի հետ չի սահմանափակվում միայն կլանմամբ: Դիտարկենք, փորձում լույսի ինտենսիվության ողջ հաշվեկշիռը: Ենթանդրենք I_0 ինտենսիվությամբ լույսի փունջն ընկնում է հետագոտվող նմուշով կյուվետի վրա: Լույսի մի մասն անդրադառնում է օդ-միջավայր բաժանման մակերևույթի վրա և կյուվետի պատերից՝ $I_{\text{անդր}}$: Մի մասը ցրվում է միջավայրի մասնիկների վրա բոլոր ուղղություններով, որի դեպքում փոխվում է լույսի սպեկտրալ կազմը՝ $I_{\text{ցրում}}$, մի մասն անցնում է և ընկնում ընդունիչի վրա՝ I_x , ինչպես նաև տեղի է ունենում որոշ մասի կլանում՝ $I_{\text{կլ.}}$, որի մի մասը կարող է հետագայում լուսարձակվել բոլոր ուղղություններով՝ $I_{\text{լյում}}$, իսկ մի մասն էլ վերածվել ջերմության՝ տաքացնելով լուծույթը: Այսպիսով, ինտենսիվության գումարային տեսքը հետևյալն է. .

$$I_0 = I_x + I_{\text{կլ.}} + I_{\text{անդր.}} + I_{\text{ցրում}}:$$

ԲԼԲ օրենքը, բնականաբար, վերաբերում է միայն $I_{\text{կլ.}}$ և I_x -ին: Հետևաբար, մյուս գումարելիները պետք է լինեն կամ անհամեմատ փոքր, կամ ինչ որ կերպ հաշվի առնվեն: $I_{\text{ցրում}}$ և $I_{\text{անդր.}}$ հետ կապված անճշտությունների մեծ մասը կարելի է վերացնել՝ կիրառելով կլանման տարբերակման մեթոդը: Այս դեպքում չափում են ոչ թե նյութով կյուվետի վրա ընկնող լույսի ինտենսիվությունը՝ I_0 -ն, այլ լույսի փնջի այն ինտենսիվությունը, որն անցնում է մաքուր լուծիչ պարունակող համեմատական կյուվետի միջով՝ $I_{\text{համ}}$: $I_{\text{ցրում}}$ ազդեցությունը փոքրացնելու համար խորհուրդ չի տրվում օգտագործել 1սմ-ից մեծ օպտիկական ուղի ունեցող կյուվետներ: Հնարավոր է նաև $I_{\text{լյում}}$ պայմանավորված չափումների որոշակի սխալներ, սակայն մեծ մասամբ այդ ճառագայթումը ցրվում է բոլոր ուղղություններով, և նրա միայն աննշան մասը կարող է ընկնել ընդունիչի վրա:

Երկրորդ, նման շեղումները կարող են պայմանավորված լինել օգտագործվող սարքի ոչ լիարժեք կառուցվածքով: Դրանց թվին են

պատկանում գրանցող սարքի վրա ընկնող լույսի ինտենսիվության և գրանցված էլեկտրական ազդակի միջև ուղիղ համեմատականության բացակայությունը, լույսի փնջի ոչ լրիվ զուգահեռությունը և ոչ լրիվ մոնոքրոմատիկությունը, սպեկտրի գրանցման բարձր արագությունների դեպքում ինքնագրի որոշակի իներցիայի առկայությունը և այլն:

Հաշվի առնելով վերը նշվածը, սպեկտրասկոպիայում ընդունված է յուրաքանչյուր հետազոտվող նմուշի համար փորձնականորեն ստուգել Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը: Այդ նպատակով ֆիքսված ալիքի երկարության տակ իրականացնում են տարբեր կոնցենտրացիաներով մի շարք լուծույթների օպտիկական խտության չափումներ: Ստացված տվյալներով կառուցվում է C-ից A-ի կախվածության տրամաչափական կորը (օպտիկական շերտի հաստատուն հաստության դեպքում), որից դատում են ուղիղ համեմատականության առկայության մասին: Իդեալական դեպքում կորի կետերը պետք է լինեն կոորդինատների սկզբնակետով անցնող ուղղի վրա: Այդ ուղղի թեքության անկյան տանգենսն իրենից ներկայացնում է հետազոտվող նմուշի մարման մոլային գործակիցը:

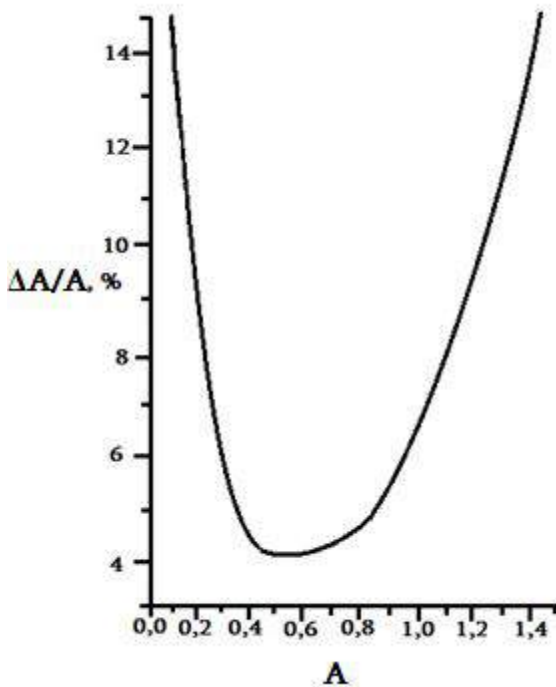
Փորձի ճշտության համար մեծ նշանակություն ունի օպտիկական խտությունների օգտագործվող միջակայքը: Ժամանակակից սպեկտրաֆոտոմետրերը չափումներն իրականացնում են օպտիկական խտության $0 < A < 4$ սահմաններում, սակայն ստացվող արժեքների ճշտությունը, այս միջակայքի տարբեր կետերում, միմյանցից խիստ տարբերվում են:

Օպտիկական խտության որոշման հարաբերական սխալը նկարագրվում է հետևյալ արտահայտությամբ

$$\Delta A / DA = (\Delta I / I_0) \cdot (\log e / A \cdot 10^{-4}) \quad (11)$$

Հարաբերական սխալի՝ $\Delta A/A$ -ի կախվածությունը A-ից հաշվարկված է այն պայմանի համար, որ օպտիկական խտության հետազոտության ողջ միջակայքում ΔI և I_0 -ն հաստատուն մեծություններ են (նկ. 5): Ինչպես երևում է կորից, օպտիկական խտության հաշվարկման

Ժամանակ նվազագույն սխալ դիտվում է $A = \lg e = 0.4343$ դեպքում, իսկ այդ արժեքից շեղման դեպքում այն խիստ մեծանում է, ուստի ընտրվում են այնպիսի պայմաններ, որ լուծույթի օպտիկական խտության արժեքը լինի $0.1 < A < 1.4$ սահմաններում:



Նկ. 5. Օպտիկական խտության որոշման հարաբերական սխալը:

Այնուամենայնիվ, եթե օպտիկական խտության փորձնականորեն չափված արժեքները դուրս են գտնվում այդ միջակայքից, ապա կարելի է կամ լրացուցիչ նոսրացնել լուծույթը, կամ օգտագործել օպտիկական ուղու այլ երկարություն ունեցող կյուվետներ:

5. Բազմաբաղադրիչ համակարգերի սպեկտրների վերլուծությունը

Բազմաբաղադրիչ խառնուրդների կլանման սպեկտրների վերլուծությունը բավականին դժվար է: Որպես պարզագույն դեպք դիտարկենք իրավիճակ, երբ լուծույթում կան երկու տիպի մասնիկներ՝ A և B : Այդ դեպքում վրադրվում է նաև մի պայման, որ այդ մասնիկները լույսը կլանում են սպեկտրի հետագոտվող միջակայքում և կարող են փոխակերպվել մեկը մյուսին դարձելի կամ անդարձելի քիմիական ռեակցիաների արդյունքում (օրինակ՝ իզոմերիզացիա, կոմպլեքսագոյացում): Բացի այդ, դրանց կոնցենտրացիաները կապված են իրար հետ հետևյալ առնչությամբ.

$$C_A + C_B = C_0 = \text{const}$$

Հետևաբար, կլանման սպեկտրից կարելի է որոշել C_A և C_B արժեքները: Վերլուծության իրականացման համար անհրաժեշտ է, որ ալիքի երկարության որոշակի միջակայքում այդ մասնիկների սպեկտրները էականորեն տարբերվեն միմյանցից: Ենթադրենք, որ ընտրված միջակայքում այդ մասնիկների սպեկտրները չեն վերածածկում միմյանց: Այդ դեպքում հետագոտվող ալիքի երկարությունը պետք է այնպես ընտրել, որ նյութերից մեկը դրա տակ կլանում չունենա, իսկ մյուսն ունենա առավելագույն կլանում: C_0 -ի և ընտրված ալիքի երկարության տակ օպտիկական խտության՝ A_λ -ի հայտնի արժեքների պայմաններում հեշտությամբ որոշվում է յուրաքանչյուր մասնիկի կոնցենտրացիան: Դիտարկենք ավելի բարդ դեպք, երբ երկու մասնիկների սպեկտրներն ամբողջությամբ վերածածկում են իրար: Այս դեպքում, որպես հետագոտվող ալիքի երկարություն, պետք է ընտրել այնպիսի տիրույթ, որտեղ ε_A -ն և ε_B -ն տարբերվեն իրարից առավելագույն չափով: Տվյալ ալիքի երկարության տակ երկբաղադրիչ համակարգի օպտիկական խտության արտահայտությունը հետևյալն է.

$$A_{\lambda} = l \cdot (\varepsilon_A C_A + \varepsilon_B C_B) \quad (12)$$

Քանի որ մասնիկների գումարային կոնցենտրացիան հաստատուն է, ապա այդ արտահայտությունը կարելի է ներկայացնել հետևյալ տեսքով.

$$A_{\lambda} = l \cdot (\varepsilon_B C_0 + (\varepsilon_A - \varepsilon_B) \cdot C_A) \quad (13)$$

Ինչպես ակնհայտ է (13)-ից, եթե որոշակի λ^* ալիքի երկարության տակ երկու մասնիկների մարման մոլային գործակիցների արժեքները հավասար են իրար ($\varepsilon_A = \varepsilon_B$), ապա այդ ալիքի երկարության տակ A_{λ^*} օպտիկական խտությունը որոշվում է միայն մասնիկների C_0 սկզբնական կոնցենտրացիայով և կախված չէ հավասարակշռական ձևերի հարաբերությունից: Հետևաբար, ցանկացած բաղադրությամբ լուծույթների սպեկտրալ կորերը կհատվեն մեկ կետում (նկ. 6), որը կոչվում է իզոբեստիկ կետ: Կլանման սպեկտրների վրա մեկ կամ մի քանի իզոբեստիկ կետերի առկայությունը վկայում է լուծույթում հավասարակշռության մասին:

Խառնուրդի վերլուծության ճշտությունը կախված է նաև հետազոտվող ալիքի երկարության ճիշտ ընտրությունից և մեծ է այնքանով, որքանով մեծ է ածանցյալի արժեքը.

$$\frac{dA_{\lambda}}{dC_A} = l \cdot (\varepsilon_A - \varepsilon_B) \quad (14)$$

Կյուվետի տրված l երկարության դեպքում զգայունությունը մեծանում է ($\varepsilon_A - \varepsilon_B$) տարբերության մեծացմանը զուգահեռ՝ հասնելով առավելագույն արժեքի այն կետերում, որտեղ այդ տարբերությունն ընդունում է ամենամեծ արժեքը: Այդպիսի կետերը անվանում են բնութագրական:

6. ԴԻՖԵՐԵՆՑԻԱԼ ՄԵԹՈԴԸ ԿԼԱՆՄԱՆ ՍՊԵԿՏՐԱՍԿՈՊԻԱՅՈՒՄ

Դիֆերենցիալ մեթոդներում չափում են ոչ թե նմուշի բացարձակ կլանումը, այլ հետազոտվող և ստուգիչ նմուշների կլանումների տարբերությունը, ընդ որում, որպես կանոն, հետազոտվող նմուշի կլանումը պետք է մոտ լինի ստուգիչի կլանմանը: Հիմնականում կենսաբանական հետազոտություններում գրանցում են երկու նմանատիպ նմուշների կլանումների տարբերությունը, որն առաջանում է արտաքին գործոնների ազդեցությամբ (լույս, քիմիական ռեագենտ, ջերմաստիճան և այլն): Դիֆերենցիալ մեթոդների գործնական օգտագործումը սպեկտրաֆոտոմետրերում բարձրացնում է վերլուծության զգայունությունն ու հստակությունը առնվազն 5-6 անգամ: Այժմ գրականության մեջ նկարագրվում են ավելի քան երկու տասնյակ դիֆերենցիալ սպեկտրաֆոտոմետրեր, որոնք ունեն օպտիկական խտության մոտավորապես 10^{-4} միավոր զգայունություն, և նրանց միջոցով լուծվում են կենսաբանական օբյեկտների հետազոտության մի շարք խնդիրներ:

6.1. Դիֆերենցիալ կլանման սպեկտրասկոպիայի մեթոդի հիմունքները

Առաջին անգամ այն մեթոդը, որի միջոցով որոշվում է հետազոտվող նյութի կլանման տարբերությունը ստուգիչի համեմատ նկարագրել են Կոբայտյումը և Միլիկենը 1937թ-ին: Կոբայտյումը այդ մեթոդով որոշել է լուծույթի կոնցենտրացիան՝ համեմատելով այն հայտնի կոնցենտրացիայով լուծույթի հետ, իսկ Միլիկենը հետազոտել է կենսաբանական նմուշի աէրոբ և անաէրոբ վիճակների տարբերությունը: Մեթոդի տեսական բացատրությունը, որը ստացել է «դիֆերենցիալ» անվանումը, տվել են Հիսկին և Բաստիանը:

Դիֆերենցիալ մեթոդով հետազոտվող նմուշի կլանումը կամ բացթողումը գրանցում են $A \neq 0$ օպտիկական խտությամբ համեմատականության լուծույթի նկատմամբ: Այս մեթոդը $A = 0$ դեպքում վերաձվում է սովորական կլանման սպեկտրասկոպիայի: Բացարձակ ճշգրտության

հաստատուն արժեքի դեպքում սովորական սարքերի միջոցով չափումների ճշտության բարձրացումը հնարավոր է ավելի մեծ կոնցենտրացիաներով լուծույթների գրանցման շնորհիվ: Հատուկ (դիֆերենցիալ) սպեկտրաֆոտոմետրերի հայտնագործումը, որոնք թույլ են տալիս մեծ ճշգրտությամբ չափել օպտիկական խտության ոչ մեծ բացարձակ մեծությունները ընդհանուր մեծ կլանման ֆոնի վրա պայմանավորել են կլանման վերլուծության ճշտության հետագա բարձրացումը:

Դիտարկելով մեթոդի տեսական հիմքը՝ Հիսկին օգտվել է կալորի-մետրիայի հիմնական օրենքից: Եթե լուծույթով կյուվետի վրա ընկնում է I_0 ինտենսիվությամբ լույս, իսկ դուրս է գալիս I ինտենսիվությամբ լույս, ապա համաձայն Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքի՝ լուծույթի օպտիկական խտությունը.

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = -\lg T = \varepsilon_\lambda l c \quad (15)$$

որտեղ T -ն նմուշի բացթողումն է, ε_λ -ն կլանման ցուցանիշ է, որը բնութագրում է տվյալ նյութի մոլեկուլի ունակությունը կլանելու λ ալիքի երկարության լույս, l -ը օպտիկական ուղու երկարությունն է, C -ն լուծույթի կոնցենտրացիան:

Դիֆերենցելով (15) արտահայտությունը՝ ստանում ենք անհայտ լուծույթի $\Delta A/A$ օպտիկական խտության կամ $\Delta c/c$ կոնցենտրացիայի որոշման հարաբերական սխալի բանաձևը.

$$\frac{\Delta A}{A} = \frac{\Delta c}{c} = \frac{0.434 \Delta(I/I_0)}{I/I_0 \cdot \lg(I/I_0)} = \frac{0.434 \cdot \Delta T}{A \cdot 10^{-A}} \quad (16)$$

Այս բանաձևից երևում է, որ հարաբերական սխալի մեծությունը էականորեն կախված է հետազոտվող նմուշի խտությունից: $\Delta(I/I_0)$ մեծությունը հաստատուն է տվյալ սարքի համար: Նկ.5-ում բերված է $\Delta A/A$ սխալի կախվածության կորը որպես ֆունկցիա A -ից՝ 1% ճշտությամբ սպեկտրաֆոտոմետրի $\Delta(I/I_0)$ բացթողման դեպքում: Կորից

երևում է, որ բացարձակ մեթոդով չափման համար օպտիմալ մարզ է համարվում 20-65% բացթողման միջակայքը (օպտիկական խտությունը 0,2-0,7): (16) արտահայտության դիֆերենցումը և ստացված հավասարման հավասարեցումը զրոյի տալիս է բացթողման արժեքը՝ 36,8% (օպտիկական խտությունը 0.434), որը համապատասխանում է նվազագույն հարաբերական սխալին:

Դիտարկենք նույն ինտենսիվությամբ լույսի անցումը երեք կյուվետներով, որոնք պարունակում են համապատասխանաբար c_0 կոնցենտրացիայով մաքուր լուծիչ և $c_0 \pm \Delta c$ կոնցենտրացիաներով լուծույթներ:

Եթե գործում է Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը, ապա c_0 և լուծիչի նկատմամբ չափված $C_0 \pm \Delta C$ կոնցենտրացիաների համար ստանում ենք երկու հավասարում: Քննարկենք $C = C_0 + \Delta C$ դեպքը.

$$I_1 = I_0 \cdot 10^{-l \epsilon c_0} \quad (17)$$

$$I_2 = I_0 \cdot 10^{-el(c_0 + \Delta c)} :$$

Այս երկու լուծույթներով անցած լույսի ինտենսիվությունների հարաբերությունը հավասար է.

$$I_{\text{հար}} = \frac{I_2}{I_1} = \frac{I_0 \cdot 10^{-el(c_0 + \Delta c)}}{I_0 \cdot 10^{-elc_0}} = 10^{-el\Delta c} : \quad (18)$$

Երկրորդ լուծույթի օպտիկական խտությունը, որը չափվում է առաջինի նկատմամբ, հավասար է այդ լուծույթների բացարձակ մեծությունների տարբերությանը, այսինքն.

$$A_{\text{հար}} = A_2 - A_1 = el\Delta c : \quad (19)$$

Նշանակելով հետազոտվող լուծույթում վերլուծվող նյութի կոնցենտրացիան c_x , իսկ նույն լուծույթի հայտնի կոնցենտրացիան համե-

մատականության լուծույթում՝ c_0 , (19) հավասարումը կարելի է գրել հետևյալ տեսքով.

$$A_{\text{հաք}} = A_x - A_0 = el(c_x - c_0), \quad (20)$$

որտեղ A_x -ը C_x կոնցենտրացիայով հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունն է, իսկ A_0 -ն՝ C_0 կոնցենտրացիայով համեմատականության լուծույթի օպտիկական խտությունը:

$A_{\text{հաք}}$ մեծության նշանը կարող է լինել դրական կամ բացասական: Վերջին դեպքում դա նշանակում է, որ հետազոտվող լուծույթի օպտիկական խտությունը փոքր է համեմատականության լուծույթի օպտիկական խտությունից: Դիֆերենցիալ սպեկտրաֆոտոմետրերի դեպքում, որոնք ունեն օպտիկական խտությունների բացասական մարզ, այս երկու դեպքերը չեն տարբերվում միմյանցից: Սակայն կլանող սարքերի նկատմամբ դիֆերենցիալ մեթոդների կիրառման դեպքում, որոնք չունեն օպտիկական խտությունների բացասական մարզ, չափումների կարգը «հակառակն» է դառնում, այսինքն հետազոտվող լուծույթը դառնում է համեմատականության լուծույթ, իսկ համեմատականության լուծույթը՝ հետազոտվող:

Եթե լուծենք (20) հավասարումը c_x -ի նկատմամբ և նշանակենք

$$\frac{1}{El} = k,$$

ապա կստանանք դիֆերենցիալ մեթոդով վերլուծության հաշվարկային բանաձևը.

$$c_x = c_0 + kA_{\text{հաք}} : \quad (21)$$

Այս բանաձևում $A_{\text{հաք}}$ -ը կարող է լինել ինչպես դրական, այնպես էլ բացասական:

Չափումների ճշտությունը որոշելու համար պետք է գտնել $\Delta c_x / c_x$ արտահայտությունը, որը լույսի կլանման օրենքի պահպանման դեպքում հավասար է $\Delta A_x / A_x$ -ին:

(20) հավասարումը գրենք հետևյալ տեսքով.

$$\lg T_{\text{հալ.}} = -A_{\text{հալ.}} = -\varepsilon l (c_x - c_0): \quad (22)$$

Դիֆերենցելով՝ կստանանք

$$dc_x = -\frac{1}{\varepsilon l} \cdot \frac{0.434}{T_{\text{հալ.}}} dT_{\text{հալ.}}: \quad (23)$$

Այս հավասարման երկու կողմերը բաժանելով c_x -ի վրա և դիֆերենցիալ ձևից անցնելով վերջնական տեսքի, հաշվի առնելով նաև $A_x = \varepsilon l c$, իսկ $T_{\text{հալ.}} = 10^{-A_{\text{հալ.}}}$ ստանում ենք.

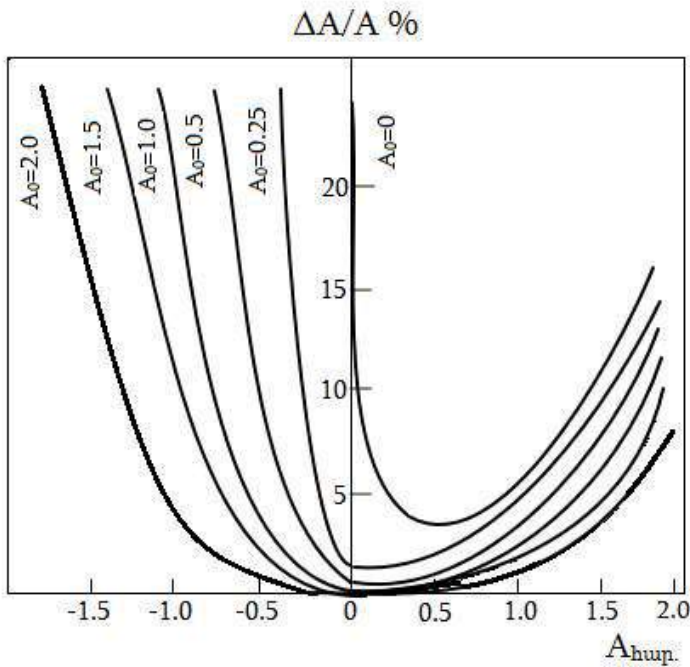
$$\frac{\Delta c_x}{c_x} = \frac{\Delta A}{A_x} = \frac{-0.434 \cdot \Delta T_{\text{հալ.}}}{A_x \cdot 10^{-A_{\text{հալ.}}}}: \quad (24)$$

$A=0$ և $A_{\text{հետ.}}=A_{\text{հալ.}}=A$ դեպքում (24) բանաձևը վերածվում է անմիջական սպեկտրասկոպիայի մեթոդով սխալների չափման բանաձևի, ինչը վկայում է այն մասին, որ այդ մեթոդը դիֆերենցիալ սպեկտրասկոպիայի մեթոդի մասնավոր դեպքն է:

(24) բանաձևի առաջին մասի ածանցյալը հավասարեցնելով զրոյի կգտնենք $A_{\text{հալ.}}$ օպտիկական խտության օպտիմալ մեծությունը, որը համապատասխանում է չափումների նվազագույն սխալին.

$$A_{\text{հալ.}} = 0.434 - A_0: \quad (25)$$

Մի քանի A_0 -ի համար չափումների սխալի $A_{\text{հալ.}}$ կախվածության կորերի շարքը, որոնք հաշվարկվել են (24) բանաձևով, բերված է նկ.6-ում:



Նկար 6. A_{hayp} -ի սխալի կախվածությունը A_0 -ի տարբեր արժեքներից՝ դիֆերենցիալ չափումների դեպքում:

Կորերից երևում է, որ հավասար պայմանների դեպքում A_{hayp} չափման սխալը նվազում է համեմատականության լուծույթի A_0 -ի մեծացմանը զուգընթաց: A_0 -ի մեծացման դեպքում A_{hayp} օպտիմալ մեծությունը նվազում է 0.434-ից ($A=0$ դեպքում) մինչև 0 ($A_0=0.434$ դեպքում) և A_0 -ի հետագա մեծացման դեպքում մնում է հավասար 0-ի: Այստեղից հետևում է, որ չափումների ճշտության բարձրացման համար հետազոտվող լուծույթի և համեմատականության լուծույթի կոնցենտրացիաները պետք է լինեն առավելագույնս մեծ և հնարավորին չափով իրար

մոտ: Սակայն (24) արտահայտությամբ հնարավոր չէ գտնել ΔT որոշման սխալի կախվածությունը T բացթողման մեծությունից: Այդ պատճառով, տվյալ բանաձևով օպտիկական խտության օպտիմալ միջակայքի ընտրությունը հարմար, սակայն կոպիտ մոտավորություն է:

Գ.Ս. Տերեշինը ցույց է տվել, որ $T_{\text{սահմ.}} = \frac{\Delta T_{\text{սարք.}}}{\Delta T_{\text{կլ.}}}$ սահմանային

ցուցանիշը հաշվի առնելով (որտեղ $\Delta T_{\text{սարք.}}$ սարքի սխալն է, իսկ $\Delta T_{\text{կլ.}}$ -ը՝ կյուվետի՝

$$\Delta T = \Delta T_{\text{սարք.}} \sqrt{1 + \left(\frac{T}{T_{\text{սահմ.}}} \right)^2} : \quad (26)$$

Այս դեպքում (24) բանաձևն ընդունում է հետևյալ տեսքը .

$$\frac{\Delta c_x}{c_x} = \frac{\Delta A}{A_x} = - \frac{0.434 \Delta T_{\text{սարք.}} \sqrt{1 + \left(\frac{T}{T_{\text{սահմ.}}} \right)^2}}{A \cdot 10^{-A_{\text{հար.}}}}, \quad (27)$$

իսկ A -ի օպտիմալ մեծությունը, որը համապատասխանում է չափման նվազագույն սխալին, որոշվում է հետևյալ հավասարմամբ.

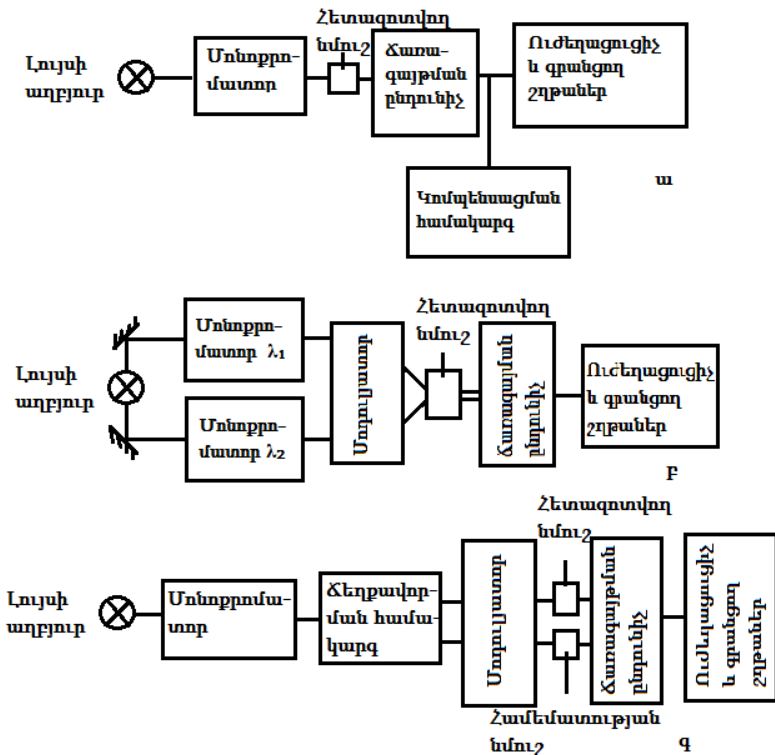
$$A_{\text{հար.}} = 0.434 \left[1 - \left(\frac{T}{T_{\text{սահմ.}}} \right)^2 \right] - A_0 : \quad (28)$$

(27) բանաձևից հետևում է, որ չափումների ճշտությունը բարձրացնելու համար անհրաժեշտ է, որ սարքի զգայունությունը լինի բարձր ($T_{\text{սարք.}}$ նվազեցնելու համար), իսկ կյուվետների կլանման մեծությունը հաստատուն՝ $\Delta T_{\text{կլ.}}$ նվազեցնելու և $\Delta T_{\text{սահմ.}}$ մեծացնելու համար:

6.2. Դիֆերենցիալ սպեկտրաֆոտոմետրերը և դրանց կիրառությունը կենսաբանական հետազոտություններում

Միաճառագայթ սարքերով դիֆերենցիալ չափման մեթոդի էությունը հետևյալն է. թույլ մոնոքրոմատիկ «չափվող» լույսն անցնում է նմուշով կյուվետի միջով և ընկնում ճառագայթման ընդունիչի վրա: Վերջինից էլեկտրական ազդակը, որն ուղիղ համեմատական է նմուշով անցած լույսի ինտենսիվությանը, փոխհատուցվում է օժանդակ աղբյուրից դուրս եկող I_0 -ին հավասար և հակառակ ուղղված էլեկտրական ազդակով: Ազդակների տարբերությունը՝ $\Delta I = I - I_0$, որն առաջանում է որոշակի գործոնների, օրինակ՝ լրացուցիչ լուսավորվածության, նմուշի բացթողման փոփոխությունների պատճառով, ուժեղանում և գրանցվում է: Կախված գրանցման համակարգերի իներտությունից՝ միաճառագայթ սարքերը կարող են օգտագործվել ինչպես շատ արագ՝ վայրկյանի մասերի ընթացքում, այնպես էլ բույանների ընթացքում իրականացվող ռեակցիաների հետազոտության համար:

Ուժեղ կլանող կամ ցրող օբյեկտների հետազոտության համար դիֆերենցիալ սպեկտրոֆոտոմետրերի զգայունությունը մեծ մասամբ կախված է լույսի ինտենսիվությունից, որն ընկնում է ճառագայթման ընդունիչի վրա: Այս տեսակետից միաճառագայթ սարքերը, որոնք առավելագույնս օգտագործում են լույսի աղբյուրի ինտենսիվությունը, մաքսիմալ զգայուն են, ինչը համապատասխանում է 10^{-5} միավոր օպտիկական խտությանը և սահմանափակվում է միայն ֆոտոհոսանքի աղմուկով: Մակայն միաճառագայթ սարքերի առանձին հանգույցների կայունության նկատմամբ բարձր պահանջները հնարավոր են միայն շատ արագ պրոցեսների գրանցման դեպքում (≤ 1 վրկ.): Դանդաղ պրոցեսների ժամանակ միաճառագայթ սարքերի զգայունությունը, զրոյական արժեքի տատանումների և արտաքին ազդակների հետևանքով, զգալի նվազում է:



Նկար. 7. Դիֆերենցիալ սպեկտաֆոտոմետրերի հիմնական տեսակների բլոկ-սխեման .
 ա) միաճառագայթ, բ) երկալիք, գ) երկճառագայթ:

Միաճառագայթ սարքերը հարմար է օգտագործել լուծույթում ֆերմենտային ռեակցիաների հետազոտության ժամանակ: Նման ռեակցիաների ընթացքում տեղի է ունենում օպտիկական խտության փոփոխություն, որի գրանցումը թույլ է տալիս ուսումնասիրել ռեակցիայի արագությունը, միջանկյալ կոմպլեքսների առաջացումը և նրանց քայքայումը: Ռեագենտների խառնումը և նրանց հոսքը դեպի չափող կյուվետ տեղի է ունենում հատուկ հարմարանքների միջոցով, որոնց մեջ խառնվելուց հետո լուծույթը հավասարաչափ հոսում է կյուվետի միջով (հավասարաչափ հոսքի մեթոդ): Հարտիջի և Ռուֆտոնի հայտնաբերած այս տարբերակը Չանսը լրացրել է հարմարանքներով, որոնք

աշխատում են արագացված հոսքի մեթոդով և թույլ են տալիս գրանցել ռեակցիայի ընթացքը խառնումից 0.3սվրկ հետո, ինչպես նաև հարմարանքներով, որոնք աշխատում են կանգնած հոսքի մեթոդով և նախատեսված են դանդաղ ռեակցիաների հետազոտության համար: Լուսնդեգարդը կիրառել է միաճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետր՝ բույսերի արմատներում և մի շարք միկրոօրգանիզմներում ցիտոքրոմների երկու կայուն վիճակների (անաերոբիոգ-աերոբիոգ) դիֆերենցիալ սպեկտրների գրանցման համար:

Միաճառագայթ սարքերը առավել լայն կիրառում գտել են բարձրակարգ բույսերի, ջրիմուռների և ֆոտոսինթեզող բակտերիաների բջիջներում ֆոտոսինթեզի առաջնային ռեակցիաների հետազոտության մեջ: Ֆոտոկենսաբանական ռեակցիաների հետազոտության համար գոյություն ունի միաճառագայթ դիֆերենցիալ սպեկտրաֆոտոմետրերի երկու տեսակ: Առաջին տեսակի սարքերը գրանցում են երկարատև ազդակները (0.1վրկ-ից մինչև մի քանի րոպե) և նախատեսված են ռեակցիայի արգասիքների գրանցման համար, որոնք երկարատև լույսի ազդեցության տակ անցնում են նմուշի վրա: Երկրորդ տեսակի սպեկտրաֆոտոմետրերը իմպուլսային սպեկտրասկոպիկ սարքեր են և թույլ են տալիս գրանցել իմպուլսային լուսավորվածության դեպքում ֆոտոսինթեզի արագ ընթացող ռեակցիայի կինետիկան: Իմպուլսային և դիֆերենցիալ սպեկտրասկոպիայի մեթոդներով ստացված տվյալների համեմատումը ավելի ընդհանուր պատկերացում է տալիս ֆոտոսինթեզի առաջնային ռեակցիաների կինետիկ առանձնահատկությունների մասին: Սակայն նույնիսկ աննշան փոփոխությունները փորձի անցկացման պայմաններում, ինչպես նաև չափումների ընթացքում օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական վիճակի փոփոխությունները կարող են բերել սխալ տվյալների ստացմանը: Այդ պատճառով կարևոր նշանակություն ունի այնպիսի սարքերի նախագծումը, որոնց մեջ միաժամանակ գրանցում են միևնույն պայմաններում գտնվող նույն օբյեկտի արագ և դանդաղ ռեակցիաները:

Միաժամանակ գոյություն ունեն մի շարք պատճառներ, որոնք սահմանափակում են միաճառագայթ սարքերի հնարավորությունները:

Վերջիններս պիտանի չեն բջջային կախություններում և միտոքոնդրիումներում լույսի կլանման շատ փոքր փոփոխությունների գրանցման համար մեծ թվով օբյեկտների դեպքում, որոնցում արտաքին ազդեցությունը առաջացնում է ոչ միայն կլանման սպեցիֆիկ փոփոխություններ, այլև լույսի ցրման ոչ սպեցիֆիկ փոփոխություններ: Բնականաբար, այս դեպքում ստացված արդյունքները ոչ լիարժեք պատկերացումներ կտան հետազոտվող նմուշի բաղադրիչների վիճակի իրական փոփոխությունների մասին: Երկարատև պրոցեսների կինետիկայի գրանցման դեպքում ևս իջնում է սարքի զգայունությունը և ճշտությունը՝ սարքի հանգույցների անկայունության և սխալների հետևանքով, ինչը պայմանավորված է հետազոտվող կախության մասնիկների նստեցմամբ և կոնվեկցիոն շարժմամբ: Կինետիկ օրինաչափությունների հետազոտությունը միայն որոշակի ալիքի երկարության տակ և արգասիքների դիֆերենցիալ սպեկտրների անընդհատ գրանցելու հնարավորության բացակայությունը, որն առաջանում է իրականացվող ռեակցիաների ընթացքում, ևս էականորեն սահմանափակում է հետազոտվող հարցերի շրջանակը: Միաճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրերի հիմնական թերությունները և սահմանափակումները շտկվել են առավել կատարելագործված երկճառագայթ սարքերում:

Գոյություն ունեն երկճառագայթ դիֆերենցիալ սպեկտրաֆոտոմետրերի երկու հիմնական տեսակ՝ երկալիք և երկճառագայթ: Երկալիք սարքերը հիմնականում հարմար են պրոցեսների կինետիկական բնութագրիչների մանրամասն հետազոտության համար այն դեպքում, երբ նմուշի վրա արտաքին ազդեցությունը բերում է ոչ միայն կլանման, այլև ցրման փոփոխությանը: Մասնավորապես, այս սարքերը օգտագործվում են ամբողջական բջիջներում և նրա ֆրագմենտներում էլեկտրոնային տեղափոխման շղթայի բաղադրիչների օքսիդա-վերականգնման վերափոխումների կինետիկ բնութագրիչների հետազոտության համար: Երկալիք սարքերում (նկ. 7, բ) լույսի աղբյուրը լուսավորում է երկու մոնոքրոմատորներ, որոնցից հետո ալիքի տարբեր երկարություններով (λ₁ և λ₂) լույսի ճառագայթները մոդուլացնող համակարգի միջով ընկնում են հետազոտվող նմուշով կյուվետի վրա: Նմուշից հետո լույսն

ընկնում է ճառագայթման ընդունիչի վրա: Ալիքի երկարությունները այնպես են ընտրվում, որ λ_1 -ը լինի հետագոտվող միացության կլանման փոփոխության պիկում, իսկ λ_2 -ը՝ դրան հարակից կետում՝ կլանման նվազագույն փոփոխությամբ: Օրինակ, բջիջների աերոբ կախությամբ ցիտոքրոմ C-ի վերականգնման չափման դեպքում մի ալիքի երկարությունը ընտրվում է 550նմ-ը, մյուսը՝ 540նմ: Երկու մոնոքրոմատորներից դուրս եկող ճառագայթների ինտենսիվությունը այնպես է ընտրվում, որպեսզի ճառագայթման ընդունիչի ելքի վրա փոփոխական բաղադրիչը հավասար լինի զրոյի: Դրանից հետո նմուշը ենթարկվում է արտաքին ազդեցությանը, ինչի հետևանքով ցիտոքրոմ C-ն վերականգնվում է: Քանի որ $\lambda_1=550$ նմ և դիֆերենցիալ սպեկտրում գտնվում է կլանման շերտի մաքսիմումի մոտակայքում, ապա սարքը գրանցում է վերականգնված ցիտոքրոմ C-ի կլանման շերտի ի հայտ գալով պայմանավորված ազդակը, որը համապատասխանում է օպտիկական խտությունների տարբերությանը: Քանի որ իրար մոտ ալիքի երկարությունների դեպքում ցրման փոփոխության տարբերությունը փոքր է, երկճառագայթ մեթոդի օգտագործումը էականորեն նվազեցնում է սխալը, որը պայմանավորված է նմուշի ցրման հատկությունների փոփոխությամբ որպես ժամանակի ֆունկցիա կամ ռեազենտների ավելացման հետևանք: Երկալիք տարբերակի օգտագործումը էականորեն նվազեցնում է սխալ տվյալների ստացումը, որը ֆերմենտային ռեակցիաների հետագոտության դեպքում լուծույթում ռեազենտների իրար խառնվելու հետևանք է, իսկ սխալ տվյալները նստեցման կամ կյուվետում միկրոօրգանիզմների ուղղորդված շարժման հետևանք են:

Կենսաբանական օբյեկտների հետագոտության դեպքում հաճախ անհրաժեշտ է լինում գրանցել երկու նմուշների կլանումների տարբերությունը, որպես ալիքի երկարության ֆունկցիա, երբ նմուշները նույնական են բոլոր առումներով, բացի ֆերմենտների օքսիդացված վիճակից: Այս նպատակի համար առավել հարմար է օգտագործել երկճառագայթ սպեկտրաֆոտոմետրեր: Երկճառագայթ և երկալիք տարբերակների էլեկտրոնային սխեմաները նման են, մինչդեռ օպտիկական և մեխանիկական սարքերը էականորեն տարբերվում են միմյանցից:

Երկճառագայթ սարքում (նկ. 7, գ) լույսը մոնոքրոմատորով անցնելուց հետո բաժանվում է երկու մասի: Այս ճառագայթները մոդուլատորով անցնելուց հետո հաջորդաբար ընկնում են երկու միանման կյուվետների վրա, որոնցից մեկի մեջ հետազոտվող նմուշն է, իսկ մյուսի մեջ՝ համեմատականության: Նմուշներից հետո լույսն ընկնում է ճառագայթման ընդունիչի վրա: Նմուշներով կյուվետի տեղադրումից հետո գրանցվում է զրոյական գիծը, ուսումնասիրվող նմուշը ենթարկվում է հետազոտվող ազդեցությանը և գրանցվում է կլանման սպեկտրների տարբերությունը: Հոսանքը ճառագայթման ընդունիչի ելքի վրա, որը համապատասխանում է համեմատականության նմուշի միջով անցած լույսի ինտենսիվությանը, շղթայի հակադարձ կապի հետևանքով պահպանվում է միևնույն մակարդակի վրա: Հակադարձ կապի առկայությունն անհրաժեշտ տարր է, որը թույլ է տալիս փոխհատուցել ճառագայթման ընդունիչի զգայունության անհավասարությունը, լույսի աղբյուրի ճառագայթման անհավասարությունը և սպեկտրի ալիքի երկարությունից կախված նմուշի բացթողման փոփոխությունը:

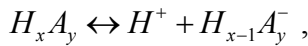
Սպեկտրաֆոտոմետրերի այս երկու տեսակները կարող են միմյանց փոխարինել, միայն թե սահմանային բնութագրիչների անխուսափելի նվազեցմամբ: Այդ պատճառով մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում այնպիսի սարքերի կիրառումը, որոնք միավորում են երկճառագայթ և երկալիք սարքերի բոլոր սխեմաները: Այսպես, Ռիկմենսպոլի սպեկտրաֆոտոմետրում օպտիկական մասը հավաքված է կտրված դիֆրակցիոն ցանցով Չերնի-Տերների տեսակի մոնոքրոմատորի վրա, որի յուրաքանչյուր կես ունի մյուսից անկախ մուտք:

Երկճառագայթ տարբերակը իրականացվում է նույն դիրքում ցանցերի ամուր ամրացման և մուտքերից մեկի մոտ դրանց պտտման շնորհիվ: Ցանցի յուրաքանչյուր կեսի առանձին պտույտի դեպքում սարքը կարող է աշխատել որպես երկալիք: Ընդ որում, այդպիսի սարքը ցույց է տալիս երկալիք և երկճառագայթ սպեկտրոֆոտոմետրերի տարբերությունները և նմանությունները: Ճառագայթի բաժանումը երկու մասի բերում է լույսի ինտենսիվության նվազմանը և համապա-

տասխանաբար զգայունության անկմանը: Սակայն, ցածր տեխնիկական աղմուկների շնորհիվ, դանդաղ պրոցեսների գրանցման դեպքում այս սարքերի զգայունությունը բարձրանում է միաճառագայթ սարքերի համեմատ: Գրականության մեջ նկարագրված սարքերի մեծամասնությունն ունի 10^{-4} միավոր օպտիկական խտություն:

7. ԹՈՒՅԼ ԹԹՈՒՆԵՐԻ ԴԻՍՈՑՄԱՆ ԱՍՏԻՃԱՆԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ ԹԹՎԱՀԻՄՆԱՅԻՆ ՀԱՎԱՍԱՐԱԿԵՐՈՒԹՅԱՆ ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ

Սպեկտրասկոպիայի մեթոդը մեծ կիրառություն ունի թթվահիմնային հավասարակշռության վերլուծության համար: Թթու են անվանում այն նյութերը, որոնք ունակ են պրոտոն անջատելու, իսկ հիմքեր են կոչվում այն նյութերը, որոնք ընդունակ են պրոտոններ միացնելու: Թթվահիմնային հավասարակշռությունը կարելի է ներկայացնել հետևյալ կերպ.

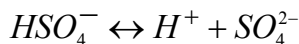
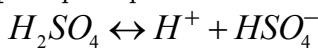


որտեղ $H_x A_y$ -ը գուգակցված թթուն է, իսկ $H_{x-1} A_y^-$ -ը՝ գուգակցված հիմքը:

Տվյալ հավասարակշռությունը բնութագրվում է թթվայնության հաստատունով, որը որոշվում է հավասարակշռության մեջ մասնակցող մասնիկների ակտիվության աստիճանների արտադրյալով, որոնք համապատասխանում են ստեխիոմետրիկ գործակիցներին.

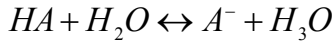
$$K_a = \frac{a(H^+) \cdot a(H_{x-1} A_y^-)}{a(H_x A_y)} , \quad (29)$$

որտեղ K_a -ն թթվայնության հաստատունն է, a -ն՝ թթվային և հիմնային մասնիկների ակտիվության աստիճանը: Ընդ որում, կախված դիտարկվող հավասարակշռությունից՝ նույն մասնիկը կարող է ծառայել ինչպես թթու, այնպես էլ հիմք: Օրինակ, ծծմբական թթվի դիսոցումը բնութագրվում է հետևյալ հավասարմամբ.



Առաջին ռեակցիայում HSO_4^- -ը որպես զուգակցված հիմք է, իսկ երկրորդում՝ արդեն որպես զուգակցված թթու, իսկ SO_4^{2-} իոնը կատարում է հիմքի դեր: Հետևաբար, մասնիկի թթվայնությունը կախված է ոչ միայն իր, այլև այն մասնիկի հատկություններից, որոնք ընդունում են պրոտոն:

Դիտարկենք լուծույթում թույլ միահիմն թթվի դիսոցման պրոցեսը.



$$C_0(1-\alpha) \quad C_0\alpha \quad C_0\alpha$$

Այդ դեպքում դիսոցման հաստատունը կրնա լինի հետևյալ տեսքով.

$$K_a = \frac{C_{\text{A}^-} \cdot C_{\text{H}^+}}{C_{\text{HA}}} \cdot \frac{f_{\text{A}^-} \cdot f_{\text{H}^+}}{f_{\text{HA}}} = \frac{a^2 C_0}{1-\alpha} \cdot f_{\pm}^2 \quad (30)$$

Բավականին նոսր ջրային լուծույթների դեպքում f_{HA} չեզոք մոլեկուլի ակտիվության գործակիցն ընդունվում է հավասար 1-ի, $f_{\pm}$ միջին իոնային ակտիվության գործակիցը կարելի է հաշվարկել օգտագործելով Դեբայ-Հյուկելի բանաձևը: Դիսոցման աստիճանը որոշվում է սպեկտրասկոպիկ տվյալներից:

Քանի որ ջուրը և H_3O^+ -ը չեն կլանում լույս սպեկտրի տեսանելի և մոտակա ուլտրամանուշակագույն տիրույթներում, ուստի ալիքի երկարության տվյալ միջակայքում լուծույթի օպտիկական խտությունը կորոշվի միայն թթվի մոլեկուլների և թթվային մնացորդի անիոնների կլանմամբ.

$$A_{\lambda} = l \cdot (\varepsilon_{\text{HA}} C_{\text{HA}} + \varepsilon_{\text{A}^-} C_{\text{A}^-}) \quad (31)$$

(31)-ը ձևափոխելով ստացվում է՝

$$A_{\lambda} = l \cdot C_0 (\varepsilon_{\text{HA}} + \alpha \cdot (\varepsilon_{\text{A}^-} - \varepsilon_{\text{HA}})) \quad (32)$$

որը ցույց է տալիս, որ լուծույթի օպտիկական խտությունը ֆունկցիա է թույլ թթվի դիսոցման աստիճանից և, հետևաբար, կախված է միջավայրի pH-ից: Ուժեղ թթուների ավելացման դեպքում հավասարակշռությունը տեղաշարժվում է ձախ, իսկ ուժեղ հիմքերի ավելացման դեպքում՝ աջ: Դա նշանակում է, որ հետագոտելով լուծույթի կլանումը բավական թթու միջավայրում կարելի է ստանալ թթվի չդիսոցված մոլեկուլների սպեկտրը ($\alpha=0$), իսկ հիմնային միջավայրում կարելի է գրանցել թթվի անիոնների սպեկտրը ($\alpha=1$): Դիսոցման աստիճանի կտրուկ փոփոխության անցումային միջակայքը ($0<\alpha<1$) ընկած է pH-ի 2-3 միավորով փոփոխության տիրույթում: pH-ի հետագա փոփոխության դեպքում դեպի ավելի մեծ և փոքր արժեքներ, ցանկացած ալիքի երկարության տակ օպտիկական խտությունը շատ քիչ է փոխվում՝ ընդունելով $A_{\text{թթու}}$ և $A_{\text{հիմք}}$ հաստատուն արժեքներ:

Իմանալով $A_{\text{թթու}}$ և $A_{\text{հիմք}}$ մեծությունները՝ կարելի է որոշել երկու ձևերի ε -ի արժեքները.

$$\varepsilon_{HA} = A_{\text{թթու}} / (c_0 \cdot l), \quad \varepsilon_{A^-} = A_{\text{հիմք}} / (c_0 \cdot l) \quad (33)$$

Տեղադրելով այս արժեքները (29)-ի մեջ՝ կարելի է ստանալ լուծույթում երկու ձևերի կոնցենտրացիաները: Եթե բոլոր չափումները իրականացվում են օպտիկական շերտի նույն հաստությամբ կյուվետներում, HA թթվի դիսոցման աստիճանը կարելի է արտահայտել օպտիկական խտության մեծություններով.

$$\alpha = \frac{c_{A^-}}{c_0} = \frac{A - A_{\text{թթու}}}{A_{\text{թթու}} - A_{\text{հիմք}}} : \quad (34)$$

Սակայն, ջրում թույլ թթվի դիսոցման հաստատունի որոշումը (30)-ով և (34)-ով հաճախ բերում է ոչ ճիշտ արդյունքների, որը պայմանավորված է լուծույթում առկա կոդմնակի (այդ թվում ածխաթթուների) խառնուրդներով, որոնք հաճախ անտեսվում են: Այս դժվարությունը շրջանցվում է, եթե չափումներն իրականացվում են հայտնի pH-ով բու-

ֆերային լուծույթներում: Այս դեպքում դիսոցման հաստատունը ընդունում է հետևյալ տեսքը.

$$K_a = \frac{\alpha}{1-\alpha} \cdot a_{H^+} \cdot f_- \quad (35)$$

(35)-ի միջոցով հաշվարկի առավելությունն այն է, որ թթվի սկզբնական կոնցենտրացիան հաշվի չի առնվում: Դիսոցման աստիճանը որոշվում է սպեկտրասկոպիկ տվյալներից, ջրածնի իոնների ակտիվությունը որոշվում է անկախ մեթոդով, իսկ թթվային մնացորդի անիոնի ակտիվության գործակիցը հաշվարկվում է Դեբայ-Հյուկելի բանաձևով.

$$\lg f_- = -\frac{0.509\sqrt{I_c}}{1+\sqrt{I_c}} \quad (36)$$

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_i C_i \cdot Z_i^2,$$

որտեղ I_c -ն լուծույթի իոնական ուժն է, որը լուծույթում գոյություն ունեցող բոլոր իոնների գումարն է, C_i և Z_i -ն համապատասխանաբար իոնի մոլային կոնցենտրացիան և լիցքն են:

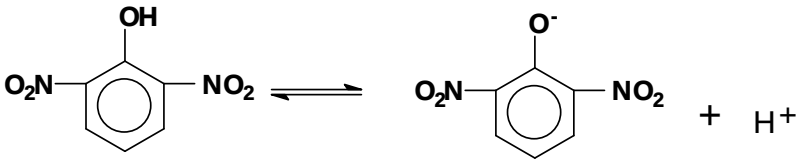
Սովորաբար բուֆերային լուծույթ առաջացնող նյութերի կոնցենտրացիաները զգալիորեն գերազանցում են հետազոտվող նյութերի կոնցենտրացիաները: Օրինակ, քացախաթթվային բուֆերի իոնական ուժը կորոշվի հիմնականում նատրիումի ացետատի կոնցենտրացիայով:

Հաշվի առնելով, որ $pH = -\lg a_{H^+}$ և լոգարիթմելով (35)-ը՝ կըստանանք վերջնական բանաձև, որը թույլ է տալիս հաշվարկել բուֆերային լուծույթում միահիմն թթվի դիսոցման հաստատունը.

$$\lg K_a = \lg \frac{\alpha}{1-\alpha} - pH + \lg f_- \quad (37)$$

7.1. Դինիտրոֆենոլի դիսոցիացիայի հաստատունի որոշումը սպեկտրաֆոտոմետրիկ մեթոդով

2,4-դինիտրոֆենոլի (α -ԴՆՖ) կամ 2,6-դինիտրոֆենոլի (β -ԴՆՖ) լուծույթում տեղի ունեցող դիսոցիացիայի պրոցեսը կարելի է ներկայացնել հետևյալ կերպ. նույն լուծույթների համար դիսոցիացիայի հաստատունը կապված է դիսոցիացիայի աստիճանի (α) և լուծույթի pH-ի հետ (37) հարաբերությամբ: Դիսոցիացիայի աստիճանի արժեքը որոշվում է (34)-ով՝ հայտնի pH-ով բուֆերում ԴՆՖ-ի լուծույթի օպտիկական խտության չափում-



ներից: Նույն լուծույթի համար (36)-ով որոշվում է f - ակտիվության գործակիցը: Իմանալով նույն լուծույթի համար α , pH և f - արժեքները՝ կարելի է որոշել K_α դիսոցիացիայի հաստատունի մեծությունը, սակայն K_α -ի ճշգրիտ որոշման համար անհրաժեշտ է պահպանել հետևյալ պայմանները.

- Թթվային, հիմնային և բուֆերային լուծույթներում ԴՆՖ-ի կոնցենտրացիան պետք է այնպես ընտրել, որ բոլոր լուծույթների օպտիկական խտությունների առավելագույն արժեքները գտնվեն օգտագործվող սարքերի աշխատանքային միջակայքի սահմաններում ($0.1 < A < 1.4$):

- Բոլոր օգտագործվող լուծույթները պետք է ունենան նույն իոնական ուժը, քանի որ հետազոտվող մասնիկների մարման մոլային գործակիցների արժեքները կարող են կախված լինել լուծույթի իոնական ուժից: Ավելին, իոնական ուժի արժեքները չպետք է գերազանցեն 0.01 M, որպեսզի իոնների ակտիվության գործակիցների հաշվարկման ժամանակ հնարավոր լինի կիրառել Դեբայ-Հյուկելի բանաձևը:

- Բոլոր փորձերը պետք է կատարվեն միևնույն ջերմաստիճանային պայմաններում, քանի որ մարման մոլային գործակիցը կախված է ջերմաստիճանից:

Լաբորատոր աշխատանք 1 ***Աշխատանքի նպատակը***

- Սպեկտրի տեսանելի և ուլտրամանուշակագույն տիրույթներում տարբեր pH-ով α - և β -ԴՆՖ-ի լուծույթների կլանման սպեկտրների գրանցում:

- α - և β -ԴՆՖ-ի թթվային և հիմնային վիճակների համար աշխատանքային ալիքի երկարությունների որոշում, իզոբեստիկ կետի հայտնաբերում:

- Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքի ստուգում: ԴՆՖ-ի թթվային և հիմնային ձևերի մարման մոլային գործակիցների որոշում:

- ԴՆՖ-ի դիսոցիացիայի գործակիցների որոշում:

Փորձարարական մաս ***Լուծույթների պատրաստում***

Աշխատանքում օգտագործվել են հետևյալ լուծույթները .

- նախնական պատրաստի լուծույթներ,
- բուֆերային լուծույթներ,
- աշխատանքային լուծույթներ:

Նախնական պատրաստի ջրային լուծույթների կոնցենտրացիաները .

Լուծված նյութ	Կոնցենտրացիա, մոլ/լիտր
α - կամ β -ԴՆՖ	0,001
HCl	0,1
NaOH	0,1
CH ₃ COOH	0,3

1-ին բուֆերային լուծույթը (բուֆեր 1) պատրաստում են 200մլ չափիչ փորձանոթում նատրիումի ացետատից և քացախաթթվից: Բուֆեր 1-ը պետք է ունենա $pH=4,3$, եթե աշխատանքում օգտագործվում է α -ԴՆՖ, և $pH=4,0$, եթե օգտագործվում է β -ԴՆՖ: Պատրաստի բուֆերային լուծույթում նատրիումի ացետատի կոնցենտրացիան պետք է լինի 0,02 M: Քացախաթթվի՝ AcH-ի անհրաժեշտ քանակությունը հաշվարկում են Հենդերսոնի բանաձևով.

$$pH = -\lg K_a (AcH) + \lg \frac{C(AcNa)}{C(AcH)}, \quad (38)$$

որտեղ $K_a (AcH) = 1.75 \cdot 10^{-5}$:

Բուֆեր 1-ի pH -ը կարգավորում են նատրիումի ացետատով կամ քացախաթթվով:

Բուֆեր 2-ը ($pH=4,1$ α -ԴՆՖ-ի համար, $pH=3,8$ β -ԴՆՖ-ի համար) պատրաստում են բուֆեր 1-ից՝ 50 մլ բաժակի մեջ վերջինիս վրա կաթիլ-կաթիլ ավելացնելով քացախաթթու: pH -ի արժեքը կարգավորում են իոնոմերի միջոցով:

Բուֆեր 3-ը ($pH=3,9$ α -ԴՆՖ-ի համար, $pH=3,6$ β -ԴՆՖ-ի համար) պատրաստում են բուֆեր 1-ից՝ 50 մլ բաժակի մեջ, նույն ձևով:

Աշխատանքային լուծույթները պատրաստում են 50 մլ չափիչ փորձանոթներում:

α -ԴՆՖ-ի հետ աշխատելիս պատրաստում են հետևյալ լուծույթները.

Լուծույթի համար	0,001 M α -ԴՆՖ-ի լուծույթ	0,1 M թթվի կամ հիմքի լուծույթ
1	4.0 մլ	5 մլ HCl
2	2.0 մլ	5 մլ HCl
3	1.0 մլ	5 մլ HCl
4	4.0 մլ	5 մլ NaOH
5	2.0 մլ	5 մլ NaOH

6	1.0 մլ	5 մլ NaOH
7	0.5 մլ	5 մլ NaOH
8	4.0 մլ	25 մլ բուֆեր 1
9	4.0 մլ	25 մլ բուֆեր 2
10	4.0 մլ	25 մլ բուֆեր 3

β-ԴՆՖ-ի դեպքում պատրաստվում են նշված լուծույթները .

Լուծույթի համարը	0,001 M β-ԴՆՖ-ի լուծույթ	0,1 M թթվի կամ հիմքի լուծույթ
1	7.0 մլ	5 մլ HCl
2	3.0 մլ	5 մլ HCl
3	1.5 մլ	5 մլ HCl
4	7.0 մլ	5 մլ NaOH
5	3.0 մլ	5 մլ NaOH
6	1.5 մլ	5 մլ NaOH
7	1.0 մլ	5 մլ NaOH
8	7.0 մլ	25 մլ բուֆեր 1
9	7.0 մլ	25 մլ բուֆեր 2
10	7.0 մլ	25 մլ բուֆեր 3

Սպեկտրների գրանցումը

α-ԴՆՖ-ի լուծույթի կլանման սպեկտրները գրանցում են 220-500 նմ մարգում, իսկ β-ԴՆՖ-ը՝ 300-550 նմ: Այդ նպատակով օգտագործում են 1=1սմ օպտիկական ուղի ունեցող կվարցե կյուվետներ: Որպես ստուգիչ լուծույթ օգտագործում են թորած ջուր:

Անհրաժեշտ է ստանալ №1, 4, 8-10 լուծույթների կլանման սպեկտրները: Ինդիկատորի յուրաքանչյուր ձևի համար որոշում են աշխատանքային ալիքի երկարությունները (λ_1 և λ_2) և օպտիկական խտությունը՝ A_{λ} : Գտնում են իզոբեստիկ կետը, որոշում են այն բնութագրող մեծությունները (λ , ε):

Այնուհետև ստանում են № 2, 3, 5-7 լուծույթների օպտիկորեն: Որոշում են ԴՆՖ-ի պրոտոնացված և դեպրոտոնացված ձևերի օպտիկական խտությունները (A_λ): Ստուգում են Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը: Դրա համար կառուցում են A_λ-ի ԴՆՖ-ի կոնցենտրացիայից կախման կորերը թթվային և հիմնային լուծույթների համար: Հաշվարկում են ինդիկատորի յուրաքանչյուր ձևի ε էքստինկցիայի գործակիցը, և նրա որոշման միջին քառակուսային սխալը՝ σ_n:

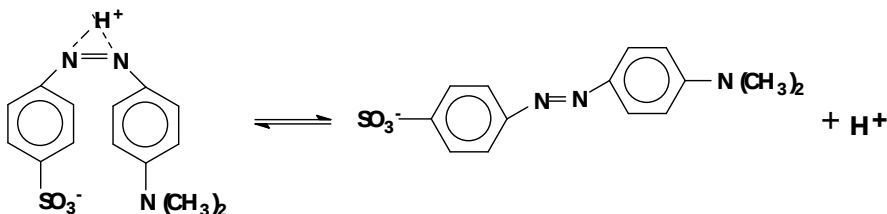
Եթե ունենք տարբեր 1 (0.2 և 0.5 սմ) օպտիկական ուղիներով կվարցե կյուվետներ, ապա նրանցով հանում են ԴՆՖ-ի №1 կամ №4 լուծույթների կլանման օպտիկորենքը և կառուցում են A_λ-ի 1-ից կախվածության կորը: Ստուգում են Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը: ԴՆՖ-ի դիսոցման հաստատունի հաշվարկը կատարվում է (38) բանաձևով, K_a-ի արժեքները համեմատում են տեղեկատուի տվյալների հետ:

7.2. ՄԵԹԻԼԵՆ ՆԱՐՆՋԱԳՈՒՅՆԻ ԴԻՍՈՑՄԱՆ ՀԱՍՏԱՏՈՒՆԻ ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Լաբորատոր աշխատանք 2

Տվյալ աշխատանքում հետազոտվում է մեթիլեն նարնջագույնի (4'-դիմեթիլամինոազաբենզոլ-4-սուլֆոթթվի նատրիումական աղ) լուծույթում թթվահիմնային հավասարակշռությունը: Լուծույթում այս ինդիկատորի դիսոցման պրոցեսը պայմանավորված է նրանով, որ մեթիլեն նարնջագույնը դասվում է ամֆոտեր ինդիկատորների թվին, քանի որ դրա մոլեկուլը միաժամանակ պարունակում է թթվային և հիմնային խմբեր: Այս մոլեկուլի թթվահիմնային դիսոցումն ուղեկցվում է ցիս-տրանս իզոմերների անցմամբ: Բավականին նոսր լուծույթների դեպքում դիսոցման հաստատունը կապված է դրա α դիսոցման աստիճանի և լուծույթի pH-ի հետ (38) հարաբերությամբ: Դիսոցման աստիճանի արժեքը գտնում են հայտնի pH-ով բուֆերում ինդիկատորների լուծույթների օպտիկական խտությունների չափումներից (34)-ով:

Նույն լուծույթի համար Դեբայ-Հյուկելի բանաձևով որոշվում է ֆակտիվության գործակիցը: Իմանալով նույն լուծույթի α -ն, pH-ը և $f_{\pm}$ ՝ կարելի է որոշել K_a դիսոցիացման հաստատունի արժեքը:



Սակայն K_a -ի ճշգրիտ արժեքի որոշման համար անհրաժեշտ է ապահովել հետևյալ պայմանները.

- Թթվային, հիմնային և բուֆերային լուծույթներում ինդիկատորի կոնցենտրացիան պետք է այնպես ընտրել, որ օպտիկական խտությունների առավելագույն արժեքները գտնվեն օգտագործվող սարքերի աշխատանքային միջակայքում ($0.1 < D < 1.4$):
- Բոլոր օգտագործվող լուծույթները պետք է ունենան միևնույն I_c իոնական ուժը քանի որ հետազոտվող մասնիկների էքստինկցիայի գործակիցները կարող են կախված լինել լուծույթի իոնային ուժից: Բացի այդ, I_c -ի արժեքները չպետք է գերազանցեն 0.01 M, որպեսզի իոնների ակտիվության գործակիցների հաշվարկի համար հնարավոր լինի օգտագործել Դեբայ-Հյուկելի բանաձևը:
- Բոլոր փորձերը պետք է կատարվեն միևնույն ջերմաստիճանային պայմաններում, քանի որ էքստինկցիայի գործակիցը կախված է ջերմաստիճանից:

Լաբորատոր աշխատանքի նպատակը

- Սպեկտրի տեսանելի և ուլտրամանուշակագույն մարզում մեթիլեն նարնջագույնի տարբեր pH-ով լուծույթների կլանման սպեկտրերի գրանցում:
- Հետազոտվող ինդիկատորի թթվային և հիմնային ձևերի համար աշխատանքային ալիքի երկարությունների որոշում, իզոբեստիկ կետի հայտնաբերում:
- Ընտրված ալիքի երկարությունների դեպքում ինդիկատորի թթվային և հիմնային ձևերի էքստինկցիայի գործակիցների որոշում:
- Մեթիլեն նարնջագույնի դիսոլվման հաստատունի որոշում:

Փորձնական մաս

Աշխատանքում օգտագործում են հետևյալ լուծույթները .

- նախնական պատրաստի լուծույթներ,
- բուֆերային լուծույթներ,
- աշխատանքային լուծույթներ:

Նախնական պատրաստի ջրային լուծույթները պետք է լինեն հետևյալ կոնցենտրացիաների .

Լուծված նյութ	Կոնցենտրացիա
Մեթիլեն նարնջագույն	1 գ/լ
HCl	0.1 M
NaOH	0.1 M
CH ₃ COOH	0.3 M

I բուֆերային լուծույթը (բուֆեր I) ունի pH=3.9 և պատրաստում են 200մլ չափիչ փորձանոթում նատրիումի ացետատից ու քացախաթթվից: Պատրաստի բուֆերային լուծույթում նատրիումի ացետատի կոն-

ցենտրացիան պետք է լինի 0.02 M: Քացախաթթվի՝ AcH, անհրաժեշտ քանակությունը հաշվարկում են Հենդերսոնի բանաձևով.

$$pH = -\lg K_a(AcH) + \lg \frac{C(AcNa)}{C(AcH)}, \quad (39)$$

որտեղ $K_a(AcH)=1.75 \cdot 10^{-5}$: Բուֆեր I-ի pH-ը կարգավորում են նատրիումի ացետատով կամ քացախաթթվով: Բուֆեր II-ը (pH=3.7) և բուֆեր III-ը (pH=3.5) պատրաստում են բուֆեր I-ից 50 մլ բաժակների մեջ՝ կաթիլ-կաթիլ ավելացնելով քացախաթթու: pH-ի արժեքը կարգավորում են իոնոմերի միջոցով: 0.2գ/լ կոնցենտրացիայով մեթիլեն նարնջագույնի լուծույթը պատրաստում են 50 մլ չափիչ փորձանոթի մեջ:

Այս լուծույթներից պատրաստում են աշխատանքային լուծույթները 50 մլ չափիչ փորձանոթներում.

Լուծույթի համար	Մեթիլեն նարնջագույնի լուծույթ, 0,2գ/լ	0.1 M թթվի կամ հիմքի լուծույթ
1	2.0 մլ	5 մլ HCl
2	1.5 մլ	5 մլ HCl
3	1.0 մլ	5 մլ HCl
4	0.5 մլ	5 մլ HCl
5	2.5 մլ	5 մլ NaOH
6	2.0 մլ	5 մլ NaOH
7	1.5 մլ	5 մլ NaOH
8	1.0 մլ	5 մլ NaOH
9	2.0 մլ	25 մլ բուֆեր I
10	2.0 մլ	25 մլ բուֆեր II
11	2.0 մլ	25 մլ բուֆեր III

Սպեկտրների գրանցում

Ինդիկատորի պատրաստված լուծույթների կլանման սպեկտրները գրանցում են 300-600 նմ մարզում: Այս նպատակով օգտագործում են $l=1$ սմ օպտիկական ուղի ունեցող կյուվետներ: Որպես համեմատականության կամ ստուգիչ լուծույթ օգտագործում են թորած ջուր: №1, 6, 9-11 լուծույթների կլանման սպեկտրներն են ստանում: Ինդիկատորի յուրաքանչյուր ձևի համար որոշում են աշխատանքային ալիքի երկարությունները (λ_1 և λ_2) և օպտիկական խտությունը A_{λ} : Գտնում են իզոբեստիկ կետը, որոշում են այն բնութագրող մեծությունները (λ , ε): Այնուհետև ստանում են №2-5, 7, 8 լուծույթների սպեկտրները: Որոշում են ինդիկատորի պրոտոնացված և դեպրոտոնացված ձևերի A_{λ} օպտիկական խտությունները: Ստուգում են Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը: Դրա համար կառուցում են A_{λ} -ի ինդիկատորի կոնցենտրացիայից կախման կորերը թթվային և հիմնային լուծույթների համար: Հաշվարկում են ինդիկատորի յուրաքանչյուր ձևի ε էքստինկցիայի գործակիցը: Եթե ունենք տարբեր 1 (0.2 և 0.5 սմ) օպտիկական ուղիներով կվարցե կյուվետներ, ապա նրանցով ստանում են №1 կամ №4 լուծույթների կլանման սպեկտրները և կառուցում են A_{λ} -ի 1-ից կախվածության կորը: Ստուգում են Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը:

Մեթիլեն նաբնջագույնի դիսոցման հաստատունի հաշվարկը

(38) բանաձևով, բերված տեսական մասում, հաշվարկում են ինդիկատորի դիսոցման հաստատունի արժեքը: K_{α} -ի արժեքները համեմատում են տեղեկատուի տվյալների հետ:

7.3. ԴՆԹ-ԼԻԳԱՆԴ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ pH ՏԻՏՐՈՒՄԸ: pK_a-Ի ՈՐՈՇՈՒՄԸ

Մոլեկուլային կենսաֆիզիկայի արդիական հիմնախնդիրներից են կենսամակրոմոլեկուլների, այդ թվում նաև ԴՆԹ-ի կառուցվածքի, դրա բազմաձևության և տարբեր արտաքին գործոնների ներքո նրա կոնֆորմացիոն անցումների, ինչպես նաև ԴՆԹ-ի հետ տարբեր մոլեկուլների կամ միացությունների՝ լիզանդների փոխազդեցության առանձնահատկությունների ուսումնասիրությունները: ԴՆԹ-ի կառուցվածքային փոխարկումները զգալիորեն կախված են նրա հետ լիզանդների (դեղանյութեր, հակաբիոտիկներ, սպիտակուցներ և այլն) կոմպլեքսագոյացումից:

Ըստ ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության առանձնահատկության ցածրամոլեկուլային միացությունները (մետաղների իոններ, սպիտակուցային բնույթի մոլեկուլներ և այլ օրգանական միացություններ) բաժանվում են երկու խմբի՝ կովալենտ և ոչ կովալենտ կապվող լիզանդներ: Ոչ կովալենտ եղանակով փոխազդող լիզանդները ԴՆԹ-ի հետ կապվում են դարձելիորեն, ուստի դրանք կարող են վերաբաշխվել կրկնակի պարույրի երկայնքով: Ընդ որում, լիզանդները փոխում են ԴՆԹ-ի կառուցվածքային փոխարկումների բնութագրերը այնպիսի կոնցենտրացիաների դեպքում, որոնք զգալիորեն փոքր են նուկլեինաթթվի կոնցենտրացիայից: Դարձելի կապվող լիզանդներին են պատկանում ծանր մետաղների իոնները (Cu, Fe, Ag), որոշ հակաբիոտիկներ (ակտինոմիցին, նետրոպսին), մի շարք սպիտակուցներ և այլն: Ընդհանրապես, դարձելի կապվող լիզանդների մեծ մասը կայունացնում են ԴՆԹ-ի երկպարույր կառուցվածքը:

Կովալենտ եղանակով կապվող լիզանդները ամուր կապվում են ԴՆԹ-ի որոշակի հատվածում և այլևս չեն վերաբաշխվում մոլեկուլի երկայնքով: Այդպիսի լիզանդների թվին են պատկանում ԴՆԹ-ի ֆունկցիոնալ խմբերի տարբեր քիմիական մոդիֆիկատորները, ինչպես նաև մի շարք կենսաբանորեն ակտիվ մոլեկուլներ, մասնավորապես, պլատին կամ պալադիում պարունակող միացությունները: Դրանց թվին են

պատկանում նաև պոլիպեպտիդները, հիստոնային սպիտակուցները ցածր իոնական ուժի պայմաններում, քանի որ բարձր իոնական ուժերում վերջիններին կապման բնույթը փոխվում է:

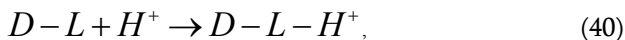
Դարձելի կապվող լիզանդներն, ըստ փոխազդեցության հիմնական մեխանիզմի, բաժանվում են ինտերկալատորների և ակոսում կապվող միացությունների, որոնք ներկայումս մեծ հետաքրքրություն են ներկայացնում: Վերջին տարիներին ստացված փորձարարական տվյալները վկայում են այն մասին, որ այս միացություններն իրականում ԴԼԹ-ի հետ կապվում են մեկից ավելի մեխանիզմներով, որոնց դրսևորումը կախված է միջավայրի տարբեր գործոններից՝ ջերմաստիճան, իոնական ուժ, pH և այլն:

ԴԼԹ-ի հետ ինտերկալատորների փոխազդեցության վերաբերյալ ավելի վաղ կատարված աշխատանքները բացահայտել են, որ իոնական ուժը էական ազդեցություն ունի ԴԼԹ-ի հետ լիզանդի կապման վրա, սակայն կապման վրա իոնական ուժի ազդեցության քանակական որոշման տեսություն գոյություն չունի: Իոնների կոնցենտրացիայի տեսությունը զարգացվել է Մանինգի և Ռեկորդի աշխատանքներում, որը թույլ է տալիս պարզաբանելու իոնական ուժի էֆեկտները, ինչպես նաև նուկլեինաթթուների հետ լիզանդների փոխազդեցությունը: Վիլսոնը և Լոպպը այս տեսությունը կիրառել են ինտերկալատորների համար:

Կոնդենսացիայի տեսության կիրառումը ինտերկալացիայի համար պահանջում է հաշվի առնել ֆոսֆատ-ֆոսֆատ միջին հեռավորության մեծացումը (լիցքի խտության փոքրացումը) դեգրադիռիբոզ-ֆոսֆատ շղթայի երկարությամբ, ինչը տեղի է ունենում հարևան գույգ հիմքերի միջև լիզանդի ներդրման հետևանքով: Այս կոնֆորմացիոն փոփոխությունը նվազեցնում է ԴԼԹ-ի մեկ ֆոսֆատի հետ կոնդենսացված, ինչպես նաև Դեբայ-Հյուկելյան փոխազդեցությամբ կապված կատիոնների միջին քանակությունը, այսինքն տեղի է ունենում լիցքի խտության նվազում 0.88-ից մինչև 0.82՝ չհաշված լիզանդի լիցքը: Նատրիումի իոնների ազդեցությունը ԴԼԹ-ի հետ ինտերկալացիոն մեխանիզմով կապվող լիզանդների փոխազդեցության վրա կարող է բացատրվել քանակապես: Քվինակրինի կապման վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ

դիսոցվում են նատրիումի ավելի շատ իոններ, քան հաշվարկված էր տեսականորեն: Դա հնարավոր է այն դեպքում, եթե քվինակրինը հրահրում է նատրիումի ավելի շատ իոնների դիսոցում, քան անհրաժեշտ է ԴՆԹ-ի ազոտային զույգի հետ դրանց կապման համար, կամ եթե ինտերկալացիայի արդյունքում, կոնֆորմացիոն փոփոխությունների հետևանքով անջատվում են ավելի մեծ քանակությամբ նատրիումի իոններ, քան ենթադրվում էր: Վերջինս կարող է տեղի ունենալ, եթե քվինակրինի մեկ մոլեկուլի ինտերկալացիայի ժամանակ կրկնակի պարույրը երկարում է ավելի քան 3,4Å-ով և/կամ ԴՆԹ-ի մոլեկուլում առաջացնում է լրացուցիչ բեկում՝ թույլ կապման արդյունքում: Մյուս կողմից, Na⁺-ի տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում փորձերի և հաշվարկների միջև ստացվող ոչ մեծ տարբերությունը կարող է պայմանավորված լինել տեսական ենթադրությունների սխալներով և անճշտություններով փորձարարական մեթոդներում, ինչպես նաև կապման տեսական մոդելների արդյունքների վերադրմամբ: Լիզանդների ինտերկալացիայի պրոցեսում իոնական ուժի ազդեցությունը պարզաբանելու համար որպես հիմնական պարամետր ծառայում է լիզանդի pK_a-ն, քանի որ այն քանակապես կախված է լուծույթում առկա կատիոնների կոնցենտրացիայից:

Լիզանդի pK_a-ի վարքի վերլուծության համար անհրաժեշտ է ինտերկալացիոն այնպիսի հատված, որտեղ ազոտային զույգի հետ իոնի կապման ընթացքում չի առաջանում կոնֆորմացիոն փոփոխություն: Դրա համար կիրառվում է այնպիսի ինտերկալատոր, որը տիրույթում է ԴՆԹ-ի հետ pH-ի այնպիսի միջակայքում, որում ԴՆԹ-ն գտնվում է երկշղթա վիճակում: Այդ դեպքում կոմպլեքսի պրոտոնացումը նույնն է, ինչ որ ԴՆԹ-ի հետ ցանկացած պարզ կատիոնի միացման պրոցեսը: Համաձայն Վիլսոնի և Լոպպի, հետազոտվող ռեակցիան կունենա հետևյալ տեսքը.



որտեղ $D-L$ -ը $\Gamma\text{ՆԹ}$ -ինտերկալատոր կոմպլեքսն է չպրոտոնացված վիճակում, $D-L+H^+$ -ը՝ նույն կոմպլեքսն է պրոտոնացված վիճակում: Տվյալ բանաձևը նկարագրող թերմոդինամիկ հավասարումն ունի հետևյալ տեսքը.

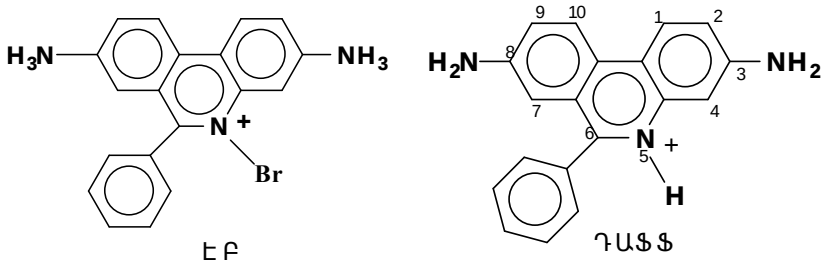
$$D-L \cdot (\Psi_c^* \cdot Na^+) + H^+ \rightarrow D-L-H^+ + \Psi_c^* \cdot Na^+ \quad (41)$$

որտեղ Ψ_c^* -ն $\Gamma\text{ՆԹ}$ -ի ինտերկալացիոն կոնֆորմացիայում մեկ ֆոսֆատի վրա կոնդենսացված նատրիումի իոնների միջին թիվն է: Տվյալ իոնական ուժի դեպքում (40)-ով նկարագրվող ռեակցիայի համար հավասարակշռության հաստատունը հանդիսանում է $\Gamma\text{ՆԹ}$ -լիգանդ կոմպլեքսից պրոտոնի դիսոցիացման հավասարակշռության հաստատունի (K_a) հակադարձ մեծությունը: Կապված լիգանդի pK_a -ի կախվածությունը նատրիումի իոնների կոնցենտրացիայից հետևյալն է.

$$\frac{-\partial \log K_a}{\partial \log [Na^+]} = \frac{\partial pK_a}{\partial \log [Na^+]} = -\Psi^*: \quad (42)$$

Քննարկվում է այնպիսի ինտերկալատոր, որը չի առաջացնում կոնֆորմացիոն փոփոխություններ և $\Gamma\text{ՆԹ}$ -ի հետ չի փոխազդում կոռպերատիվորեն, ընդ որում այդ համակարգը հանդիսանում է ինտերկալացիոն հատվածների համար որպես սպեցիֆիկ նմուշ, ուստի դա թույլ է տալիս անմիջապես չափել Ψ^* -ը և այն համեմատել հաշվարկված տվյալների հետ, ինչը կապահովի իոն-կոնդենսացիայի տեսության փորձարկման համար անկախ մեթոդ, որը չի պահանջում $\Gamma\text{ՆԹ}$ -լիգանդ կոմպլեքսների նկարագրության որևէ այլ մոդել: Ավելի վաղ կատարված աշխատանքներում ցույց էր տրված հակաիոնների կոնցենտրացիայի ազդեցությունը $\Gamma\text{ՆԹ}$ -ի հետ կապվող միացությունների pK_a -ի սպեցիֆիկ արժեքների կամ $\Gamma\text{ՆԹ}$ -լիգանդ փոխազդեցության վրա pH -ի սպեցիֆիկ էֆեկտների վրա: Այնուամենայնիվ, լիգանդի pK_a -ի վրա լուծույթի իոնական ուժի ազդեցության բացահայտման համար առավել հետաքրքրական են $\Gamma\text{ՆԹ}$ -ի հետ դասական ինտերկալատոր էթիդիումի բրոմիդի (ԷԲ) կամ նրա ածանցյալ միացության՝ 3,8-դիամի-

նո-6-ֆենիլ-ֆենանտրիդինի (ԴԱՖՖ) փոխազդեցության ուսումնասիրությունները pH-տիրման միջոցով:



Հաբորատոր աշխատանք 3 ***Աշխատանքի նպատակը***

- Սպեկտրի տեսանելի տիրույթում տարբեր pH-ով ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների լուծույթների կլանման սպեկտրների գրանցում:
- ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի հետ դրա կոմպլեքսների թթվային վիճակների համար աշխատանքային ալիքի երկարությունների որոշում, իզոբեստիկ կետի հայտնաբերում:
- ԴՆԹ-ի հետ ԷԲ-ի ինտերկալացիոն մեխանիզմով փոխազդեցության վրա իոնական ուժի ազդեցության որոշում,
- Լիզանդի pK_a -ի որոշում:

Փորձարարական մաս ***Անհրաժեշտ լուծույթներ***

Աշխատանքում օգտագործում են հետևյալ լուծույթները.

- հորթի ուրցագեղձի ԴՆԹ, ԷԲ (գերմաքուր), HCl (խիտ), NaCl, Na-ցիտրատ (քիմիապես մաքուր),
- նախնական պատրաստի լուծույթներ,
- 0.002; 0.004; 0.01; 0.02; 0.05 իոնական ուժերով լուծույթներ,
- ԴՆԹ-ի և ԷԲ-ի աշխատանքային լուծույթներ:

Լուծույթի համար	Լուծույթի իոնական ուժը	pK _a
1	0.002	
2	0.004	
3	0.01	
4	0.02	
5	0.05	

ԷԲ-ի և ԴՆԹ-ի աշխատանքային լուծույթները պատրաստվում են 3մլ ծավալով, որոնց ավելացվում է էթիլենդիամինտետրաացետատ՝ 10^{-5} մոլ/լ կոնցենտրացիայով: pH-ի թթվային արժեքներ ստանալու համար ԷԲ-ԴՆԹ կոմպլեքսների աշխատանքային լուծույթներին ավելացվում է 0.1ն HCl-ի լուծույթ:

ԴՆԹ-ի հետ լիզանդների փոխազդեցության վերլուծության համար պետք է հաշվի առնել ջրածնի իոնների ակտիվությունը՝ (a_{H^+} որը չափվում է փորձնականորեն և որոշվում է հավասարակշռության հաստատունը՝ (K_a)).

$$(K_a) = \frac{(D-L)a_{H^+}}{(D-L-H^+)} = K_a \gamma_{H^+} : \quad (43)$$

γ_{H^+} -ը ջրածնային իոնի ակտիվության գործակիցն է: pK_a-ի և K_a-ի հաշվարկված արժեքները համեմատական են ԴՆԹ-լիզանդ ասոցիացիայի համար որոշված հավասարակշռության գործակիցների հետ:

Տարբեր իոնական ուժերում լիզանդի կապման տիտրման ժամանակ պետք է ի հայտ գան իզոբետտիկ կետեր: Այդ կետերում կապված լիզանդի pK_a-ի արժեքների հաշվարկման համար կլանման արդյունքներից որոշվում են մարման մոլային գործակիցները (էքստինկցիայի գործակիցները) և կառուցվում է pH-ի կախվածությունը $\log \left[E_{H^+} / (E_a - E_{H^+}) \right]$ -ից ըստ.

$$pH = pK_a - \log \frac{(E_{H^+})}{(E_a - E_{H^+})}, \quad (44)$$

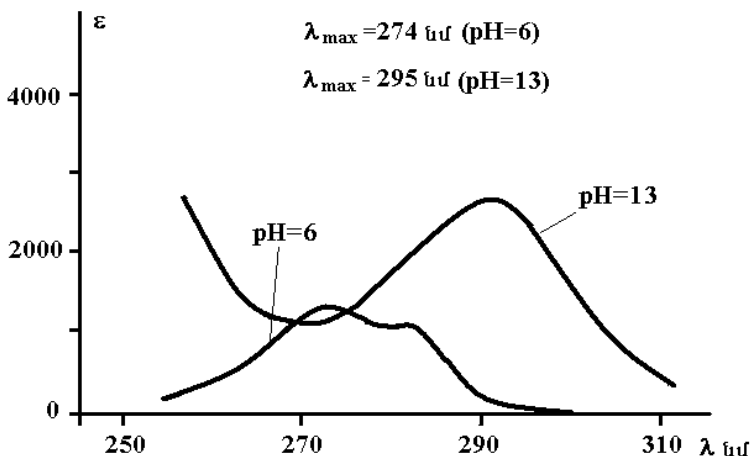
որտեղ E_a -ն ԴՆԹ-ի հետ կապված լիզանտիների իոնների էքստինկցիայի գործակիցն է, իսկ E_{H^+} -ը՝ ցանկացած pH-ի արժեքների դեպքում չափվող էքստինկցիայի գործակիցը: $pH < 5$ արժեքների դեպքում տեղի է ունենում իզոբեստիկ կետի անհետացում, ինչը, ամենայն հավանականությամբ, պայմանավորված է ԷԲ-ի 8-րդ դիրքում ամինոխմբի պրոտոնացմամբ: Ամինախմբերի պրոտոնացման համար pK -ն բավականին ցածր է ($pK=2.4$) ազատ լիզանտիների դեպքում, ԴՆԹ-ի հետ միացումը կարող է մեծացնել pK -ի արժեքը նշված երկու լիզանտիների համար, ուստի $pH > 5$ արժեքների դեպքում E_a և pK_a արժեքները կարելի է հաշվարկել՝ օգտագործելով փորձարարական տվյալները (E_{H^+} և pH արժեքները) $5 \leq pH \leq 10$ սահմաններում:

$pH < 5$ արժեքների դեպքում իզոբեստիկ կետի անհետացման մյուս պատճառը կարող է լինել ԴՆԹ-ի բնափոխումը: Սակայն 260նմ-ում սպեկտրալ վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ ԴՆԹ-ն գրեթե չի բնափոխվում $pH > 4$ արժեքների դեպքում: Ուստի pK_a -ի որոշման համար նպատակահարմար է հետազոտությունները իրականացնել $pH > 5$ դեպքում, քանի որ $0.02 \leq [Na^+] \leq 1,0$ պայմաններում կլանման սպեկտրների վրա առկա է իզոբեստիկ կետ: Հարկ է նշել, որ լիզանտի կոնցենտրացիան միշտ փոքր է նատրիումի իոնների կոնցենտրացիայից, ուստի ԴՆԹ-ի հետ կապման արդյունքում նատրիումի ազատ իոնների կոնցենտրացիայի զգալի փոփոխություններ գրեթե տեղի չեն ունենում:

7.4. ՍՊԻՏԱԿՈՒՑՆԵՐԻ pH-ՏԻՏՐՄԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Սպիտակուցների կառուցվածքի ուսումնասիրություններում անհրաժեշտություն է առաջանում որոշել ամինաթթուների իոնացվող կողմնային խմբերից պրոտոնների դիսոցիացման pK -ի արժեքները: Դա թույլ է տալիս որոշելու տվյալ ամինաթթվի տեղակայումը սպիտակու-

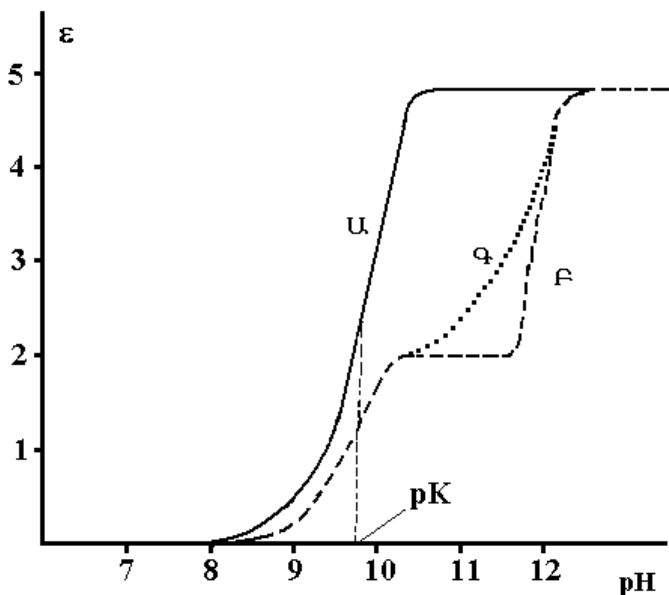
ցում, քանի որ որոշ ամփնաթթուների դեպքում տեղի է ունենում $\lambda_{\max}$ շեղում և ε -ի արժեքի փոփոխություն՝ կախված լուծիչի բևեռայնություն-



նից, ինչպես նաև pH-ից (նկ. 8):

Նկար 8. Թիրոզինի կլանման սպեկտրները pH=6 և pH=13 արժեքների դեպքում:

Նման դեպքերում սպիտակուցի կլանման սպեկտրները փոփոխության են ենթարկվում: Դա հիմնականում պայմանավորված է թիրոզինի կլանման բնութագրերի փոփոխությամբ: Մասնավորապես, եթե թիրոզինը գտնվում է սպիտակուցի մակերևույթին և pH-ի արժեքների մեծացմանը զուգընթաց իոնացվում է, ապա սպիտակուցի կլանման սպեկտրը շեղվում է դեպի ազատ թիրոզինի սպեկտրը (նկ. 9): Եթե թիրոզինային մնացորդները գտնվում են սպիտակուցի մոլեկուլի ներսում ոչ բևեռային միջավայրում (հիդրոֆոբ միջուկ), ապա սպիտակուցի և ազատ թիրոզինի կլանման սպեկտրները շեղված են մնում իրարից՝ pH-ի փոփոխության դեպքում: Հետևաբար, կլանման կորի միջնակետից տարված ուղղահայացի միջոցով կարելի է որոշել թիրոզինի pK-ի արժեքը տվյալ սպիտակուցում:



Նկար 9. Թիրոզինի տիտրման կորերը ε_{295} -ի դեպքում: Վարկածային սպիտակուցը պարունակում է թիրոզինային 5 մնացորդ: U – բոլոր 5 մնացորդները մակերեսային բաշխվածություն ունեն, F – 2 մնացորդ ունի մակերեսային բաշխվածություն, իսկ 3-ը՝ ներքին, ոչ բնեռային միջավայրում են տեղավորված և հետևաբար չեն տիտրվում, Q – 3 ներքին մնացորդները գտնվում են բնեռային միջավայրում և հասանելի են լուծիչին:

Լաբորատոր աշխատանք 4

Աշխատանքի նպատակը

- Ստանալ թիրոզինի կլանման սպեկտրները pH=6 և pH=13 արժեքների դեպքում:
- Ստանալ սպիտակուցի կլանման սպեկտրը pH-ի թթվային և հիմնային արժեքների տիրույթներում:
- Որոշել սպիտակուցի pK-ի արժեքները pH-ի թթվային և հիմնային տիրույթներում:

- Որոշել թիրոզինի մնացորդների հնարավոր տեղակայումը սպիտակուցի մոլեկուլում:

Աշխատանքի համար օգտագործել են հետևյալ լուծույթները .

- մարդու արյան շիճուկային ալբումին,
- թիրոզին,
- HCl (խիտ) NaOH,
- նախնական պատրաստի լուծույթներ:

Սպիտակուցի և թիրոզինի աշխատանքային լուծույթները պատրաստվում են 3մլ ծավալով: pH-ի թթվային և հիմնային արժեքներ ստանալու համար սպիտակուցի և թիրոզինի աշխատանքային լուծույթներին ավելացվում է 0.1ն HCl-ի լուծույթ և սպեկտրաֆոտոմետրի միջոցով ստացվում է դրանց կլանման սպեկտրը ալիքի երկարության փոփոխության $220 \leq \lambda \leq 300$ նմ տիրույթում: Այնուհետև կառուցվում է կլանման կախվածության կորը pH-ի փոփոխության թթվային և հիմնային տիրույթներում: Այդ կորից pH-ի առանցքին տարված ուղղահայացի միջոցով որոշվում է թիրոզինի և սպիտակուցի pK-ի արժեքները:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Վարդանյան Պ.Հ., Նուկլեինաթթուների կենսաֆիզիկա: Բուհական ուսումնական ձեռնարկ, Հայրապետ հրատ., Երևան, 2010, 212 էջ:
2. Кантор У., Шиммел П., Биофизическая химия. В 3-х кн. М.: Мир. 1985.
3. Маршелл Э., Биофизическая химия. В 2-х кн. М.: Мир. 1981.
4. Рубин А.Б. Биофизика. В 2-х кн. Учебник. 3-е изд. М.: Изд-во Московского госуниверситета и изд-во Наука. 2004.
5. Фрайфелдер Д., Физическая биохимия. М.: Мир. 1980.
6. Краткий справочник физико-химических величин // Под ред. А.А. Равделя, А.М. Пономаревой. СПб.: Иван Федоров, 2003.
7. Лурье Ю.Ю., Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1965.
8. Индикаторы: В 2 т. Под ред. Э. Бишоп; Пер. С англ. И.В. Матвеевой. М.; Мир, 1976. Т. 1.
9. Миронов И.В., Основы оптических методов анализа: Учеб. пособие. Новособ. гос. ун-т. Новосибирск, 1991.
10. Практикум по физической химии. Под ред. И.В. Кудряшова. М.: Высш. Шк., 1986.
11. Бахшиев Н.Г., Введение в молекулярную спектроскопию: Учеб. пособие. Л.: Изд-во ЛГУ, 1987.
12. Браун Д. и др., Спектроскопия органических веществ. Д. Браун, А. Флой, М. Сейнзбери; Пер. с англ. А.А. Кирюшкина. М.: Мир, 1992.
13. Лукьяненко С.В., // Спектр. М.: АСТ, 2002.
14. Хольцбежер З., Дивиш Л., Крал М. и др., Органические реагенты в неорганическом анализе. Пер. с чеш. З.З. Высоцкого. М.: Мир, 1979.

Պ.Հ.Վարդևանյան, Ա.Պ.Անտոնյան,
Մ.Ա.Փարսադանյան

**ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱՖԻԶԻԿԱՅԻ ԼԱԲՈՐԱՏՈՐ
ԱՇԽԱՏԱՆՔՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՄԵԹՈՂԱԿԱՆ ՁԵՌՆԱՐԿ**

ՄԱՍ 2

***ՄԱԿՐՈՄՈԼԵԿՈՒԼՆԵՐԻ ՀԵՏ ԼԻԳԱՆԴՆԵՐԻ ԿՈՄՊԼԵՔՍՆԵՐԻ
pK-ի ՈՐՈՇՈՒՄԸ: ԹԹՎԱՀԻՄՆԱՅԻՆ ՀԱՎԱՍՏԱՐԱԿՇՈՒԹՅԱՆ
ՎԵՐԼՈՒԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄՊԵԿՏՐԱՖՈՏՈՄԵՏՐԻԱՅԻ ՄԵԹՈՂՈՎ***

Համակարգչային ձևավորումը՝ Կ. Չալաբյանի
Կազմի ձևավորումը՝ Ա. Ստեփանյանի
Հրատ. սրբագրումը՝ Լ. Հովհաննիսյանի

Չափսը՝ 60x84 1/16: Տպ. մամուլ 4:
Տպաքանակը՝ 100 օրինակ:

ԵՊՀ հրատարակչություն

ք. Երևան, 0025, Ալեք Մանուկյան 1

