1946 г. Т. XXIX, вып. 3—4

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

СПЕКТРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ

Э. В. Шпольский

Тому, кто наблюдает за развитием современного естествознания, ясна обнаружившаяся в недавнее время здоровая тенденция: атаковать сложные проблемы с разных сторон, подходить к их разрешению объединёнными усилиями представителей различных специальностей. Физика Аристотеля была наукой о природе в целом. Постепенно, однако, накопление огромного количества фактов, углубление и усложнение методов исследования повело ко всё более и более узкой специализации. Во второй половине XIX столетия только гений Гельмгольца был способен одновременно охватить математику, механику, физику, физиологию, медицину, теорию искусства (музыку и живопись). В первом тридцатилетии XX столетия мы наблюдаем столь дробную специализацию, что даже представители одной науки, например физики-теоретики и экспериментаторы, иногда перестают друг друга понимать. Вместе с тем ясной становится нецелесообразность попыток решения сложнейших проблем естествознания, особенно биологии, в которых запутанным образом переплетаются самые разнообразные факторы — физические, химические, чисто биологические — усилиями одних только «узких» специалистов.

Если, однако, разветвлённость и специализированность современного естествознания настолько велика, что один человек не в состоянии быть хозяином в нескольких дисциплинах и владеть всеми существующими методами исследования, то отсюда выход только в том, чтобы нескольким специалистам объединиться для совместного решения одной проблемы. И вот обнаруживается новая черта: появляются работы с тремя, четырьмя, пятью авторами — представителями различных специальностей.

Общеизвестно, насколько тонки современные экспериментальные методы физики. Электронная микроскопия, выросшая на почве глубоких теоретических построений, не имевших вначале никакого отношения к задачам экспериментальной техники, позволяет видеть отдельные большие молекулы; оптический спектрограф и спектральный монохроматор в соединении с фотоэлементом дают возможность

в короткие промежутки времени, измеряемые минутами, производить сложные анализы, которые требовали раньше дней или недель, а иногда и вовсе были неосуществимы; радиоактивные индикаторы, счётчики Гейгера и ионизационные камеры позволяют наблюдать процессы в «невесомых» количествах вещества и т. д. и т. д. Было бы по меньшей мере неразумно не использовать всех этих могущественных средств для решения глубоких и захватывающих проблем живого вещества или благородных задач исцеления больного.

Среди разнообразных физических методов исследования наиболее широкое применение в биологии и биохимии *) получили за последнее время методы оптические, а среди оптических методов наиболее разносторонние возможности открывает спектроскопия. Используются все виды спектров и все способы их возбуждения.

Полный и систематический обзор разнообразных применений спектроскопии в биологии мог бы служить предметом большой монографии. Задача настоящей статьи — дать лишь иллюстрации на нескольких примерах применения спектров поглощения в биологии.

I

Остановимся прежде всего коротко на некоторых общих вопросах, относящихся к спектрам поглощения сложных органических соединений.

Давно известно, что спектр поглощения сложной молекулы в основном определяется не всей молекулой в целом, но некоторой определённой её частью или несколькими частями. Такие группы атомов, от которых главным образом зависит положение и величина максимумов поглощения, называются хромофорными группами. Существование их прежде всего было установлено у красителей, т. е. — веществ, поглощающих в видимой части спектра, — откуда происходит и самое название. Тоже, однако, имеет место и у веществ, поглощающих в инфракрасной и в ультрафиолетовой части спектра. При этом, как и следовало ожидать, поглощение хромофоров зависит не только от природы атомов, входящих в группу, но и от природы и распределения связей.

В инфракрасной части спектра поглощение хромофоров определяется частотами колебаний (имеются в виду валентные колебания)

*) Большой обзор Дж. Луфбурова (около 10 печатных листов и указатель оригинальной литературы, содержащий 1203 работы) «Пограничные проблемы биологии и физики», помещённый в журнале Reviews of Modern Physics,содержит следующие отделы: I. Изотопы, как биологические индикаторы. II. Изучение биохимических веществ, тканей и т. п. при помощи рентгеновых лучей. III. Применение инфракрасных, рамановых, видимых и ультрафиолетовых спектров к биологическим проблемам. IV. Применение ультрацентрифуги к биологии и биохимии. V. Новейшее развитие микроскопии (ультрафиолетовая и электронная микроскопия). VI. Различные другие методы.

и вращения. Характерные частоты обнаруживаются лишь с малыми изменениями в различных молекулах, содержащих данную хромофорную группу. Примерами могут служить хромофоры [1]

	ν
$>C—H$	2910 $см^{-1}$
$>C=C<$	1630 $см^{-1}$
$—C—C—$	990 $см^{-1}$
$>C=O$	1722 $см^{-1}$
$\equiv C—O—$	1034 $см^{-1}$

В видимой и ультрафиолетовой части спектра поглощение определяется электронными переходами. И здесь также во многих случаях удаётся установить хромофорную группу, как это впервые было показано на обширном материале систематическими исследованиями Анри [2].

Так, например, присутствие карбонильной группы

$$>C=O$$

обусловливает появление в ультрафиолетовом спектре очень определённой, хотя и сравнительно слабой полосы с максимумом около 2700—2800 Å. Хромофорный характер этой группы виден из следующей таблицы, где приведены максимумы поглощения и молярные коэффициенты экстинкции *) для различных кетонов.

	λ в Å	ε
Ацетон	2706	15,8
Метилэтилкетон	2703	16,2
Метилбутилкетон	2795	19,4
Метилгексилкетон	2778	27

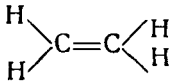
Другим примером хромофоров может служить этиленовая группа

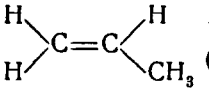
$$>C=C<.$$

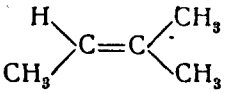
Свойства этого хромофора очень интересны. У этилена полоса поглощения лежит в далёкой ультрафиолетовой части спектра с максимумом у 1645 Å. При замещении водородных атомов радикалами

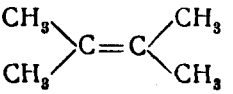
*) Интенсивность поглощения характеризуется обычно так называемым молярным коэффициентом экстинкции ε, входящим в формулу $I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon cl}$, где I — интенсивность света, прошедшего через слой l *см* вещества, молярная концентрация которого равна c.

(алкилами) полоса закономерно смещается в длинноволновую сторону, как это видно из следующих примеров[3]:

Этилен  1645—1700

Пропилен  1600—1850 (max 1730)

Триметилэтилен  2200

Тетраметилэтилен  2320

Бензольное кольцо

также даёт очень характерную группу полос, которая сохраняется и у производных бензола. В этой группе полос можно распознать наложение на электронный переход определённых колебательных состояний.

Хромофорчые свойства тех или иных групп атомов в ультрафиолетовой части спектра, повидимому, обусловлены наличием в этих группах слабо связанных или свободных электронов. Это особенно ясно видно в случае бензольного кольца. Известно, что шесть электронов бензольного кольца (так называемые π-электроны) ведут себя как свободные электроны, обусловливая между прочим очень большую величину диамагнитной проницаемости молекулы бензола. Можно отметить также, что низший ионизационный потенциал и химическое поведение молекулы в сущности определяются теми же несвязанными электронами хромофоров, откуда видно, насколько существенно для химии изучение ультрафиолетовых спектров абсорбции.

Если в состав молекулы входит две или несколько хромофорных групп, то результат оказывается различным в зависимости от характера связи между хромофорами и от их расположения в молекуле. В некоторых случаях, несмотря на присутствие двух хромофоров, в спектре поглощения обнаруживается абсорбция, характерная только для одного из них. Так, например молекула, бензальдегида $C_6H_5\overset{H}{>}CO$ содержит два хромофора: карбонил $>CO$ и фенильную группу C_6H_5 (бензольное кольцо). Несмотря на это бензальдегид обнаруживает только спектр абсорбции, расположенный между 2700 и 2400 Å

и характерный для бензольного кольца; присутствие карбонильной группы никак не сказывается на спектре абсорбции, так как в области 2 800 Å никакой абсорбции не наблюдается.

С другой стороны, очень часто присутствие двух или нескольких хромофоров определённо проявляется в спектре абсорбции и притом различным способом. В тех случаях, когда между хромофорами располагаются углеродные атомы с двойной связью C=C или по крайней мере две простых связи C—C—C, — спектр поглощения *аддитивно складывается из спектров поглощения отдельных хромофоров*. Иная картина получается в том случае, когда хромофоры со связью C=C разделены только одной простой связью C—C. Например, два этиленовых хромофора могут быть связаны так

$$>C=C-C=C<.$$

Такого рода ненасыщенная связь называется конъюгированной. Хромофоры, соединённые конъюгированными связями, могут образовывать длинные цепи

$$>C=C-C=C-C=C\ldots-C=C<$$

Они могут образовывать также и замкнутые кольца. В частности, бензольное кольцо можно рассматривать как замкнутую на себя последовательность конъюгированных связей.

Появление конъюгированных связей ведёт к чрезвычайно резким изменениям в спектре поглощения. При последовательном увеличении числа таких связей весь спектр сдвигается в длинноволновую сторону и при накоплении достаточного числа их — перемещается из крайнего ультрафиолета в видимую часть. Одновременно с этим интенсивность абсорбции, измеряемая молярным коэффициентом экстинкции ε, сильно возрастает.

Рассмотрим несколько подробнее свойства важных для биологии линейных молекул с конъюгированными связями. Во всех этих молекулах главным хромофором служит полиеновая цепочка

$$-(HC=CH)_n-,$$

к которой на концах могут присоединяться различные группы. Изучены, например[4], ряды полиен-альдегидов:

$$CH_3-(HC=CH)_n-CHO \quad n=1,\ 2,\ 3,$$

полиен-карбоновых кислот:

$$CH_3-(HC=CH)_n-COOH \quad n=1,\ 2,\ 3,\ 4,$$

дифенил-полиенов

$$C_6H_5-(HC=CH)_n-C_6H_5 \quad n=1,\ 2,\ 3,\ 4,\ 5,\ 6,\ 7.$$

Типичным примером таких молекул может служить последний ряд дифенил-полиенов.

Спектры поглощения молекул этого ряда приведены на рис. 1. Описанное выше смещение спектра при увеличении числа конъюгированных связей видно здесь очень ясно.

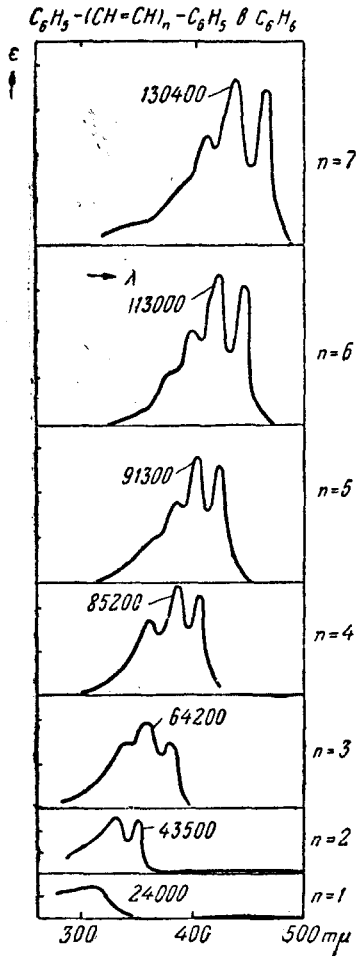


Рис. 1. Спектры поглощения дифенил-полиенов (по Куну, Гауссеру и Смакуле).

Насколько закономерно это смещение, можно судить из следующих интересных фактов. Если отложить по оси абсцисс число этиленовых групп, а по оси ординат молярный коэффициент экстинкции ε_{max}, то получается прямая (рис. 2). Линейная зависимость получается и в том случае, если отложить по оси абсцисс обратную величину квадратного корня из приведённой массы молекулы (рис. 3), а по оси ординат — частоту главного максимума.

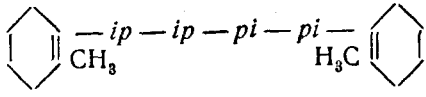
Принимая во внимание известную связь между частотой колебаний линейного осциллятора и его приведённой массой, можно истолковать этот результат как указание на то, что главная полоса возникает в результате наложения колебаний полиеновой цепочки на электронный переход.

С биологической точки зрения большой интерес представляют так называемые каротиноиды, молекулы которых также имеют цепочечный характер. Хорошо известный оранжево-жёлтый пигмент, встречающийся в листьях растений и играющий какую-то, ещё не выясненную роль в процессе фотосинтеза, — является одним из примеров. В действительности этот пигмент, обычно называемый просто каротином, представляет собой смесь трёх химически изомерных веществ: α-, β- и γ-каротина. Пигмент, окрашивающий томаты — ликопин — также принадлежит к числу каротиноидов. Спектры поглощения различных каротиноидов приведены на рис. 4. Как видно, они обнаруживают большое сходство с только что рассмотренными спектрами дифенил-полиенов. Причина этого ясна. Для структуры каротиноидов характерна длинная цепь, составленная из дегидрированных изопре-

новых звеньев

$$-CH=\underset{\underset{CH_3}{|}}{C}-CH=CH-$$

Если такое звено обозначить через *ip*, то структура β-каротина представится в виде:



Приведённые формулы показывают, что длинная цепь, характеризующая структуру β-каротина, в основном, как и во всех полиенах,

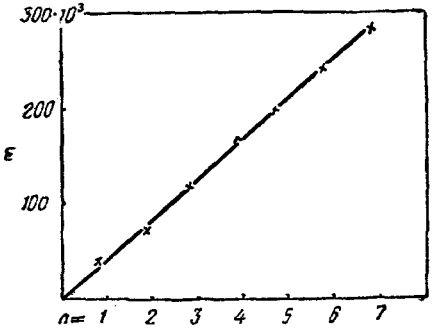


Рис. 2. Зависимость молярного коэффициента экстинкции дифенил-полиенов от числа этиленовых групп.

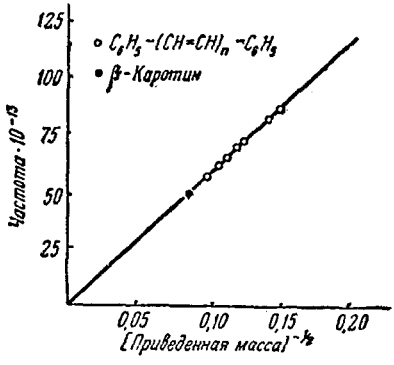


Рис. 3. Зависимость частоты главного максимума поглощения дифенил-полиенов от приведённой массы молекулы.

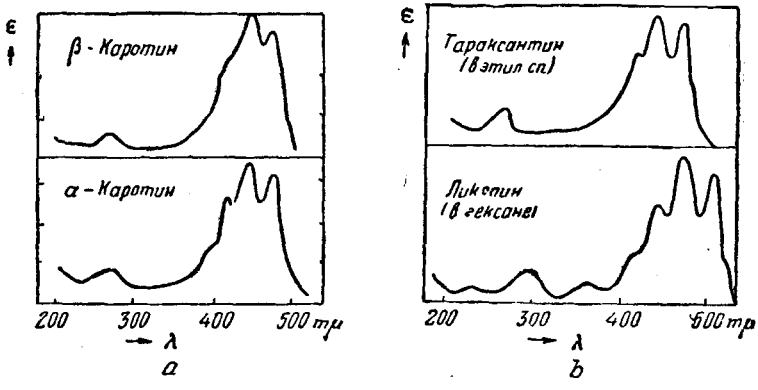


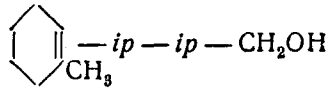
Рис. 4. Спектры поглощения каротиноидов (по Смакуле).

образована путём накопления этиленовых хромофоров в конъюгированной связи.

Следующий факт показывает, что поглощение β-каротина обусловлено именно этиленовыми звеньями: если рассчитать приведённую массу молекулы β-каротина и нанести на график рис. 3 значение для обратной величины квадратного корня из неё и частоту главной полосы абсорбции, то соответствующая точка ложится на прямую для дифенил-полиенов.

Этот факт имеет и существенное практическое значение. В самом деле, он показывает, что абсорбция света может быть рассчитана по числу определённых связей, наподобие того как это имеет место в случае молярной рефракции. Если принять во внимание, что для установления абсорбции нередко оказывается достаточным 0,1—0,5 *мг* вещества, то значение этого метода для решения сложных структурных проблем органической химии и биохимии становится очевидным.

Биологическое значение каротиноидов не ограничивается их ролью в листе растения. Известно, что витамин *A* не встречается в растительной пище, но вырабатывается в организме животного из некоторого вещества, служащего исходным материалом для его образования (провитамин). Таким провитамином является как раз β-каротин. Это можно заключить уже из того, что молекула витамина *A* по своей структуре в основном представляет собой просто половину симметричной молекулы β-каротина.



(Витамин *A*)

Отсюда — следующая картина образования витамина *A*. В организме животных β-каротин расщепляется на две равные части и после присоединения воды к каждой части даёт две молекулы витамина *A* *). Эта схема подтверждается следующим наблюдением: если кормить животное β-каротином, то в спектре поглощения экстракта его печени обнаруживается полоса витамина *A*.

Исследование спектра поглощения пигмента, окрашивающего зрительный пурпур (родопсин), показало, что он также относится к числу каротиноидов и что между наличием в организме витамина *A* и восстановлением зрительного пурпура имеется прямая связь. Отсюда — ряд чисто практических выводов, относящихся к роли витамина *A* в ночном зрении, и т. п.

Теория поглощения света сложными, в частности биологически важными молекулами, за последнее время привлекает к себе возрастающее внимание физиков-теоретиков. Уже Анри пытался подойти к расчёту спектров поглощения сложных молекул при помощи сооб-

*) Попытки осуществления такой реакции in vitro не дали положительного результата. Однако, она, повидимому, может итти фотохимически. Это следует из того, что в спектре поглощения β-каротина имеется размытая абсорбция в области максимума поглощения витамина *A*.

ражений, основанных на классической теории дисперсии, и получил при этом ряд обнадёживающих результатов.

Разумеется, адэкватный аппарат для теории молекул даёт не классическая, но квантовая механика. Ряд квантово-механических работ, посвящённых спектрам поглощения сложных молекул (таковы, например, работы Склара[6] по теории электронных спектров поглощения бензола и его производных, Мелликена[5] по теории поглощения этилена и его производных и др.), появившихся за последнее время, является доказательством интереса теоретиков к этим важным проблемам. Впрочем, большое число частиц, входящих в сложные молекулы, позволяет думать, что и чисто классические соображения здесь могут дать ценные результаты (как это имеет место, например, в случае атомного ядра).

II

Перейдём теперь к рассмотрению отдельных примеров применения спектроскопии в биологии. Одним из самых ярких примеров является история исследования антирахитического витамина — витамина *D*. Было известно, что неправильный кальциевый и фосфорный обмен ведёт к заболеванию — рахиту, — которому подвержены дети, а также молодые животные и птицы. Опыты, поставленные с молодыми крысами, показали, что при одностороннем питании в отсутствии витамина *D* у животных обнаруживается тяжёлое заболевание, выражающееся в недостаточной кальцинации костей. Заболевание можно было излечить соответствующей диетой, но оно излечивалось также при освещении животных ультрафиолетовым светом. Очевидно, в коже животного содержится в ничтожных количествах вещество (так называемый провитамин *D*, его химический состав в настоящее время известен), которое при освещении испытывает фотохимическую реакцию, давая витамин *D*, а этот последний потоком крови разносится по всему организму.

При дальнейшем исследовании оказалось, что для излечения достаточно освещать ультрафиолетовыми лучами пищу животных — ту самую безвитаминную пищу, которая вызывала заболевание. Отсюда надо было заключить, что и в этой пище присутствует провитамин, фотохимически превращающийся в витамин *D*. Американский физиолог Гесс, занимавшийся этими исследованиями, высказал гипотезу, согласно которой этим провитамином является холестерин, имеющийся в коже крыс, а также и в их безвитаминной пище. Основанием для этого, между прочим, служил тот факт, что холестерин при освещении ультрафиолетовым светом испытывает фотохимическую реакцию: его прозрачность для длин волн около 300 *mμ* после освещения несколько возрастает, он, следовательно, «выцветает». Желая выяснить этот вопрос до конца, Гесс обратился к гёттингенскому химику Виндаусу, известному своими работами в области стеринов. Будучи убеждён в том, что провитамином *D* является холестерин,

Гесс имел намерение при помощи Виндауса выяснить химическую природу самого витамина *D*. Однако опыты, поставленные Виндаусом, не подтвердили тождества провитамина *D* с холестерином. Тогда в разрешении проблемы принял участие физик Р. Поль, который точно измерил при помощи фотоэлектрического спектрофотометра спектр поглощения холестерина до и после освещения. Оба спектра оказались существенно различными (рис. 5), в то время как на монотонно возрастающую в сторону коротких волн кривую в спектре неосвещённого холестерина явно накладывались три полосы α, β, γ, в освещённом — они отсутствовали. Вычитая кривую *б* из кривой *а*, Поль получил грубую картину этих полос. Кроме того, он установил, что прозрачность освещённого холестерина у $\lambda = 280$ *mμ* более чем вдвое превосходит прозрачность холестерина неосвещённого. Отсюда можно было заключить, что около половины холестерина испытало фотохимическое превращение. Но это противоречило результатам Виндауса, который на основании химических опытов утверждал, что превращение могло испытать не более нескольких десятых процента. Оставалось сделать вывод, что прежнее отождествление холестерина с провитамином *D* было ошибочным и что полосы, полученные Полем путём вычитания кривых, принадлежат другому веществу, примешанному в ничтожном количестве к холестерину и являющемуся собственно провитамином *D*. Его поглощение в таком случае должно было быть настолько сильным, что Поль условно назвал его «красителем». Путём десятикратной дестилляции в высоком вакууме Виндаусу удалось обогатить холестерин этим веществом примерно вдвое, после чего Поль мог уже получить его спектр более точно.

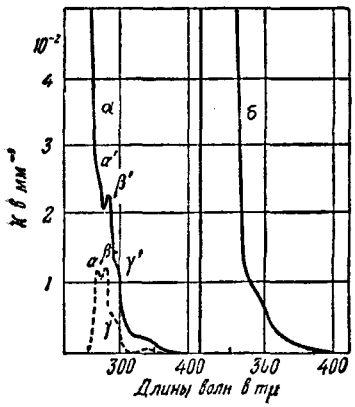


Рис. 5. Спектры поглощения холестерина: *а* — до освещения, *б* — после освещения. Пунктирная кривая получена путём вычитания из кривой *а* кривой *б* и представляет собой спектр поглощения вещества, примешанного к холестерину и испытывающего фотохимическое превращение при освещении (по Полю, Naturwiss. 15, 435, 1927, figs. 3 и 4).

На основании химических данных Виндаус предположил, что искомым провитамином является другой стерин — именно эргостерин. Сравнение спектров обоих веществ подтвердило это предположение (рис. 6). Таким образом, проблема была решена быстро и определённо благодаря применению спектроскопических методов*). По этому

*) *Последующие работы обнаружили значительно более сложную картину.* В частности было установлено, что другое вещество (7-дегидрохоле-

поводу Виндаус в одной из своих лекций заметил, что, вероятно, химики, пользуясь своими методами, получили бы тот же результат, но, тогда как благодаря применению физических методов и участию опытных физиков вопрос был выяснен в течение нескольких дней, химикам и физиологам, для которых индикаторами могли служить только опыты на животных, потребовалось бы для этого не менее года!

III

Рассмотрим теперь некоторые спектральные свойства двух окрашенных веществ, имеющих самое важное значение для сохранения жизни на земле: красящего вещества крови — гемоглобина — и зелёного красящего вещества листа растения — хлорофилла. В высшей степени замечательно, что оба эти вещества имеют очень близкую структуру. Гемоглобин представляет собой стехиометрическое соединение красителя — гемина — с белковым веществом — глобином. Весьма вероятно, что и в состав хлорофилла наряду с красителем входит также и белок. Однако этот вопрос в настоящее время не может считаться решённым окончательно (см. ниже). Поскольку речь идёт о красящих, т. е. абсорбирующих частях гемоглобина и хлорофилла, то оба эти пигмента имеют один и тот же хромофор — так называемое порфиновое кольцо. Элементом структуры этого кольца является пиролловое ядро

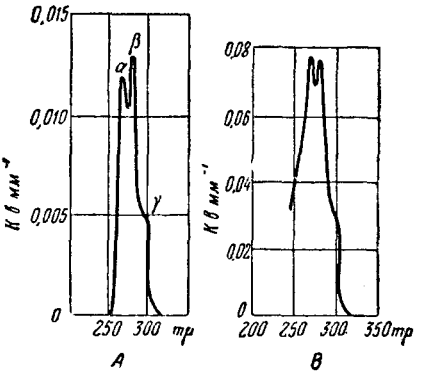


Рис. 6. Слева спектр поглощения провитамина *D*, примешанного к 1%-ному алкогольному раствору холестерина. Справа — спектр поглощения 0,001% раствора эргостерина в алкоголе. Небольшое различие этих спектров обусловлено тем, что правый спектр получен косвенным путём (вычитанием кривых).

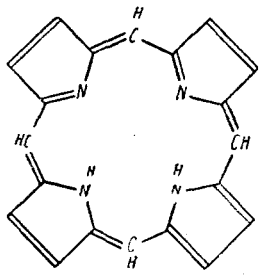
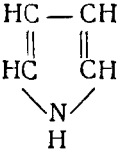


Рис. 7. Структура порфина.



В молекуле порфина (это соединение было синтезировано Фишером) четыре таких ядра, соединённые мостиками из метиновых групп

стерин) имеет тот же спектр поглощения, что и эргостерин, и также при освещении даёт антирахитическиактивный продукт. См. по этому поводу монографию Мортона (литература II, А).

$=CH-$, образуют кольцо, изображённое на рис. 7. В этом кольце чередуются 9 двойных и 9 простых связей, образуя замкнутую на себя последовательность конъюгированных связей, наподобие того как это имеет место у бензола. На схематическом рис. 8 эта замкнутая система в двух модификациях обведена чёрной линией.

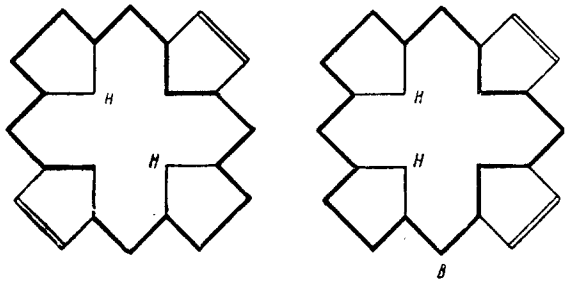


Рис. 8. Схема структуры порфинового хромофора.

Порфин, как и линейная конъюгированная цепь в каротиноидах, является важнейшим биологическим хромофором. Производные порфина называются порфиринами. Комплексное соединение одного из порфиринов с железом и есть гемин; комплексное соединение другого

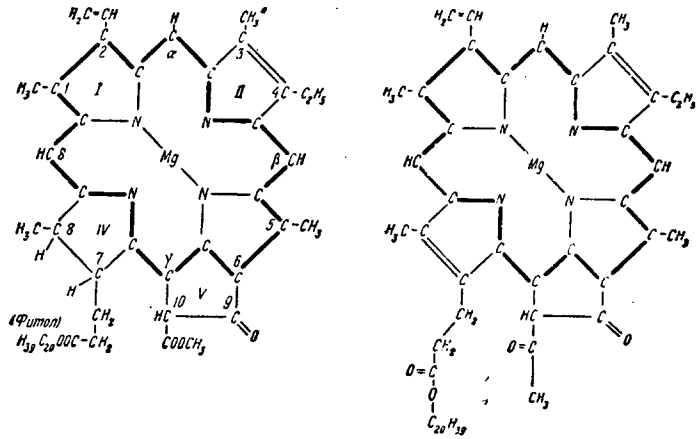


Рис. 9. Структура протохлорофилла и хлорофилла *а*.

порфирина с магнием образует протохлорофилл. Из протохлорофилла, путём присоединения двух водородных атомов в IV пирроловом ядре (см. рис. 9), возникает хлорофилл *а*; хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *а* только тем, что отмеченная звёздочкой на рис. 9 группа CH_3 заменяется группой CHO. Существенно то, что во всех этих случаях порфиновое кольцо остаётся нетронутым.

Спектры поглощения различных порфиринов, так же как и исходного вещества порфина, изучены Штерном и его сотрудниками. Все эти спектры имеют весьма типичную структуру. Характерными являются четыре полосы между 500 и 700 $m\mu$ и очень сильная полоса в сине-фиолетовой части спектра. Интересный анализ спектра поглощения порфина и его производных в связи со структурно-химическими данными недавно произведён Е. Рабиновичем[11], который установил таким путём схему уровней энергии этих важных молекул. На рис. 10 приведена схема для порфина. Как видно, оранжево-жёлтая система полос обусловлена переходами из основного состояния x к различным колебательным состояниям более высоко расположенного электронного возбуждённого состояния A, тогда как сине-фиолетовая полоса возникает при переходах к нулевому колебательному состоянию следующего электронного состояния B.

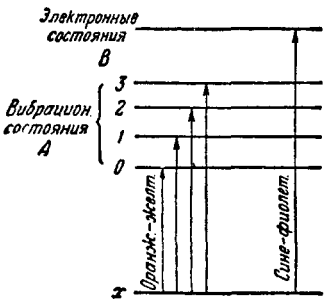


Рис. 10. Схема энергетических уровней молекулы порфина по Е. Рабиновичу.

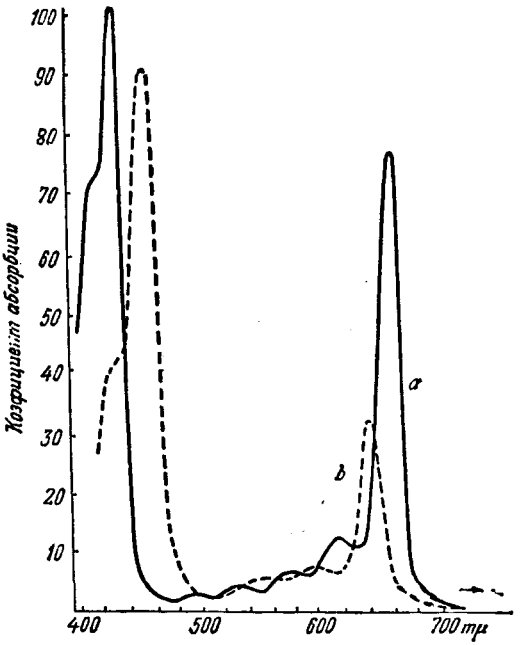


Рис. 11. Спектры поглощения хлорофилла a и b (по Цшейле).

На рис. 11 приведены спектры поглощения обеих модификаций хлорофилла[12]. Как видно, кроме полос, характерных для порфина и порфиринов, здесь имеется ещё сильная красная полоса, имеющая основное значение для фотосинтеза. Эта полоса не характерна ни для порфина, ни для порфиринов. Е. И. Рабинович обратил внимание на то, что возникновение этой полосы является следствием уже упомянутого присоединения двух лишних добавочных водородных атомов в IV пирроловом ядре. Присоединение ещё двух водородных атомов

во II пиролловом ядре превращает хлорофилл в бактериохлорофилл и вместе с тем ведёт к появлению ещё одной полосы, расположенной в инфракрасной части спектра с максимумом у 800 *mμ*. Благодаря наличию этой полосы, бактерии оказываются способными к фотосинтезу под действием инфракрасных лучей (подробнее см. 29).

Спектр поглощения гемоглобина и его производных изучался в огромном количестве работ, главным образом с практической целью, для определения содержания гемоглобина в крови (см. литературу в VIII). Детальная теоретическая интерпретация этого спектра в связи со структурой гемоглобина и со спектрами поглощения соответствующих порфиринов, насколько нам известно, ещё не выполнена. Тем не менее общая структура спектра, обусловленная наличием порфинового скелета, сохраняется и здесь. На рис. 12 приведён спектр поглощения окисленной формы гемоглобина—оксигемоглобина (HbO_2). Полосы α и β, расположенные в жёлто-зелёной части спектра, обычно используются в практике и имеют максимумы у 576 и 540 *mμ*. Эти максимумы явно принадлежат порфиновому скелету, так как они точно воспроизводят II и III максимумы спектра поглощения протопорфирина (576 и 538 *mμ*), из которого происходит гемин. Полоса γ также принадлежит порфиновому скелету и соответствует переходу $X \rightarrow B$ (рис. 10). С другой стороны, полоса протопорфирина с максимумом у 504 *mμ* не наблюдается ни у оксигемоглобина, ни у восстановленного гемоглобина (Hb), а вместо красной полосы протопорфирина 631 *mμ* у гемоглобина наблюдается в красной части полоса у 750 *mμ*. Дублетная полоса $\gamma' \pm HbO_2$ как-то связана с присутствием атома железа, так как у протопорфирина она не наблюдается. Наконец, ультрафиолетовая полоса у 275 *mμ*, очевидно, принадлежит белковой части молекулы оксигемоглобина — глобину так как все циклические аминокислоты имеют максимумы около этой длины волны.

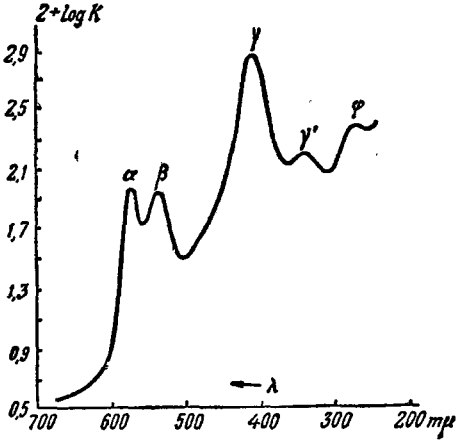


Рис. 12. Спектр поглощения оксигемоглобина.

IV

Все эти детальные данные о структуре молекул и спектрах относятся к веществам — хлорофиллу и гемоглобину, которые изучаются в экстрагированном из их естественного состояния виде — в

растворах. Не следует, однако, забывать, что как гемоглобин, так и хлорофилл встречаются в природе и выполняют свои важнейшие функции в особых микроскопических структурных единицах: первый — в красных кровяных тельцах — эритроцитах, второй — в хлоропластах. Несомненно, что операции, связанные с экстрагированием, могут видоизменять и самые вещества. Поэтому вполне уместен вопрос, тождественны ли те вещества, которые мы изучаем в растворах с веществами в естественном состоянии?

Что касается гемоглобина, то в процессе развития биохимии ответы на этот вопрос давались различные. В семидесятых годах прошлого столетия пользовалась популярностью теория, выдвинутая крупнейшим специалистом в этой области Гоппе-Зейлером. Согласно этой теории, гемоглобин в растворе и гемоглобин внутри эритроцита — два совершенно различных вещества. Для того чтобы их не смешивать, Гоппе-Зейлер предложил для них даже разные названия: артерин и флебин — для вещества внутри эритроцита; гемоглобин — для вещества в экстракте или в кристаллическом состоянии. Однако, факты, на которые ссылался Гоппе-Зейлер в качестве подкрепления своей теории, получили впоследствии иное, более правдоподобное объяснение, и теория была оставлена.

Неожиданно, однако, она возродилась вновь совсем недавно и как раз в связи со спектроскопическими работами. В промежуток времени от 1930 до 1938 г. появился ряд работ канадского биохимика Адамса и его сотрудников [13], [14], [15], которые обнаружили, что в то время как в прозрачном растворе гемоглобина все три характерные для его спектра полосы α, β и γ наблюдаются всегда, полоса γ исчезает, когда гемоглобин находится внутри эритроцита. При этом речь шла о полном исчезновении полосы, а не о её смещении в невидимую часть спектра, которое Адамс должен был заметить, если бы оно существовало, так как применялся кварцевый спектрограф и фотографирование спектра. Пытаясь объяснить это явление физическими причинами, Адамс произвёл ряд дополнительных экспериментов, однако, ни один из них не дал искомого объяснения. Более того, специальный опыт показал, что когда чистый гемоглобин выкристаллизовывается из раствора в виде тончайшей, не оседающей взвеси, полоса γ наблюдается. Получалось, таким образом, что оптическая неоднородность системы (взвесь микрокристалликов в бесцветной прозрачной среде) не влияет сама по себе на спектр поглощения, когда взвешенными частицами заведомо являются кристаллики гемоглобина. Но в том случае, когда взвесь состоит из эритроцитов, полоса отсутствует. Отсюда Адамс сделал, казалось бы, неизбежный логический вывод: вещество, находящееся внутри эритроцита, отличается от гемоглобина по своей химической природе. Именно Адамс выставил гипотезу, согласно которой внутри эритроцита возникает неустойчивое соединение между гемоглобином и белковым веществом эритроцита (строматином). В подтверждение

этой гипотезы он произвёл опыты, в которых ему будто бы удавалось получить «в пробирке» неустойчивое соединение гемоглобин-строматин, в спектре которого не наблюдается γ-полосы.

Опыты Адамса в течение некоторого времени не привлекали к себе внимания биохимиков. Однако, в 1940 г. известный кембриджский биохимик Кейлин[16] опубликовал в Nature большую статью, в которой он описал собственные наблюдения, подтвердившие результаты Адамса, поскольку речь шла об «исчезновении» полосы γ. На рис. 13 приведены кривые коротковолновой части спектра поглощения оксигемоглобина, заимствованные из работы Кейлина и Гартри. Как видно, полоса γ в спектре поглощения эритроцитов полностью отсутствует. Однако Кейлин не мог воспроизвести описанное Адамсом соединение гемоглобин-строматин. С другой стороны, он показал, что если приготовить эмульсию концентрированного раствора чистого гемоглобина в бесцветном парафиновом масле, то в такой эмульсии также не наблюдается полосы γ, хотя после центрифугирования гемоглобин оказывается неизменным. На этом основании Кейлин высказался в пользу физического объяснения интересного явления, наблюдённого Адамсом, подчёркивая, что по всей совокупности фактов какое-нибудь элементарное объяснение здесь невозможно.

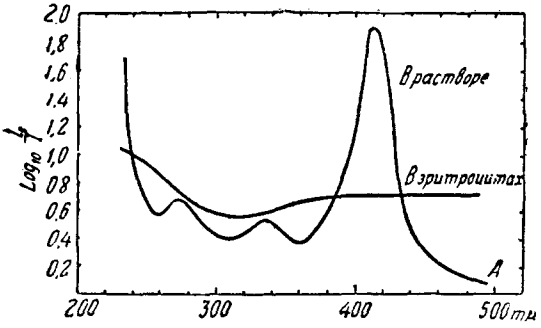


Рис. 13. Спектр поглощения гемоглобина в растворе и в эритроцитах (по Кейлину и Гартри).

Источником этих противоречий, как теперь ясно, послужили чисто экспериментальные затруднения, связанные с изучением спектра поглощения гемоглобина (и хлорофилла) в естественном состоянии.

При современном состоянии экспериментальной техники совсем нетрудно достаточно точно измерить видимый спектр поглощения окрашенного вещества, когда оно представляет собой прозрачный, однородный слой (раствор, окрашенная плёнка и т. п.). Но взвесь эритроцитов — в плазме ли крови или в физиологическом растворе — представляет собой оптически неоднородную, а потому и сильно рассеивающую (мутную) среду. Производить измерения в такой среде не только трудно, вследствие больших потерь света на рассеяние, но обычные стандартные методы, применимые для прозрачных сред, здесь вообще непригодны, так как они могут повести к ошибкам качественного характера.

Ввиду этого, для получения правильных результатов в случае мутных сред, опыт должен быть поставлен так, чтобы на воспринимающий прибор попадал по возможности весь свет, рассеиваемый мутной средой. В работе, выполненной совместно лабораторией автора и физико-химической лабораторией Института гематологии и переливания крови Академии Медицинских наук в Москве [17], указанное условие осуществлялось весьма простым способом: кювета со взвесью эритроцитов помещалась вплотную к чувствительной поверхности селенового фотоэлемента. На переднюю поверхность кюветы отбрасывалось резкое изображение выходной щели спектрального монохроматора в виде узкой полоски шириной 0,05 — 0,1 *мм*. Благодаря своеобразным законам рассеяния света крупными частицами, каковыми являются эритроциты (диаметр диска порядка 5 μ), почти весь свет, рассеянный при прохождении через мутную взвесь, попадает на чувствительную поверхность фотоэлемента и лишь незначительная часть его рассеивается назад и не учитывается воспринимающим прибором.

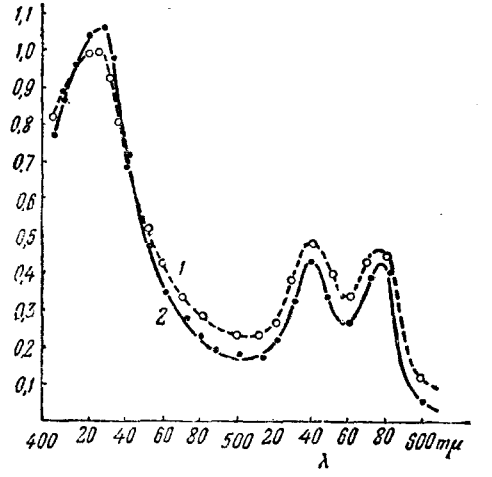


Рис. 14. Спектр поглощения взвеси эритроцитов до и после гемолиза.

Когда этот простой приём был применён к измерению спектра поглощения взвеси эритроцитов, то оказалось, что никакого «исчезновения» γ-полосы в действительности не существует. Весь видимый спектр оксигемоглобина наблюдается и в случае прозрачного раствора и в случае взвеси эритроцитов.

Для сравнения спектральных свойств гемоглобина в растворе и внутри красного кровяного тельца важно иметь возможность изучать спектр поглощения в том и другом случае, при сохранении всех остальных условий тождественными. Такая возможность даётся замечательным явлением г е м о л и з а, при котором гемоглобин, под влиянием ряда внешних условий, переходит из красного кровяного тельца в окружающую жидкость. Особенно удобно осуществлять это явление при посредстве некоторых поверхностно-активных веществ (а именно, детергентов); так например, прибавление ничтожного количества сапонина мгновенно «просветляет» кровь или взвесь эритроцитов вследствие растворения гемоглобина в плазме крови или в физиологическом растворе (0,9%-й раствор NaCl в воде), в

котором находятся эритроциты. Пользуясь этим явлением, можно было произвести сравнение спектров поглощения гемоглобина в растворе и в естественном состоянии следующим образом: был промерен спектр поглощения взвеси эритроцитов способом, описанным выше; затем в кювету была добавлена крупинка сапонина, которая вызвала гемолиз, и спектр поглощения получившегося прозрачного раствора был измерен при строгом сохранении всех остальных условий. Полученные две кривые (рис. 14) позволяют сделать следующее заключение: 1) максимумы полос поглощения оксигемоглобина в растворе и внутри эритроцита совпадают; следовательно, оксигемоглобин, при извлечении из эритроцита, никаких существенных изменений не претерпевает; 2) однако, оба спектра обнаруживают расхождение, выходящее за пределы ошибок опыта. Это расхождение состоит в том, что в слабо поглощаемых частях спектра кривая повышается, а в сильно поглощаемых понижается. Очевидно, что здесь в слабой степени проявляется тот самый эффект, который был принят за «исчезновение» полосы γ. В самом деле, достаточно немного отодвинуть кювету от поверхности фотоэлемента, чтобы расхождение обеих кривых резко усилилось. При отодвигании на достаточное расстояние весь спектр вообще сглаживается. Это ясно показывает, что причины описанных своеобразных особенностей спектра поглощения эритроцитов коренятся в законах рассеяния света в оптически неоднородной среде с окрашенными элементами. Исследование рассеяния света в таких средах это вполне подтверждает [18]. На этом вопросе мы, однако, здесь останавливаться не будем.

V

Вопрос о природе хлорофилла в естественном состоянии, т. е. в хлоропласте, исключительно важен для выяснения механизма фотосинтеза. Для ориентировки в этом вопросе следует в первую очередь обратиться к изучению спектра поглощения хлорофилла в экстрактах и в хлоропластах. Хотя в литературе описаны методы получения взвесей неповреждённых хлоропластов [19, 20, 21], систематически точные измерения их спектров поглощения нам неизвестны. Обычно измеряют спектр поглощения листа растения или взвесей, получаемых путём растирания листьев в воде. С экспериментальной точки зрения измерение спектра поглощения в оптически-неоднородной среде — задача значительно более трудная, нежели измерения прозрачных растворов. Неудивительно поэтому, что до самого последнего времени сколько-нибудь точные данные о спектрах поглощения листа в естественном состоянии отсутствовали. На рис. 15 приведён в качестве примера спектр поглощения листа ясеня [22] и для сравнения спектр поглощения экстракта его пигментов (синяя полоса здесь не показана). При сравнении обоих спектров ясно видно их различие. Оно состоит прежде всего в том, что спектр поглощения листа це-

ликом смещён в сторону длинных волн, причём величина этого смещения для главной красной полосы составляет 120 Å. Причина смещения служила предметом многочисленных дискуссий, в которых различие обоих спектров связывалось либо с различием в химической природе хлорофилла в экстрактах и в хлоропласте, либо с его состоянием в хлоропласте. По поводу состояния хлорофилла высказывались самые разнообразные гипотезы *). Наибольшей популярностью пользовалась гипотеза о коллоидальном состоянии хлорофилла. Эта гипотеза была высказана Ивановским и Герличкой и

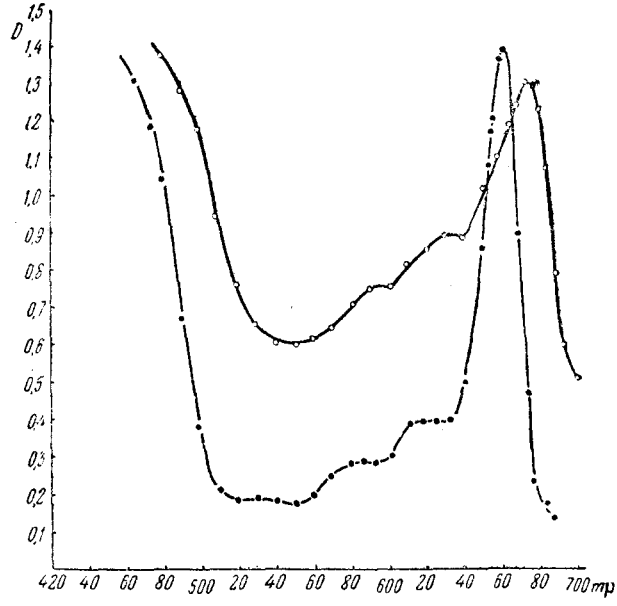


Рис. 15. Спектр поглощения листа ясеня и экстракта его пигментов.

поддержана Вильштреттером и Штолем. Основанием для неё служило сходство между спектрами поглощения листьев и коллоидных растворов хлорофилла, которые также обнаруживают смещение в красную сторону.

С другой стороны, Цвет, а впоследствии Любименко полагали, что хлорофилл в естественном состоянии, подобно гемоглобину, представляет собой комбинацию красителя с белковым веществом. Любименко, в частности, показал, что при извлечении водой пигментов из листьев растения *Aspidistria elatior* получается про-

*) Подробный обзор дан в книге Вильштреттера и Штолля «Nntersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure», 1918.

зрачный раствор, спектр которого «тождествен со спектром листа». Работы последнего времени, в которых параллельно со спектральными исследованиями изучалась седиментация при ультрацентрифугировании, повидимому подтверждают существование комбинации хлорофилла с белком, однако они не позволяют решить, является ли эта комбинация соединением с постоянным стехиометрическим составом (как это имеет место в случае гемоглобина) или мы имеем здесь дело с адсорбционной связью. Более подробное рассмотрение важных вопросов, затронутых здесь, следует искать в оригинальных работах и специальных монографиях. (См., например, монографию Е. Рабиновича [11].)

VI

Рассмотрим ещё интересный пример практического использования спектроскопических методов для исследований на живом организме. Оказывается, что некоторые особенности инфракрасных спектров поглощения различных производных гемоглобина открывают большие возможности для количественного эксперимента в области физиологии, патологии и гигиены.

Уже в 1935 г. Эггерт [23] показал, что производные гемоглобина ведут себя существенно различным образом по отношению к инфракрасным (и.-к.) лучам. Особенно резко выделяется карбонил-гемоглобин HbCO, имеющийся в крови, отравленной окисью углерода. Именно для инфракрасных лучей, начиная примерно от 800 *mμ* и дальше в сторону длинных волн, HbCO совершенно прозрачен, в то время как Hb и HbO_2 в этой области обладают заметным поглощением. Эту особенность HbCO Эггерт демонстрировал следующим эффектным качественным опытом. В четыре кюветы толщиной в 10 *мм* были налиты: 1) восстановленный Hb (получался путём прибавления нескольких капель сернистого аммония к 20 *см*^{3} разбавленной гемолизированной крови); 2) HbCO (получался путём пропускания светильного газа); 3) HbO_2; 4) «регенерированный» Hb (получался путём пропускания воздуха через HbCO). Сзади кювет располагался белый лист бумаги с надписью, и кюветы фотографировались. На рис. 16 первый ряд представляет собой фотографию в видимом свете (ортохроматические пластинки). Как видно, все кюветы здесь выглядят одинаково непрозрачными (чёрными). Последний ряд представляет собой фотографию в «невидимом свете», т. е. на пластинках, сенсибилизированных к и.-к. части спектра при освещении лампами накаливания через чёрный фильтр, пропускающий только и.-к. лучи. Полная прозрачность HbCO для этих лучей видна совершенно отчётливо.

Опыты Эггерта были повторены и расширены Меркельбахом [24]. На рис. 17 приведены две пары фотографий Меркельбаха. В нижней паре сфотографированы две капли крови, из которых одна содержала HbCO, а другая — HbO_2. Слева приведена фотография на панхро-

матической пластинке. Обе капли на ней представляются одинаково чёрными. Справа изображена фотография, сделанная при освещении инфракрасными лучами (чёрный фильтр) на инфрахроматических пластинках. Здесь капля, содержащая HbCO, — белая, а капля, содержащая HbO_2, попрежнему чёрная. В верхней паре те же снимки сделаны с гемолизированной (т. е. прозрачной) кровью. Ясно видно, что капля, содержащая HbCO, совершенно прозрачна.

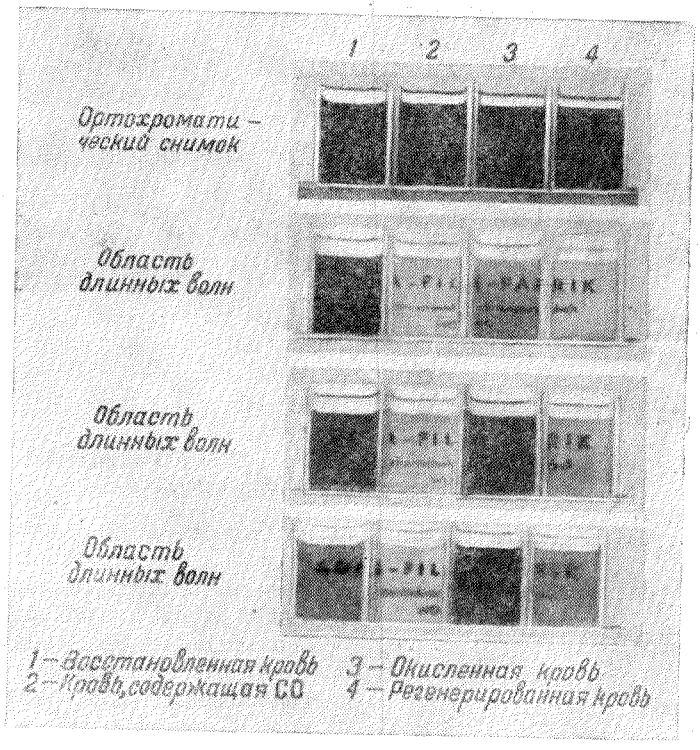


Рис. 16. Фотографии кювет, наполненных растворами различным образом обработанной крови, в разных областях спектра.

Это свойство HbCO позволяет осуществить очень чувствительный контроль на присутствие CO в крови. Эггерт сообщает, что даже после того, как пациент, слегка отравленный CO, находился 15 мин. на свежем воздухе и обычным спектроскопическим путём (в зелёной части спектра) нельзя было обнаружить в крови следов CO, инфракрасный снимок давал ещё положительный эффект.

Подобного рода качественная методика, однако, не выявляет многих существенных спектральных свойств различных производных Hb

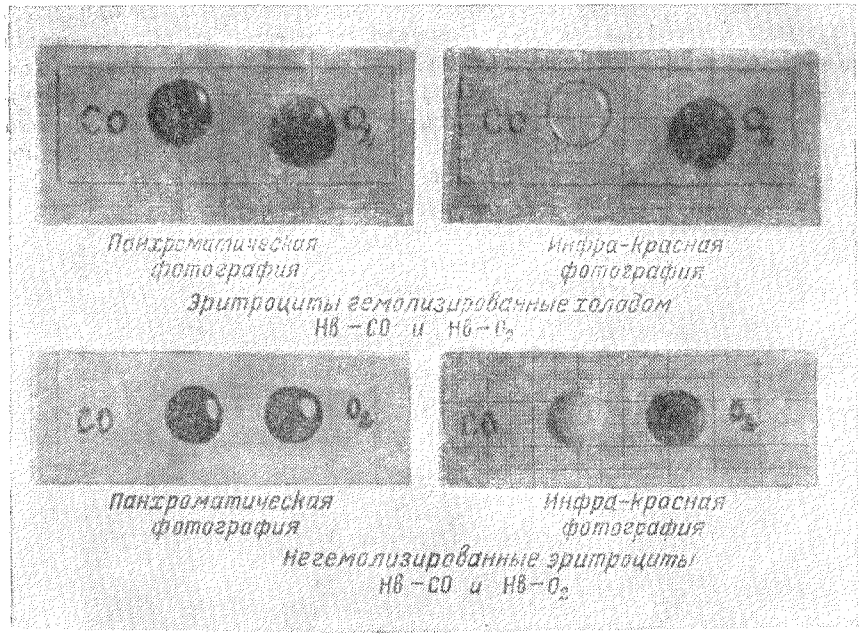


Рис. 17. Окислённая кровь и кровь отравленная CO в видимом и инфракрасном свете (по Меркельбаху).

в и.-к. части спектра. Поэтому важно было перейти от качественных опытов к количественным измерениям и.-к. спектров поглощения. Такие измерения ориентировочно производились уже самим Эггертом. Однако, его результаты—грубо приближённые и скорее схематичные. В последующем ряд исследователей производил систематические измерения. Наиболее точные результаты были получены Гореккером [25] при помощи фотоэлектрической методики. На рис. 18 приведены из работы Гореккера три кривые спектров поглощения Hb, HbO_2 и HbCO. Здесь видно следующее: а) поглощение HbCO, начиная от 800 $m\mu$ в сторону длинных волн, равно нулю; б) HbO_2 имеет широкую полосу поглощения с максимумом у 920 $m\mu$; в) кривые погло-

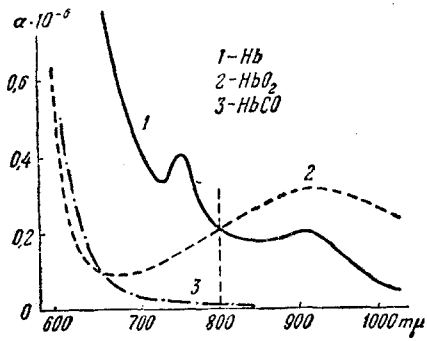


Рис. 18. Инфракрасные спектры поглощения гемоглобина, оксигемоглобина и карбоксигемоглобина (по Гореккеру).

щения Hb и HbO_2 у 800 *mμ* пересекаются, что показывает, что для этой длины волны оба вещества обладают одинаковым поглощением; г) в области у 700 *mμ*, т. е. в крайней красной части спектра, между поглощением Hb и поглощением HbO_2 различие особенно велико. Зная спектры поглощения различных производных Hb, можно производить анализ крови на относительное содержание восстановленного Hb, HbO_2 и других производных. Однако, вследствие лёгкой окисляемости Hb выполнение различных необходимых операций в кювете без нарушения состава крови связано с большими трудностями. Кроме того, особенно интересно иметь возможность производить наблюдения над составом крови непрерывно и непосредственно на живом организме. Ввиду этого появился ряд работ, в которых исследователи были заняты разработкой методики анализа крови in vivo. Наиболее удобный метод определения относительной концентрации Hb и HbO_2 состоит в измерении поглощения света определённой длины волны пронизанной кровеносными сосудами тканью человеческого тела. Обычно для этой цели используется ухо — его мочка или верхняя часть раковины. В качестве спектрального участка обычно выбирают область у 700 *mμ*, где различия между поглощением Hb и HbO_2 особенно велики. Для выделения этого участка применялись светофильтры, т. е. соответственно окрашенные стёкла или плёнки, а интенсивность проходящего света измерялась фотоэлементом — обычно селеновым.

Здесь, однако, возникло следующее затруднение: поглощение света меняется не только вследствие изменения отношения $\frac{HbO_2}{Hb}$, но и вследствие колебаний кровенаполнения сосудов. Вначале пытались учесть влияние этих колебаний путём наблюдения за кровяным давлением при помощи обычной манометрической методики. Но это оказалось крайне сложным. Ввиду этого Маттесом и Гроссом [26], а впоследствии в ещё более остроумной и изящной форме Милликэном [27] был использован принцип «двухцветного колориметра». Идея состоит в следующем: так как у 800 *mμ* кривые поглощения Hb и HbO_2 пересекаются, то поглощение в этой области характеризует полное количество Hb (вместе с HbO_2), наполняющего сосуды в данном участке ткани. Если поэтому при помощи двух светофильтров выделять приблизительно 700 *mμ* и, кроме того, отдельно и.-к. часть, то изменение пропускания последней будет характеризовать колебания кровяного давления, а изменение пропускания в области 700 *mμ* позволит определить отношение $\frac{Hb}{HbO_2}$. Маттес и Гросс пользовались двумя соответственно выбранными по своей характеристике фотоэлементами, снабжёнными указанными выше фильтрами; Милликэн воспользовался одним дифференциальным фотоэлементом и расположением, при котором колебания кровяного давления автоматически исключались. На рис. 19 приведён в схематизированном виде образец

регистрации одного из опытов Маттеса и Гросса. Здесь нижняя кривая даёт регистрацию кровяного давления, измеряемого манометрически; следующая кривая даёт «и.-к. фототок», т. е. именно тот фототок, сила которого зависит от наличия «полного гемоглобина» и который поэтому представляет собой также кривую кровяного давления, снятую, однако, фотоэлектрическим путём. Третья снизу кривая даёт «красный фототок», т. е. фототок, характеризующий одновременно общее количество Hb и соотношение HbO_2 и Hb. Наконец, верхняя кривая даёт дыхание. Обратим внимание на кривую «красный» фототок. Эта кривая обнаруживает заметное спадание, начиная с момента, когда испытуемый стал дышать воздухом с пони-

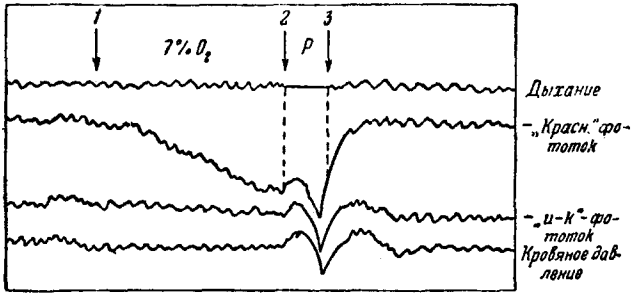


Рис. 19. Спектроскопическая регистрация изменения состава крови (по Маттесу и Гроссу).

женным содержанием кислорода ($7^0/_0$ O_2). Поскольку, однако, кривая «и. к. фототока» не меняется, спадание «красной» кривой следует приписать целиком уменьшению концентрации HbO_2 в крови и связанному с этим возрастанию поглощения для $\lambda \sim 700$ $m\mu$. В области *P* между стрелками 2 и 3 испытуемый на короткий промежуток времени задержал дыхание. Это сказалось на «красной» кривой резким подъёмом. Однако, подъём обнаруживает также «и.-к.» фототок, что́ показывает одновременное изменение кровенаполнения сосудов, подтверждаемое кривой кровяного давления. Таким образом, в данном случае по изменению «красной» кривой нельзя судить об отношении Hb/HbO_2.

Милликэн, как уже было указано, для аналогичных измерений пользовался одним селеновым фотоэлементом, который был разделён на две части и действовал как два фотоэлемента, включённых навстречу друг другу. Располагая перед этими двумя половинами два соответственно подобранных светофильтра, он автоматически исключал изменение фототока вследствие колебаний кровенаполнения. На этом принципе Милликэн построил прибор «оксиметр», при помощи которого с необычайной простотой можно непрерывно следить за величиной отношения Hb/HbO_2, что очень важно во мно-

гих случаях физиологических, медицинских и других исследований. Прибор весит всего 30 *г* и закрепляется на верхней части раковины уха.

Во всех исследованиях, о которых шла речь до сих пор, молчаливо предполагалось, что сама ткань человеческого тела не вносит ничего в поглощение света, кроме, конечно, сильного рассеяния. В самом деле, качественно уже давно известно, что ткани обладают высокой степенью прозрачности для красной и инфракрасной части спектра. Однако, имеющиеся в литературе количественные данные о спектре поглощения живой ткани, взятой как целое, противоре-

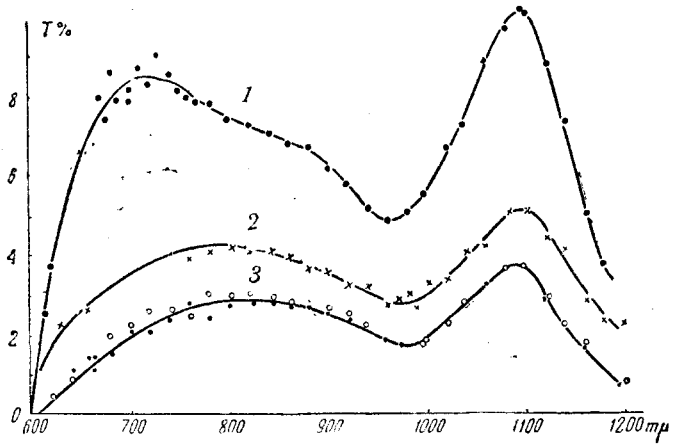


Рис. 20. Инфракрасные спектры пропускания тканей человеческого тела[28]:

1 — мочка уха; *2* и *3* — щека.

чивы: у одних авторов (Бэчем и Рид) максимум пропускания приходится на 800 *mμ*, у других (Картрайт) — на 1100 *mμ*. Абсолютные значения пропускания давались для некоторых определённых длин волн, выделявшихся фильтрами, и также противоречивы.

Систематическое изучение спектра поглощения тканей человеческого тела (ухо и щека) в крайней красной и ближней инфракрасной части спектра было недавно произведено в лаборатории автора А. А. Ильиной[28]. При этом были учтены возможные источники ошибок (рассеяние света, нагревание фотоэлемента и т. д.) и кривые промерялись подробно через каждые 5—10 *mμ*. Образцы таких кривых приведены на рис. 20. Как видно, максимумы (у 700—800 *mμ*) и минимумы (у 980 *mμ*) пропускания обнаруживаются на этих кривых с большой отчётливостью. Истолкование этих максимумов и минимумов также не представляет затруднений. Резкий минимум у 980 *mμ* и крутое спадение пропускания при $\lambda > 1200$ *mμ* несомненно обусловлены присутствием воды в тканях. В области 600—800 *mμ* ход

кривой определяется спектральными свойствами крови. Заметный разброс точек в области 640—760 $m\mu$, получающийся на всех кривых, не является результатом случайных ошибок, но обусловлен колебаниями в величине отношения HbO_2/Hb, которые должны особенно сильно сказываться именно в этой области. Всю кривую можно было довольно точно воспроизвести искусственно, располагая перед фотоэлементом кюветки с кровью и водой при определённых толщинах слоя (рис. 21).

Это позволяет думать, что, наряду со спектральными методами определения степени окисления крови и спектральным методом определения

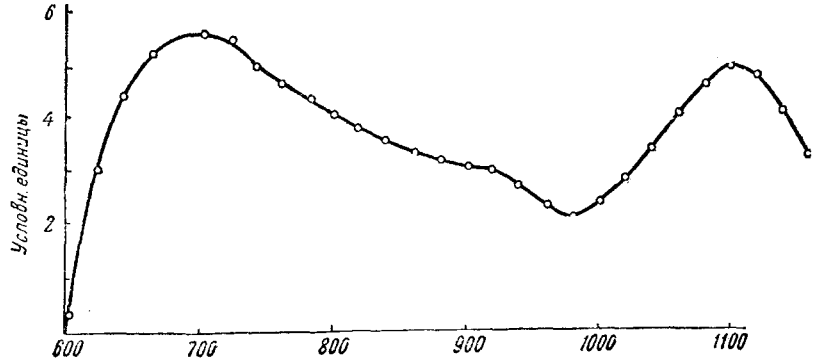


Рис. 21. Искусственное воспроизведение инфракрасного спектра поглощения тканей [28].

кровяного давления, можно разработать спектральный метод определения содержания воды в тканях, что представляет для физиологии и патологии значительный интерес.

VII

В этом кратком обзоре нет возможности останавливаться на других — весьма разнообразных — применениях спектроскопии в биологии. Ограничимся, в добавление к сказанному, только несколькими замечаниями. Абсорбционная спектроскопия является в настоящее время важнейшим вспомогательным средством при отождествлении и изучении структуры синтетически получаемых гормонов (см. по этому поводу монографию Мортона). Имеются также некоторые, хотя и не очень обширные результаты, относящиеся к спектроскопии белковых молекул. Как известно, структурными единицами этих гигантских молекул являются аминокислоты; число различных аминокислот, встречающихся в белках, — не менее 25. Их качественное и количественное определение — очень важная задача, разрешённая пока только для немногих аминокислот. В частности, циклические аминокислоты — триптофан и тиризин циклические — дают полосы спектрального погло-

щения в ультрафиолете в области 280*mμ*. Существенно, что поглощение белка приблизительно аддитивно складывается из поглощений отдельных аминокислот. На этом основаны попытки спектроскопического анализа белков, которые дают результаты, близкие к данным химического анализа, хотя и не вполне с ними совпадающие. Очевидно, что возможности для анализа здесь имеются, и требуется дальнейшая работа с целью улучшения методов (подробности см. в упомянутой монографии Мортона, гл. IX).

Приведём ещё несколько примеров, которые мы заимствуем у Тваймана и Оллсопа (лит. A IX).

«Пользуясь коэффициентом экстинкции псевдоглобулина, Маррак и Кэмпбелл-Смит исследовали природу флоккул токсина и антитоксина дифтерии (так называемый преципитат Рамона). Результаты, повидимому, показывают, что подобная реакция иммунитета имеет природу специфической химической реакции, и указывают новый подход к проблемам этого типа. Следует отметить, что в этом методе приходится иметь дело всего лишь с 2—3 *мг* белка, концентрацию которого можно определить с точностью в 3—4%.

Другим применением является метод определения пуринов. Их коэффициент экстинкции очень высок, так что они могут быть определены в чрезвычайно сильно разведённых растворах: раствор мочевой кислоты, содержащий 2,6 *мг* в 100 *см*^{3}, может быть определён с ошибкой около 3%, и, примерно, одна десятая этой концентрации может быть открыта в растворе — во всех остальных отношениях оптически прозрачном».

Вся эта интересная и важная область только за последние годы начинает привлекать к себе внимание как со стороны биологов и химиков, так и со стороны физиков *). Она представляет собой обширное, пока ещё мало обработанное поле для исследования. Значительных успехов следует ожидать в связи с развитием техники эксперимента. В этом отношении особенно важна замена кропотливых и недостаточно точных методов фотографической фотометрии в ультрафиолете методами фотоэлектрической спектрофотометрии (обзор этих методов будет дан в другой статье), соединяющими высокую степень точности с быстротой работы. Появление технически оформленных приборов, обращение с которыми столь же просто, как обращение с любительскими радиоприёмниками, позволяет надеяться,

---

*) Признаком возрастающего внимания к биологическим проблемам со стороны физиков может служить появление ряда статей в чисто физических журналах. Так в журнале «Reviews of Modern Physics», помимо упомянутого обзора Луфбурова (см. литературу AV), недавно появились две статьи: Хевеши «О биологическом действии излучений» и Дж. Франка «О фотосинтезе с помощью изолированных хлоропластов» (Rev. Modern Physics, **17**, №№ 2—3, 1945). В том же журнале обещан обзор Дж. Франка о фотосинтезе. Ряд работ появляется время от времени в «Journal of Applied Physics».

что спектрофотометры для ультрафиолета получат в химических, биологических и медицинских лабораториях такое же широкое распространение, какое уже получил визуальный фотометр Пульфриха.

В другом направлении значительных успехов при решении тончайших проблем биологии следует ожидать также в связи с совершенно новым развитием, которое получила ультрафиолетовая микроскопия (в конечном счёте основанная на различиях в ультрафиолетовых спектрах абсорбции органических веществ) благодаря работам Е. М. Брумберга (Государственный Оптический институт в Ленинграде). Удачное решение проблемы комбинирования при посредстве одного прибора микроскопических и спектральных исследований в ультрафиолете, недавно осуществлённое Е. М. Брумбергом, в очень большой степени повышает мощность этого замечательного метода.

ЛИТЕРАТУРА

А. Монографии

В нижеследующих монографиях и обзорах даны исчерпывающие ссылки на оригинальную литературу:

I. R. Morton, The Applications of Absorption Spectra to the Study of Vitamins, Hormones and Coenzymes, Adam Hilger Ltd., London, 1942.
II. E. S. Miller, Quantitative Biological Spectroscopy, 2-nd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis Minn., 1940.
III. W. R. Brode, Chemical Spectroscopy, 2-nd Edition, New York, 1945.
IV. H. Ley. Beziehungen Zwischen Absorption und chemischer Konstitution Handbuch der Physik, Vol. **XXI**, p. 57.
V. J. Loufbourow, Borderland Problems in Biology and Physics. *Reviews of Modern Physics*, **12**, 267, 1940 (содержит подробный указатель оригинальной литературы).
VI. R. B. Barnes, R. G. Core, U. Liddel and Van Zandt Williams, Infrared Spectroscopy, New York, 1944.
VII. Gladys A. Anslow, Ultraviolet Spectra of Biological Important Molecules. *J. Appl. Physics*, **16**, 41, 1945.
VIII. Heilmeyer, Spectrophotometry in Medicine, A. Hilger Ltd, 1944.
IX. Twyman and Allsop, The Practice of Absorption Spectrophotometry, A. Hilger Ltd.

В. Цитированная в тексте литература

1. G. Scheibe and W. Frömel, Hand- und Jahrbuch der Chem. Physik, 1936, B. **9**, Abschn. III—IV, p. 157.
2. В. А. Анри, Изучение поглощения ультрафиолетовых и инфракрасных лучей в связи со строением молекул, Ленинград, 1919.
3. H. Sponer and E. Teller, *Rev. Modern Physics*, **13**, 76, 1941. Там же, дальнейшие примеры.
4. K. W. Hausser, R. Kuhn, A. Smakula u. M. Hoffer, *Z. physikal. Ch.*, B. **29**, 371, 1935; K. W. Hausser, R. Kuhn, A. Smakula, K. Kreuchen, *Z. physikal. Ch.*, B. **29**, 363, 1935; K. W. Hausser, R. Kuhn, A. Smakula, W. Deutsch, *Z. physikal. Ch.*, B. **29**, 378, 1935; K. W. Hausser, R. Kuhn, A. Smakula, *Z. physikal. Ch.*, B. **29**, 384, 1935.
5. R. Mulliken, Rev. Modern Physics, **14**, 265, 1942 orka
6. R. Pohl, *Naturwiss.*, **15**, 435, 1927.

7. E. Rabinowitch, Photosynthesis, New Yorka, 1945.
8. A. Stern und H. Wenderlein, *Z. physikal. Ch.*, **A 174**, 81, 1935.
9. A. Stern und H. Wenderlein und H. Molvig, *Z. physikal. Ch.*, A **177**, 40, 1936.
10. A. Stern und H. Wenderlein, *Z. physikal. Ch.*, **A 176**, 81, 1936.
11. E. Rabinowitch, *Rev. Modern Physics*, **16**, 226, 1944.
12. F. P. Zscheile Jr., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. **III**, p. 108, 1935.
13. A. B. Macallum and R. C. Bradley, *Science*, **71**, 341, 1930.
14. G. A. Adams, R. C. Bradley and A. B. Macallum, *Biochem. Journ.*, **28**, 482, 1934.
15. G. A. Adams, *Biochem. Journ.*, **32**, 646, 1938.
16. D. Keilin and E. F. Hartree, *Nature*, July 19, No. 374, **75**, 1940.
17. А. А. Ильина, Х. М. Равикович, Д. Л. Рубинштейн, Э. В. Шпольский, *ДАН*, **48**, 346, 1945.
18. Э. В. Шпольский и А. А. Ильина, *Acta Physicochimica URSS*, 1946 (в печати).
19. R. Hill, *Proc. Roy. Soc.*, London, **B. 127**, 192, 1939.
20. R. Hill and R. Scarisbrick, *Proc. Roy. Soc.*, London, **B. 129**, 238, 1940.
21. J. Franck, *Rev. Modern Physics*, **17**, 112, 1945.
22. А. Ильина, *Журн. физич. химии*, 1946 (в печати).
23. J. Eggert, *Naturwiss.*, **23**, 281, 1935.
24. Merkelbach, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **65**, 1142, 1935.
25. B. Horecker, *J. Biolog. Chem.*, **148**, 173, 1943.
26. Mattes u. Gross, *Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol.*, **191**, 523, 1939.
27. G. A. Millican, *Rev. Sci. Instr.*, **13**, 434, 1942.
28. А. Ильина, *ДАН*, 1946 (в печати).
29. Э. В. Шпольский, Спектроскопия хлорофилла. Труды Всесоюзной Конференции по фотосинтезу, 1946 (в печати).