

ТИНДАЛЕВСКИЙ ГИПОХРОМИЗМ СУСПЕНЗИЙ

© 2015 г. Н.Л. Векшин, М.С. Фролова, В.И. Ковалев, Е.А. Бегунова

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области**E-mail: nvekshin@rambler.ru*

Поступила в редакцию 29.08.14 г.

После доработки 30.09.14 г.

Поскольку при прохождении света через суспензию на каждой отдельной частице имеет место конкуренция процессов поглощения и рассеяния, то за счет этого возникает гипохромизм – снижение коэффициента экстинкции. Величина гипохромизма возрастает при увеличении размеров частицы или ее показателя преломления. Так как тиндалевское светорассеяние суспензий, где размер каждой частицы существенно больше длины волны, не сильно зависит от длины волны, то спектр поглощения (и возбуждения) ослабляется почти равномерно. Предлагается простой метод нахождения истинных коэффициентов экстинкции, спектров поглощения и возбуждения разбавленных суспензий, не обладающих многократным светорассеянием. Приводятся экспериментальные данные по спектрам гемоглобина в эритроцитах, актиномицина в ДНК и флавинов в митохондриях.

Ключевые слова: светорассеяние, гипохромизм, коэффициент экстинкции, спектр поглощения, спектр возбуждения, флуоресценция, латекс, митохондрии, эритроциты, актиномицин, ДНК.

Феномен гипохромизма – снижения коэффициента экстинкции светопоглощающих молекул в неоднородной среде – является одним из обязательных спектральных явлений, возникающих в суспензиях, коллоидах, агрегатах молекул и макромолекулах. В частности, в биологических системах гипохромизм наблюдается в белках, ДНК, эритроцитах, хлоропластах и т.д. [1]. Существуют несколько причин гипохромного эффекта [2].

Гипохромизм стопкообразно расположенных хромофоров в макромолекулах и молекулярных кластерах во многих случаях удается объяснить с помощью «экранировочной» модели [3], оперирующей сечениями поглощения, напрямую связанными с коэффициентами экстинкции. Эта модель предсказывает конкуренцию хромофоров в стопке за фотон, что проявляется в виде взаимного «экранирования», ведущего к снижению коэффициента экстинкции в расчете на один хромофор. Модель пригодна для молекулярных структур, размер которых существенно меньше длины волны – для олигонуклеотидов, фрагментированной ДНК и др. [4] (в них светорассеянием можно пренебречь). Для небольших молекулярных стопкообразных хромофорных структур модель хорошо описывает все явления: снижение коэффициента экстинкции, уширение гипохромного спектра, зависимость величины гипохромизма от количества хромофоров в стопке и их взаимной

ориентации, резкое уменьшение гипохромизма при разупорядочивании стопки, отсутствие новых полос или перекачки в другие полосы.

Для гипохромизма суспензий, коллоидов и иных частиц, размер которых заметно превышает длину волны, имеются другие модели. Одна из них предполагает «просеивание» световых потоков между частицами, что приводит к не экспоненциальному закону поглощения – «эффекту сита» [5]. Эффект сита зависит от размеров частиц и длины оптического пути света в образце. Модель оперирует с оптическими плотностями, но не с коэффициентами экстинкции. Она годится только для больших частиц в тонком слое. Размеры частиц должны быть многократно больше длины волны, а их количество – чрезвычайно малым [6], иначе никакого «просеивания» не будет [7]. Для растворов макромолекул, агрегатов молекул, большинства коллоидов и мелких суспензий эта модель малоприменима.

Еще одной причиной спектральных изменений может являться многократное рассеяние [8], имеющее место в сильно концентрированных суспензиях. Этот осложняющий случай мы здесь рассматривать не будем.

Гипохромизм суспензий и коллоидов часто пытаются описать с точки зрения светорассеяния в рамках теории Ми [9]. Сама по себе теория Ми хорошо объясняет светорассеяние на частицах, размер которых превышает длину

волны. Однако ее применение к расчету гипохромного эффекта для многих суспензий оказалось не слишком удачным. Измеряя соотношение между оптической плотностью рассеяния и тотальной оптической плотностью (куда входит и поглощение, и рассеяние), исследователи пытались найти величину «истинного» поглощения [10,11]. Они изначально полагали наличие аддитивности поглощения и рассеяния. Это допущение справедливо для тех систем, где имеются рассеивающие частицы и имеются поглощающие молекулы, причем первые не взаимодействуют со вторыми. В большинстве же экспериментально интересных случаев (в частности, это касается клеточных органелл) собственные хромофоры или специальные красители находятся *внутри* рассеивающих частиц. В таких системах за счет рассеяния на каждой частице должна снижаться вероятность поглощения. Это обстоятельство нигде ранее количественно не учитывалось. Вот почему простая аппроксимация оптической плотности из области рассеяния на область поглощения и ее последующее вычитание не давали приемлемых результатов.

Для количественного описания гипохромных спектров суспензий и коллоидов не достаточно аппроксимировать величину светорассеяния из области, где нет поглощения, на область, где оно есть, как это часто делается (см., например, [12]). Ведь спектр поглощения (и возбуждения) хромофора внутри частицы всегда сколько-то гипохромизирован по сравнению со спектром свободного хромофора. Для получения истинного спектра поглощения хромофора внутри частицы необходимо не только вычесть общее светорассеяние суспензии из тотальной оптической плотности, но и внести существенную поправку на вероятность рассеяния света отдельной частицей.

Ниже проводится рассмотрение тиндалевского гипохромизма частиц, размер которых существенно больше длины волны (здесь молекулярное релеевское рассеяние дает обычно малый вклад). Для простоты взята однородная разбавленная суспензия, не обладающая многократным светорассеянием. Анализируется применение модели для ряда биологически важных структур: эритроцитов, митохондрий и ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии из печени крысы выделяли обычным методом с модификациями [13] в буфере, содержащем 10 мМ трис и 250 мМ сахарозы, рН 7,4.

Эритроциты из крови крысы хранили в буфере, содержащем 10 мМ трис, 150 мМ NaCl и 10 мМ цитрата натрия, рН 7,4.

В работе использовали нативную и фрагментированную ДНК (Reanal, Венгрия), а также актиномицин Д (Reanal, Венгрия). ДНК растворяли в дистиллированной воде (для ее самопроизвольного сворачивания в клубок) за несколько часов до процедуры встраивания в нее актиномицина Д.

Спектры поглощения и рассеяния регистрировали на спектрофотометрах «ПромЭкоЛаб-5400УФ» (Санкт-Петербург) и «М-40» (Германия) в обычном отсеке, а спектры поглощения с устранением вклада рассеяния – в спецотсеке для мутных образцов спектрофотометра «М-40», где кювета находится вплотную к полусферическому детектору, собирающему рассеянный свет.

Спектры возбуждения флавиновой флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Perkin-Elmer MPF-44B» в 1-сантиметровых кварцевых кюветах.

Оптическую микроскопию образцов и подсчет частиц выполняли на микроскопе Zeiss Imager (Германия).

Перед микроскопированием и фотометрированием все суспензии встряхивали на «вортексе» для полного устранения слипания частиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, оптическая плотность, измеряемая на спектрофотометре за счет поглощения света, определяется законом Бугера–Ламберта–Бэра [14]:

$$D = \epsilon CL. \quad (1)$$

Здесь ϵ – коэффициент экстинкции при определенной длине волны, C – концентрация молекул, L – длина оптического пути света в образце. Коэффициент экстинкции по сути представляет собой молекулярную площадь, непроницаемую для фотонов [14,15]. Например, $\epsilon = 6 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1} = 1 \text{ \AA}^2$ [15].

Вероятность поглощения (P) фотона одиночной молекулой красителя в растворе при фиксированной длине волны можно представить в виде отношения двух площадей [14,15]:

$$P = \epsilon/S, \quad (2)$$

где S – площадь хромофора молекулы красителя. Здесь ϵ выражается в \AA^2 . При этом для линейного осциллятора поглощения не требуется вводить поправки на фактор ориентации

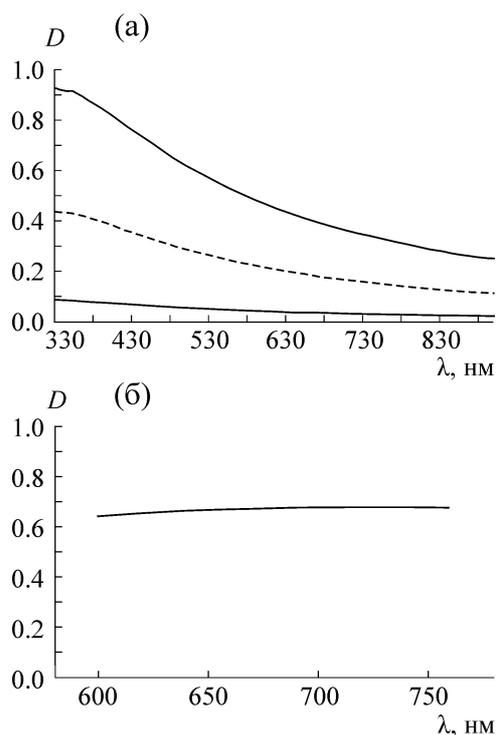


Рис. 1. (а) – Спектральная зависимость оптической плотности суспензии латексных частиц диаметром 0,8 мкм в кюветках с оптическим путем 1 см (вверху), 0,5 см (в середине) и 0,1 см (внизу). Измерено в обычном отсеке спектрофотометра «М40». (б) – Оптическая плотность суспензии латексных частиц диаметром 1,5 мкм (концентрация $4,8 \cdot 10^{-14}$ М) в «красной области». Измерено в 1-сантиметровой кювете на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ».

и на переход к десятичным логарифмам D , так как они взаимно компенсируются.

По аналогии с поглощением, вероятность рассеяния фотонов частицей при фиксированной длине волны тоже можно представить в виде отношения двух площадей:

$$P_r = \delta / \pi R^2, \quad (3)$$

где δ – оптическое сечение рассеяния, которое не превышает геометрического поперечного сечения частицы πR^2 . Для линейного осциллятора рассеяния также не требуется вводить поправки на фактор ориентации и на переход к десятичным логарифмам D , так как они взаимно компенсируются.

Оптическая плотность светорассеяния D_δ , измеряемая на спектрофотометре, может быть описана аналогично закону Бугера–Ламберта–Бэра:

$$D_\delta = \delta C_\delta L. \quad (4)$$

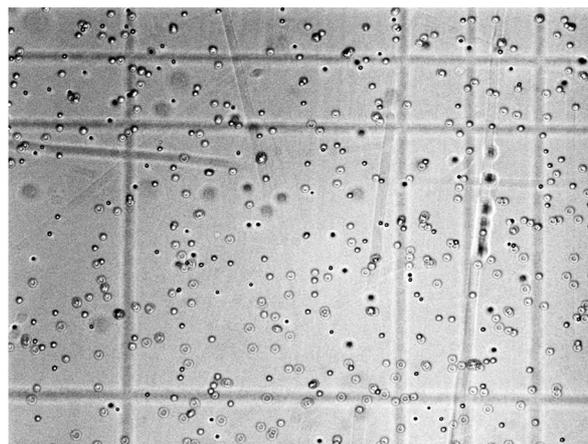


Рис. 2. Латексные частицы диаметром $1,5 \pm 0,1$ микрон (в воде) в камере Горяева. Микроскоп Zeiss Imager, в режиме светлого поля.

Концентрацию частиц C_δ легко определить с помощью микроскопа. Эта формула применима для экспериментов на стандартных спектрофотометрах при не слишком высоких D_δ .

Хорошая выполнимость формулы (4) для фотометрического определения величины светорассеяния суспензий следует из эксперимента по оптической плотности латексных частиц (рис. 1а). Здесь спектрофотометр выполняет по сути функцию турбодиметра. Чем выше концентрация частиц или чем больше длина оптического пути, тем линейно выше оптическая плотность (при фиксированной длине волны). Возрастание оптической плотности в коротковолновой области наблюдается для всех частиц размером меньше 1 мкм. Чем меньше размер частиц, тем круче эта зависимость, обусловленная, как известно, релеевским рассеянием [6,13,14].

Для латексных же шариков диаметром, например 1,5 мкм, оптическая плотность в диапазоне 600–800 нм уже почти не зависит от длины волны (рис. 1б), т.е. здесь удобно использовать термин «тиндалевское рассеяние». Подсчитав количество частиц в единице объема, можно найти их концентрацию. Например, в водном объеме $0,004 \text{ мм}^3$ латексной суспензии, показанной на рис. 2, содержится в среднем 115 частиц. Это соответствует концентрации $4,8 \cdot 10^{-14}$ М. По формуле (4) получается, что максимальное сечение δ (при $\lambda = 700$ нм) составляет $1,22 \text{ мкм}^2$. Подставляя эту величину и $\pi R^2 = 1,77 \text{ мкм}^2$ в формулу (3) находим, что $P_r = 0,69$. Это означает, что 69% фотонов, падающих на отдельную частицу латекса, рассеиваются в стороны и только 21% проходит в неизменном направлении (сквозь частицу или

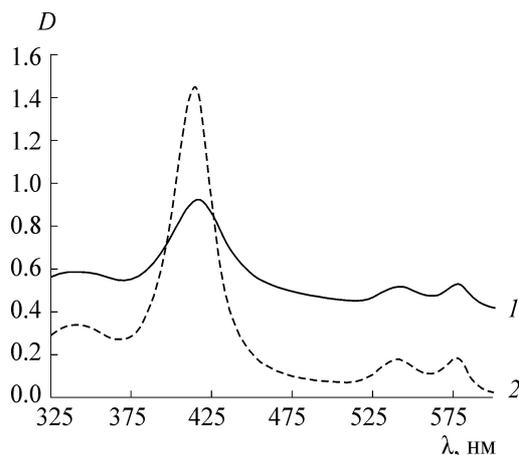


Рис. 3. Спектр поглощения суспензии эритроцитов ($7 \cdot 10^6$ штук/мл) в 10 мМ трис-буфере с 150 мМ NaCl, pH 7 (1) и раствор, полученный после их гемолиза в воде (2). Измерено на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ» в 1-сантиметровой кювете.

дифрагирует на ней) и попадает на детектор спектрофотометра.

Использованный латекс не окрашен, не способен активно поглощать свет. Но давайте представим, что *внутри* одной латексной частицы появится, например, одна молекула красителя. Вероятность попадания фотона на молекулу красителя в латексной частице будет равна $(1 - P_r)$. Вероятность поглощения фотона молекулой красителя в частице составит

$$P_s = (1 - P_r)P. \quad (5)$$

Если величина P_r близка к единице, то P_s устремится к нулю. Это означает, что молекула красителя, попавшая внутрь такой частицы, будет поглощать свет чрезвычайно слабо. Даже если «нафаршировать» частицу многими молекулами красителя, светопоглощение будет незначительным.

Формулу (5) можно записать в виде

$$P_s/P = (1 - P_r). \quad (6)$$

Из такой записи видно, что, зная вероятность светорассеяния на отдельной частице, можно найти соотношение между вероятностями поглощения красителя в частице и растворе, т.е. предсказать, на сколько будет снижен коэффициент экстинкции. Отметим, что при тиндалевском рассеянии величина гипохромизма почти не будет зависеть от длины волны.

Переходя к экспериментально измеряемым параметрам, формулу (5) можно представить в виде

$$P_s = (1 - \delta/\pi R^2)\epsilon/S. \quad (7)$$

Это выражение позволяет количественно рассчитать вероятность поглощения света одним хромофором внутри частицы в условиях рассеяния света на ней.

Вклад общего светорассеяния в измеряемую тотальную оптическую плотность можно снизить, как известно, разбавлением суспензии, уменьшением оптического пути или помещением кюветы в сферический детектор [6,16]. Однако при этом величина светорассеяния на каждой отдельной частице остается неизменной, ибо она зависит только от свойств самой частицы: показателя преломления (поляризуемости) и диаметра [16].

Если краситель или иной хромофор находится внутри частицы (например, в органелле или клетке), не на поверхности, то вероятность поглощения фотонов всегда будет снижена из-за светорассеяния. Поэтому спектр поглощения будет на сколько-то гипохромизирован. Если краситель способен к флуоресценции, то интенсивность будет ослаблена на столько же, так как спектр возбуждения подобен спектру поглощения. При детекции флуоресценции красителя в гидрофобных мембранах гипохромный эффект может компенсироваться его высоким квантовым выходом излучения красителя (по сравнению с водой).

Характерными признаками тиндалевского гипохромизма будут являться: а) равномерное снижение коэффициента экстинкции по спектру поглощения, т.е. сохранение формы спектров поглощения и возбуждения, б) независимость от величины исходного коэффициента экстинкции, в) отсутствие новых полос или перекачки в другие полосы; г) независимость от ориентации молекул внутри частицы; д) независимость от концентрации частиц (до тех пор, пока не возникает многократное рассеяние).

Приведем три наглядных примера тиндалевского и тиндаль-релеевского гипохромизма в биологических суспензиях.

Гемоглобин в эритроцитах. На рис. 3 показан общий спектр суспензии крысиных эритроцитов (записанный на спектрофотометре в обычном отсеке), где заметный вклад вносит светорассеяние, а пик поглощения в районе полосы Сорэ при 415 нм принадлежит гемоглобину, которым заполнен каждый эритроцит. Диаметр крысиных эритроцитов по данным атомно-силовой микроскопии составляет не менее 6 мкм [17]. На столь больших частицах светорассеяние почти не зависит от длины волны, т.е. является тиндалевским. Действительно,

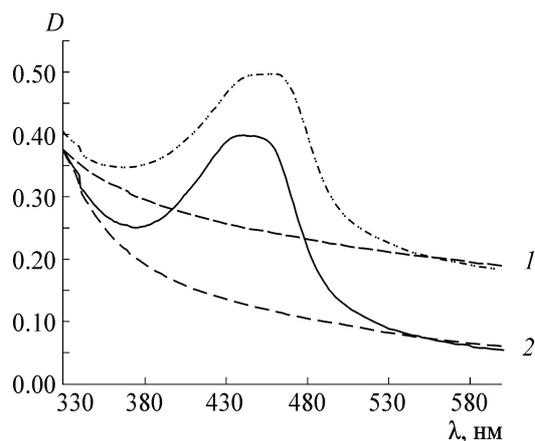


Рис. 4. Спектр поглощения актиномицина Д (10 мкМ) в нативной (1) и фрагментированной (2) ДНК. Измерено в 1-сантиметровой кювете на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ». Пунктиром показан вклад светорассеяния ДНК.

на рис. 3 видно, что спектр эритроцитов равномерно поднят при всех длинах волн. Подсчет эритроцитов на микроскопе дал их среднее содержание в 1 мл: $7 \cdot 10^6$ штук, что соответствует концентрации $1,1 \cdot 10^{-14}$ М. Исходя из оптической плотности рассеяния $D = 0,5$ (без полосы гемоглобинового поглощения), по формуле (4) находим, что сечение рассеяния $\delta = 4,5 \cdot 10^{13} \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1} = 7,5 \text{ мкм}^2$. Подставляя эту величину и $\pi R^2 = 9,6 \text{ мкм}^2$ (диаметр хаотически вращающейся эритроцитарной сферы был взят равным 3,5 мкм, так как диаметр эритроцита равен 6–8 мкм, а толщина 1–2 мкм [6,17]) в формулу (3), находим, что $P_r = 0,78$. Это означает, что не менее трех четвертей всех фотонов, падающих на эритроцит, рассеиваются в стороны и только одна четверть может пройти через него. Значит, гемоглобин, находящийся внутри эритроцитов, должен поглощать свет как минимум в четыре раза слабее, чем если бы он находился снаружи. Действительно, при гемолизе эритроцитов в воде коэффициент экстинкции гемоглобина в полосе Сорэ резко возрастает – в четыре раза (рис. 3). При этом примерно во столько же возрастает интенсивность двух других (длинноволновых) полос, что находится в полном соответствии с предложенной моделью. Полученный результат означает, что гипохромизм гемоглобина в эритроците хорошо описывается предложенной моделью и не требует привлечения модели «эффекта сита», хотя этот эффект в принципе тоже может давать какой-либо небольшой вклад.

Актиномицин в ДНК. На рис. 4 показан спектр комплекса актиномицина Д с нативной ДНК (записанный на спектрофотометре в обыч-

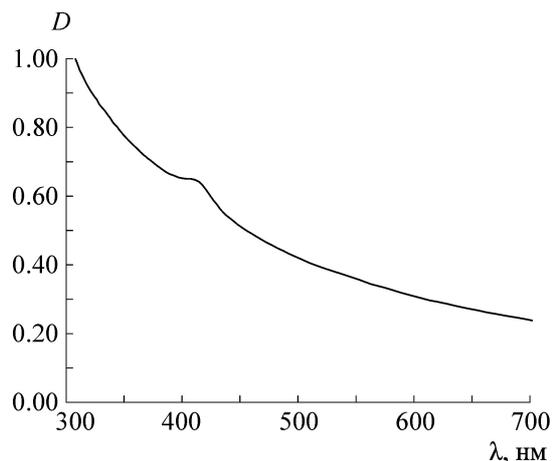


Рис. 5. Спектр поглощения и рассеяния суспензии печеночных митохондрий (0,3 мг/млМ, в 10 мМ трис-фосфатном буфере с 150 мМ сахарозы, рН 7,4). Измерено в 1-сантиметровой кварцевой кювете на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ».

ном отсеке), где актиномицин Д дает полосу поглощения при 450 нм, а ДНК создает светорассеяние во всем диапазоне длин волн. Светорассеяние заметно возрастает от длинноволновой области к коротковолновой, т.е. здесь тиндалевское рассеяние переходит в релеевское. Диаметр клубка макромолекулы нативной ДНК, по нашим данным фазово-контрастной микроскопии, составлял менее 0,7 мкм, и в суспензии было много частиц меньшего размера, которые и давали основной вклад в релеевское рассеяние.

При связывании актиномицина Д с *фрагментированной* ДНК (рис. 4) наблюдается почти такая же полоса поглощения актиномицина Д, но она чуть-чуть интенсивней и коротковолновой, чем в случае с нативной ДНК (если вычесть фон рассеяния в обоих случаях). При этом светорассеяние фрагментированной ДНК достаточно мало. При микроскопировании никаких клубочков, естественно, вообще не обнаруживается.

Поскольку разница между поглощением актиномицина Д в двух видах ДНК невелика, это означает, что актиномицин Д находится в основном на поверхности клубка, мало проникающая внутрь.

Флаavin в митохондриях. На рис. 5 показан общий спектр суспензии печеночных митохондрий (записанный на спектрофотометре в обычном отсеке), где заметный вклад вносит светорассеяние, а небольшой пик в районе 415 нм принадлежит цитохромам. Светорассеяние снижается от коротковолновой области к длинноволновой, т.е. здесь тиндалевское рассеяние час-

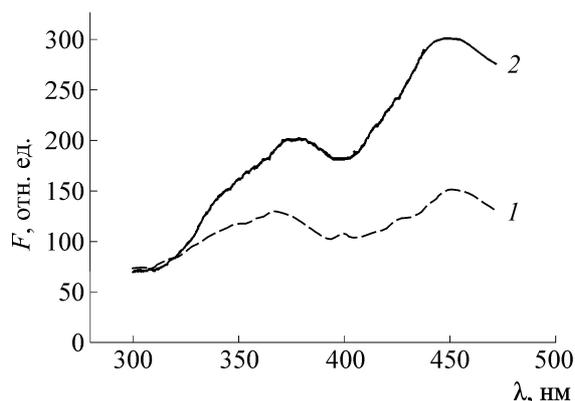


Рис. 6. Спектр возбуждения флавинов (длина волны излучения 525 нм) в суспензии печеночных митохондрий (0,3 мг/мл) (1) и в растворе, полученном после их обработки детергентом SDS (0,25%) (2). Измерено в 1-сантиметровой кварцевой кювете на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MPF-44B.

точно переходит в релеевское. Это связано с тем, что хотя средний диаметр печеночных митохондрий ~ 1 мкм, но в суспензии есть также малые митохондрии и другие частицы размерами существенно меньше. Подсчет на микроскопе всех частиц диаметром от 0,2 до 2 мкм дал среднюю цифру их количества в 1 мл – $1,55 \cdot 10^8$, что соответствует концентрации $2,6 \cdot 10^{-13}$ М. Исходя из оптической плотности, например, при $\lambda = 450$ нм (вне полосы цитохромного поглощения), по формуле (4) находим, что $\delta = 1,9 \cdot 10^{12} \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1} = 0,32 \text{ мкм}^2$. Подставляя эту величину и $\pi R^2 = 1 \text{ мкм}^2$ в формулу (3), находим, что $P_r = 0,32$. Это означает, что 32% фотонов, падающих на митохондрию, рассеиваются в стороны и 68% проходят через нее (при данной длине волны). Любые хромофоры, находящиеся внутри митохондрий, не на поверхности внешней мембраны, будут поглощать свет примерно на треть хуже, чем если бы они находились снаружи. Например, это должно наблюдаться для флавобелков. Рассмотрим этот пример.

Количество флавобелков в митохондриях столь мало, что их наличие трудно выявить в спектре поглощения (рис. 5), но можно легко увидеть по флуоресценции. На рис. 6 показан спектр возбуждения флавиновой флуоресценции суспензии митохондрий. Спектр возбуждения, как известно [2,5], подобен спектру поглощения. Видны два характерных флавиновых максимума: при 370 и 450 нм. При разрушении митохондрий детергентом SDS наблюдается примерно усиление интенсивности флавиновой флуоресценции (рис. 6). Это обусловлено тем, что флавобелки и, прежде всего освобожденный

флавиномононуклеотид НАДН-дегидрогеназы, выходят из внутренней стороны внутренней мембраны наружу. Флавиномононуклеотид связан с ферментом не ковалентно, поэтому при повреждении митохондрий он постепенно выходит во внешнюю среду [15]. При разрушении митохондрий детергентом (додецилсульфатом натрия) флавины выходят из митохондрий в раствор, что приводит к снятию их тиндалевского гипохромизма. Отметим, что додецилсульфат натрия в использованной концентрации не влиял на квантовый выход флуоресценции свободных флавинов.

Таким образом, для всех приведенных выше биологических суспензий предложенная модель тиндалевского гипохромизма позволяет описать экспериментальные данные. Предложенная модель в принципе может быть использована для липосом и не биологических суспензий, коллоидов и квантовых точек, где наблюдается заметный гипохромизм [18–22]. Кроме того, наш подход позволяет легко различить ситуацию с красителем, находящемся внутри частиц, от ситуации, когда он находится на поверхности (в этом случае не будет наблюдаться тиндалевский гипохромизм).

В биологических структурах тиндалевский гипохромизм может иметь место наряду с другими причинами снижения коэффициента экстинкции. В суспензиях органелл и клеток он может вносить основной вклад.

В заключение нужно особо подчеркнуть, что применение различных оптических приспособлений, например сферического детектора [2,6] или опалового стекла [23], позволяет нивелировать турбодиметрический вклад светорассеяния суспензии, но не влияет на величину тиндалевского гипохромизма.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине – 2014».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (М., Мир, 1984), т. 2.
2. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
3. M. Weissbluth, *Quart. Rev. Biophys.* **4** (1), 1 (1971).
5. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений* (Л., Наука, 1967).
6. Ю. А. Владимиров и А. Я. Потапенко, *Физико-химические основы фотобиологических процессов* (М., Дрофа, 2006).
7. L. N. M. Duysens, *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 1 (1956).

8. T. Richter and L. Fukshansky, *Photochem. Photobiol.* **59** (2), 237 (1994).
9. G. Papageorgiou, *J. Theor. Biol.* **30**, 249 (1971).
10. Л. Н. Белл, *Биофизика* **10**, 374 (1965).
11. А. Н. Шерудило, *Биофизика* **13**, 741 (1968).
12. N. L. Vekshin, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **3**, 625 (1989).
13. L. H. Garcia-Rubio, *Macromolecules* **20** (12), 3070 (1987).
14. I. Z. Steinberg, *J. Anglist. Ann. N.-Y. Acad. Sci.* **366**, 125 (1981).
15. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Пушино, Фотон-век, 2008).
16. В. Н. Лопатин, *Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред* (М., Физматлит, 2004).
17. О. Д. Белоусова, *Судебная медицина* **13**, (2012).
18. M. A. R. B. Castanho, N. C. Santos, and L. M. S. Loura, *Eur. Biophys. J.* **26**, 253 (1997).
29. R. D. Near, S. C. Hayden, R. E. Hunter, et al., *J. Phys. Chem.: C* **117**, 23950 (2013).
20. J. Sun and E. M. Goldys, *J. Phys. Chem.: C* **112**, 9261 (2008).
21. J. Wu, M. S. Feld, and R. P. Rava, *Appl. Optics*, **32** (19), 3585 (1993).
22. S. Fantini, M. A. Franceschini, J. B. Fishkin, et al., *Appl. Optics* **33** (22), 5204 (1994).
23. J. H. C. Smith, K. Shibata, and R. W. Hart, *Arch. Biochem. Biophys.* **72** (2), 457 (1957).

Tyndall's Hypochromism in Suspensions

N.L. Vekshin, M.S. Frolova, V.I. Kovalev, and E.A. Begunova

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Since the passage of light through each individual particle in a suspension includes the competition of processes of absorption and scattering, it leads to hypochromism – a decrease in the extinction coefficient. Such “scattering” hypochromism increases with the particle size and its refractive index. Since the Tyndall’s light scattering in suspensions, where the size of each particle is substantially larger with respect to wavelengths of light, is not strongly dependent on the wavelength, the absorption spectrum (and excitation spectrum) attenuated almost uniformly at different wavelengths. A simple method to find true extinction coefficients from the absorption (or excitation) spectra of diluted suspensions (not having multiple light scattering) is suggested. The experimental data on spectra of hemoglobin in erythrocytes, actinomycin in DNA and flavins in mitochondria are given.

Key words: light scattering, hypochromism, extinction coefficient, absorption spectrum, excitation spectrum, fluorescence, latex, mitochondria, erythrocytes, actinomycin, DNA