

# Инфракрасная спектроскопия поглощения. Колебательно-вращательные спектры двухатомных молекул. FTIR spectroscopy.

Пискунова Ольга, Делинkevич Мария, Б06-205

31 декабря 2024 г.

**Цель работы:** Знакомство с принципом работы Фурье-спектрометра; изучение вращательной структуры колебательно-вращательного спектра.

**Задачи:**

- Снять спектр поглощения опорного образца (воздуха), спектры поглощения образцов (гемоглобин, альбумин, триптофан, деринат) и скотча.
- Снять спектр спектра поглощения HCl.
- Провести анализ полученных спектры.
- Провести анализ вторичной структуры альбумина.

## Теоретическое введение

### Вращательные уровни и вращательный спектр

В первом приближении можно считать, что молекула представляет собой жесткий ротатор, т.е. расстояние между ядрами не зависит от энергии ее вращения, которая определяется следующим выражением:

$$E = \frac{I\omega^2}{2} = \frac{L^2}{2I},$$

где  $\omega$  - круговая частота вращения,  $I$  - момент инерции молекулы и  $L = I\omega$  - момент количества движения. Согласно квантовой механике, квадрат момента количества движения может принимать лишь дискретные значения:

$$L^2 = \hbar j(j+1),$$

где  $j = 0, 1, 2, \dots$  называется вращательным квантовым числом. Тогда формула энергии вращательного состояния имеет вид:

$$\varepsilon_j = \frac{E_j}{hc} = Bj(j+1), [\text{см}^{-1}]$$

где  $B = \frac{h}{8\pi^2 Ic} [\text{см}^{-1}]$  - *вращательная постоянная*. Возможные чисто вращательные переходы определяются правилом отбора:

$$j' - j'' = \Delta j = \pm 1$$

то есть возможны лишь переходы между соседними вращательными уровнями. Определим энергии (частоты) возможных переходов (излучение  $j' - > j''$  или поглощение  $j'' - > j'$ ):

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_{j'} - \varepsilon_{j''} = 2Bj', [\text{см}^{-1}]$$

Таким образом спектр состоит из ряда равноотстоящих (в шкале частот) линий, расположенных в далекой инфракрасной или микроволновой области. Расстояние между соседними линиями равно  $2B$ .

В действительности при вращении молекулы расстояние между ядрами увеличивается вследствие центробежного расстояния. Учесть влияние данного эффекта можно поправкой:

$$\varepsilon_j = Bj(j+1) - Dj^2(j+1)^2, [\text{см}^{-1}]$$

где  $D$  - *центробежное растяжение*.

## Колебательные уровни и колебательный центр

Модель гармонического осциллятора является наиболее простой моделью и позволяет корректно описывать положение нижних колебательных уровней молекулы. Потенциальная энергия движения ядер при расстояниях  $r$ , близких к равновесному  $r_e$ , представляется в виде:

$$U(r) = \frac{k(r - r_e)^2}{2},$$

где  $k$  - силовая постоянная, характеризующая квазиупругие силы, возникающие в молекуле при небольших отклонениях от ядер от их равновесных положений. Энергия уровней в такой модели представляется формулой:

$$\varepsilon_v = w_e \left( v + \frac{1}{2} \right), [\text{см}^{-1}]$$

где  $v = 0, 1, 2, \dots$  - колебательное квантовое число,  $w_e$  - собственная частота осциллятора.

Для колеб. переходов гармонического осциллятора выполняется правило отбора  $\Delta v = \pm 1$ .

У реальных молекул приближенно последовательность разрешенных уровней колебательной энергии принимает вид:

$$\varepsilon_v = w_e \left( v + \frac{1}{2} \right) - w_e x_e \left( v + \frac{1}{2} \right)^2, [\text{см}^{-1}]$$

где  $x_e$  - постоянная ангармоничности, значение которой всегда мало и положительно ( $x_e \sim 0.01$ ). Правило отбора для ангармонического осциллятора разрешают излучательные переходы с изменением колебательного квантового числа более чем на единицу:  $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3$  - т.к. вероятность переходов быстро уменьшается с ростом количества задействованных колебательных квантов.

## Колебательно-вращательный спектр двухатомной молекулы

Зависимость вращательной постоянной от квантового числа  $v$  с высокой точностью описывается формулой:

$$B_v = B_e - \alpha_e \left( v + \frac{1}{2} \right),$$

где  $\alpha_e$  - константа, которая мала по сравнению с  $B_e$ , т.к. изменение расстояния между ядрами в результате возбуждения колебательных состояний мало по сравнению с самим межъядерным расстоянием. В итоге колебательная и вращательная энергии молекулы принимают вид:

$$\varepsilon_{j,v} = B_v j(j+1) + w_e \left( v + \frac{1}{2} \right) - w_e x_e \left( v + \frac{1}{2} \right)^2, [\text{см}^{-1}]$$

Правила отбора для комбинированных переходов практически те же, что и для колебательных и вращательных переходов в отдельности:

$$\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots; \Delta j = \pm 1.$$

Излучательные переходы с  $\Delta j = 0$  практически не имеют места для двухатомных молекул, т.е. колебательный переход всегда сопровождается вращательным.

Колебательно-вращательные полосы состоят из R-ветви - совокупности линий, для которых выполняется условия  $\Delta j = +1$  и из Р-ветви, где  $\Delta j = -1$ . Между сериями Р и R-ветвей находится так называемый нулевой промежуток (начало полосы)  $\nu_0$ . Он соответствует чисто колебательному переходу  $j'' = 0 \rightarrow j' = 0$ , который для большинства двухатомных молекул запрещен правилами отбора. Поэтому отсчет Р-линий начинается с  $j = j'' = 1$ . Ветвь R всегда расположена со стороны больших частот от  $\nu_0$ , а первая наблюдаемая линия соответствует  $j = 0$ .

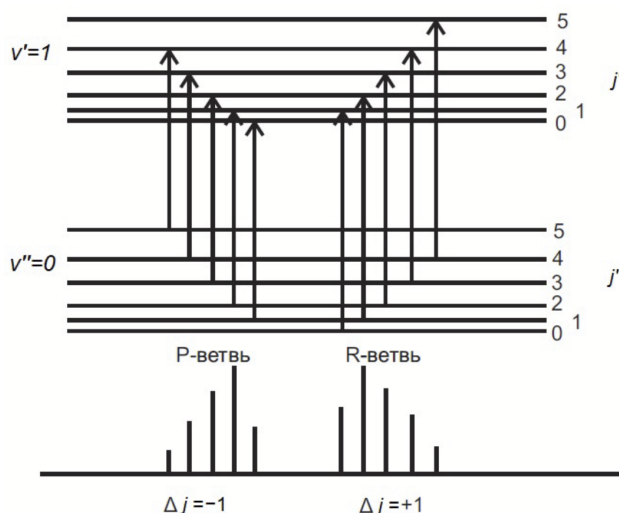


Рисунок 1 – P- и R-ветви колебательно-вращательного спектра двухатомной молекулы

## Интенсивности линий в спектре

Для равновесных условий заселенность энергетических уровней определяется распределением Больцмана:

$$n_i = n_0 \frac{g_i}{g_0} \exp\left(-\frac{\Delta E_i}{kT}\right),$$

$n_i, n_0$  - число молекул в  $i$ -м и нулевом энергетическом состояниях,  $\Delta E_i$  - разница энергий между этими состояниями,  $g_i, g_0$  - статистические веса состояний,  $k$  - постоянная Больцмана,  $T$  - температура.

Статистический вес вращательного состояния равен  $g = 2j + 1$ , а распределение по вращательным состояниям имеет вид:

$$n_j = n_0(2j + 1) \exp\left(-\frac{\Delta E_j}{kT}\right)$$

Таким образом, рост интенсивности спектральных линий при малых  $j$  связан с линейным ростом степени вырождения вращательных уровней, а спад определяется экспоненциально низкой заселенностью высоких энергетических уровней.

## Принципы фурье-спектроскопии

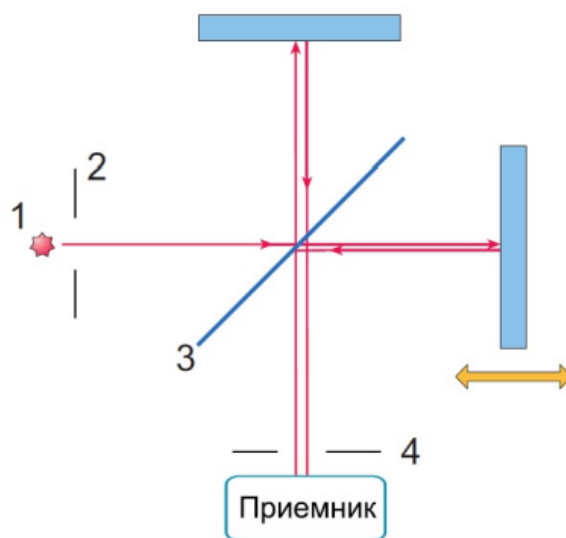


Рисунок 2 – Принципиальная схема прибора на основе интерферометра Майкельсона.

В основе установки интерферометр (здесь - Майкельсона). При монохроматическом освещении входного отверстия интерферометра и при равномерном перемещении подвижного зеркала со скоростью  $v$ , приемником излучения, расположенным за выходной диафрагмой интерферометра, будет регистрироваться переменный сигнал  $\Phi(x)$ , соответствующий прохождению через выходную диафрагму интерферометра максимумов и минимумов интерференционной картины:

$$\Phi(x) \sim B \cos^2(\pi\nu x) = \frac{B}{2}(1 + \cos(2\pi\nu x))$$

Здесь  $B$  - яркость светового потока на входе в интерферометр,  $x$  - разность хода, равная удвоенной величине перемещения зеркала и линейно зависящая от времени (при равномерной скорости движения зеркала),  $\nu$  - частота излучения в  $\text{см}^{-1}$ . Тогда переменная составляющая зарегистрированный сигнал равна:

$$\Phi(x) = \Phi_0 \cos(2\pi\nu x) = \Phi_0 \cos(2\pi f t),$$

где  $f = \nu v = \frac{v}{\lambda}$  - частота модуляции. Таким образом, при монохроматическом освещении входной щели интерферометра приемник излучения регистрирует синусоидальный сигнал.

Если входное отверстие интерферометра освещено излучением с непрерывным спектром, занимающим область частот от  $\nu_1$  до  $\nu_2$ , то сигнал, регистрируемый приемником, имеет вид:

$$\Phi(x) \sim \int_{\nu_1}^{\nu_2} B_\nu(\nu) \cos(2\pi\nu x) d\nu,$$

где  $B_\nu(\nu)$  - спектральная яркость. Данное выражение является фурье-преобразованием функции  $B_\nu(\nu)$ . Спектральная яркость излучения восстанавливается с помощью обратного преобразования Фурье зарегистрированного сигнала:

$$B_\nu(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} \Phi(x) D(x) \cos(2\pi\nu x) dx$$

## Экспериментальная установка

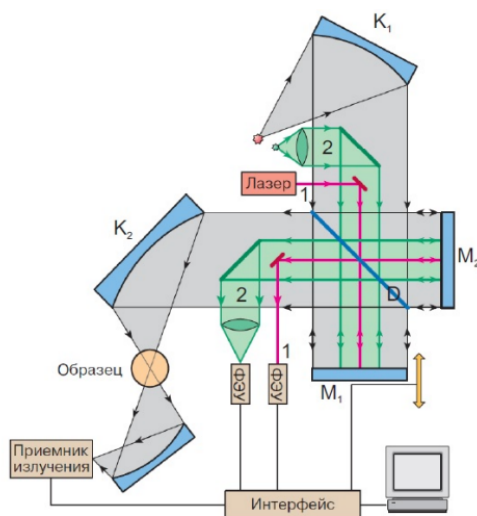


Рисунок 3 – Схема устройства фурье-спектрометра

Типичная оптическая схема Фурье-спектрометра использует интерферометр Майкельсона. Прошедший через входную диафрагму свет падает на коллиматорное зеркало  $K_1$  и параллельным пучком направляется на светоделитель  $D$ . Светоделитель обычно представляет собой прозрачную плоскопараллельную пластину с покрытием. Идеальный светоделитель должен отражать и пропускать ровно по 50% света и не иметь поглощения во всей спектральной области работы прибора. После светоделителя прошедший и отраженный пучки попадают на отражающие зеркала  $M_1$  и  $M_2$ . Выходящее из интерферометра излучение фокусируется зеркальным объективом  $K_2$  в месте, куда помещается образец. После этого свет фокусируется на приёмнике излучения.

Важным элементом оптической схемы является система измерения разности хода между зеркалами интерферометра. Для этой цели в него вводится излучение одномодового лазера (обычно это лазер He-Ne). После прохождения через интерферометр монохроматический пучок генерирует при движении зеркала синусоидальный сигнал на специальном приёмнике.

## Обработка результатов и обсуждение

### Методика

Установили приставку НПВО.

Сняли базовую линию (в режиме регистрации Опорного спектра) воздуха в диапазоне 500-3000  $\text{см}^{-1}$ , разрешение 4  $\text{см}^{-1}$ , 100 накоплений.

Сняли спектр чистого скотча (в диапазоне 500-3000  $\text{см}^{-1}$ , разрешение 4  $\text{см}^{-1}$ , 100 накоплений, здесь и далее настройки сохраняются).

Нанесли порошки (альбумин (рис. 5), гемоглобин(рис. 6), триптофан(рис. 7)) на клейкую сторону полоски скотча шириной 5-7 мм и сняли спектр порошков.

Нанесли большую каплю раствора Дерината (рис. 8) (а также альбумин) на полиэтиленовую пленку, помещенную на электрическую плитку. Высушили образец при температуре 50  $^{\circ}\text{C}$ . После высушивания перенесли каплю на клейкую сторону полоски скотча и сняли спектр.

### Анализ спектров макромолекул

1. Наиболее интенсивный пик поглощения клейкой основы скотча наблюдаем при  $\nu = 1731.55 \text{ см}^{-1}$ . В большинстве спектров белков этого пика мы не наблюдаем.

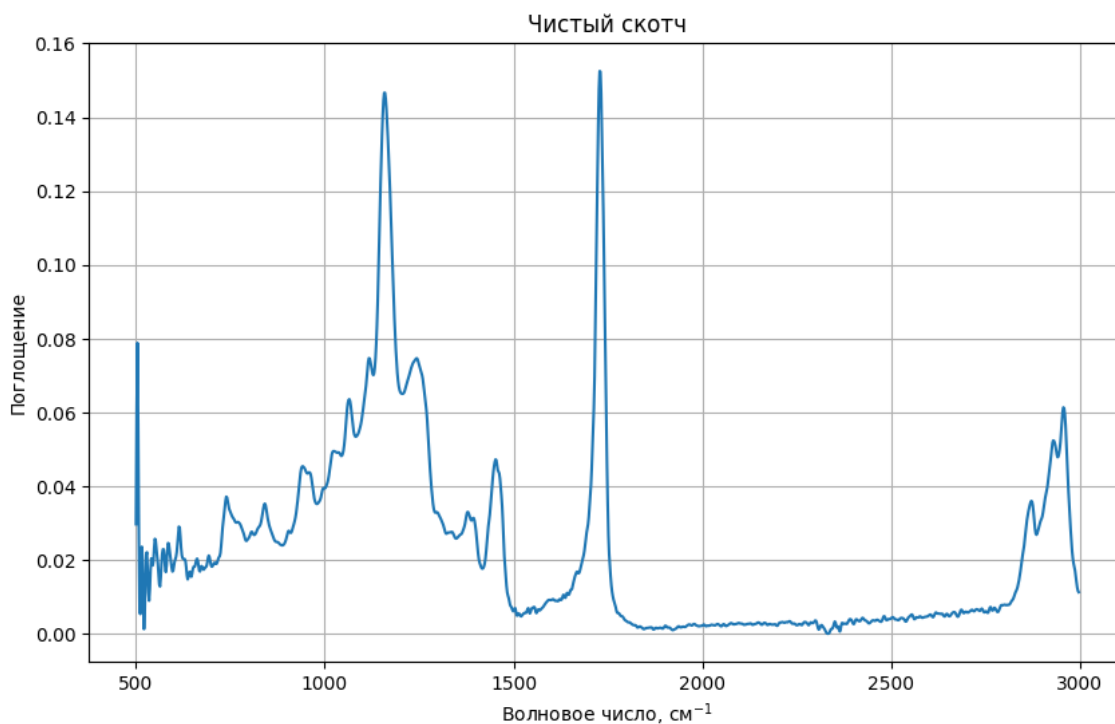


Рисунок 4 – ИК-спектр скотча

2. Были найдены характерные полосы Амид для спектров альбумин и гемоглобина. Ниже приведена таблица с результатами:

белок	Пик Амид I, $\text{см}^{-1}$	Пик Амид II, $\text{см}^{-1}$
Альбумин	1657.12	1527.87
Гемоглобин	1641.68	1531.72
Табл. (G. Socrates, 2004)	1660	1550

Пики поглощения лежат в характерной для них области (Амид I:  $1690 - 1630 \text{ см}^{-1}$ , Амид II:  $1550 - 1520 \text{ см}^{-1}$ ), что говорит о том, что мы можем считать спектры корректными.

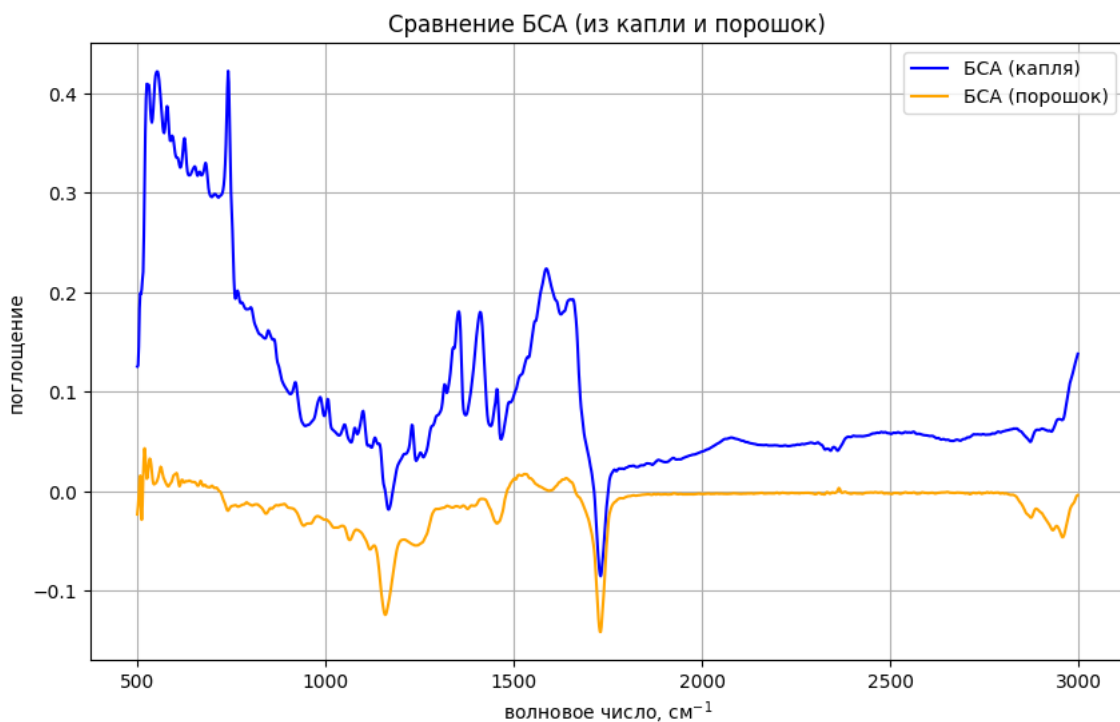


Рисунок 5 – Сравнение ИК-спектров БСА

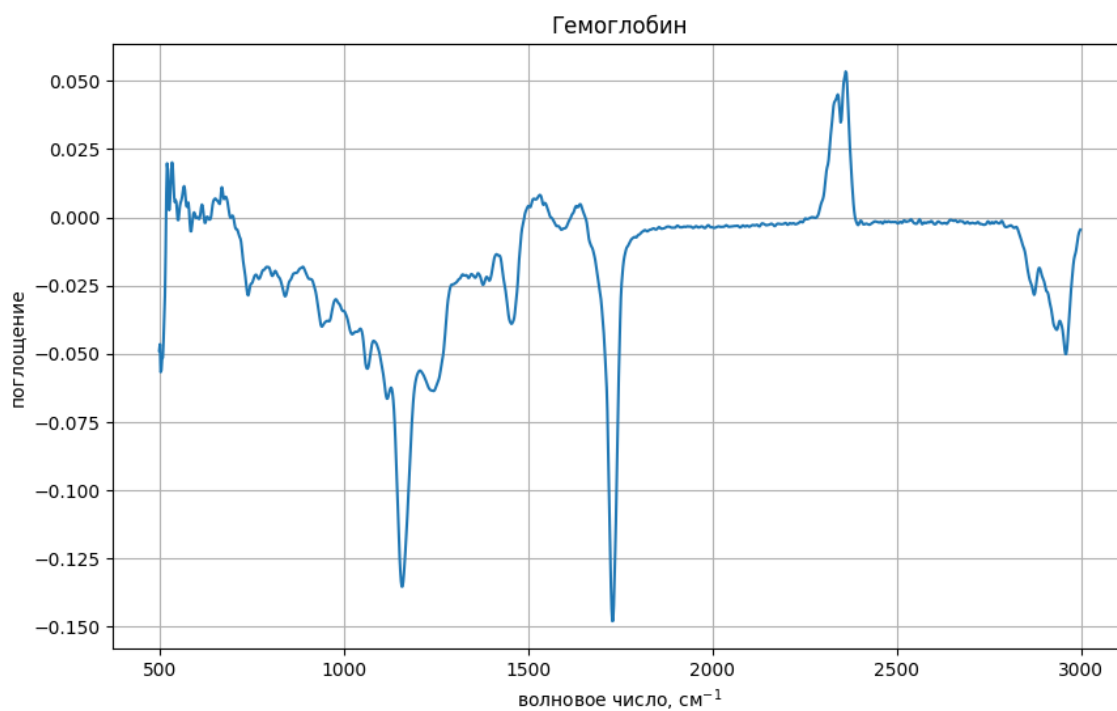


Рисунок 6 – ИК-спектр порошкообразного гемоглобина

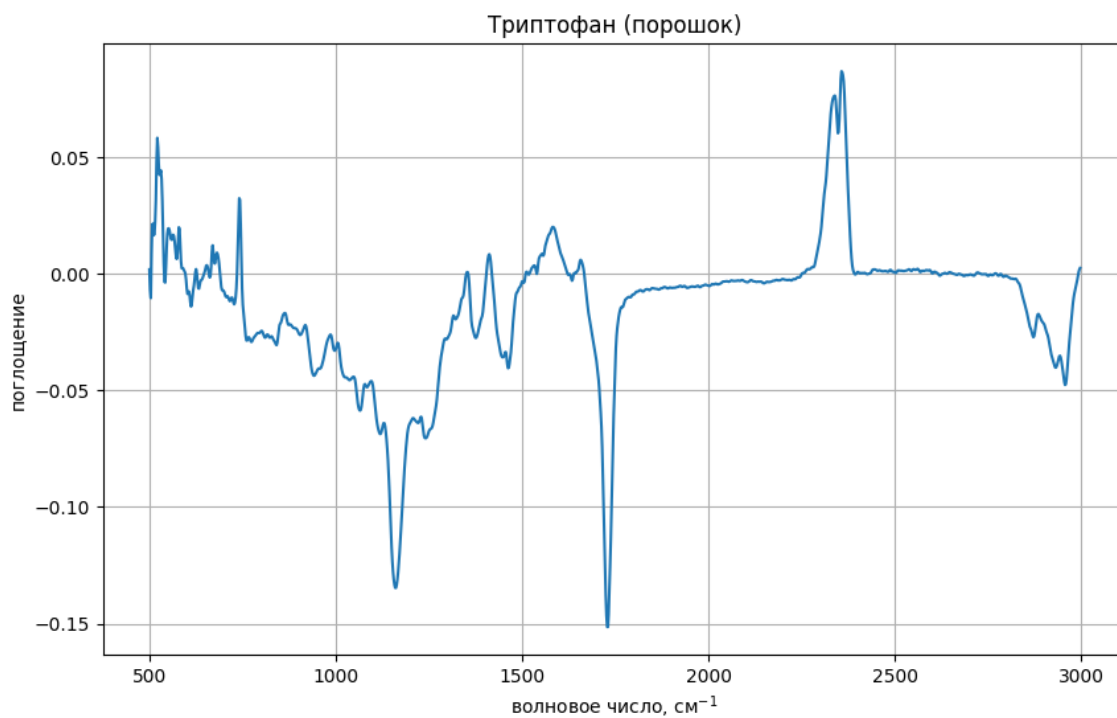


Рисунок 7 – ИК-спектр триптофана

3. Была проанализирована плёнка Дерината, приготовленная методом высушивания капли раствора Дерината с концентрацией 2,5 мг/мл.

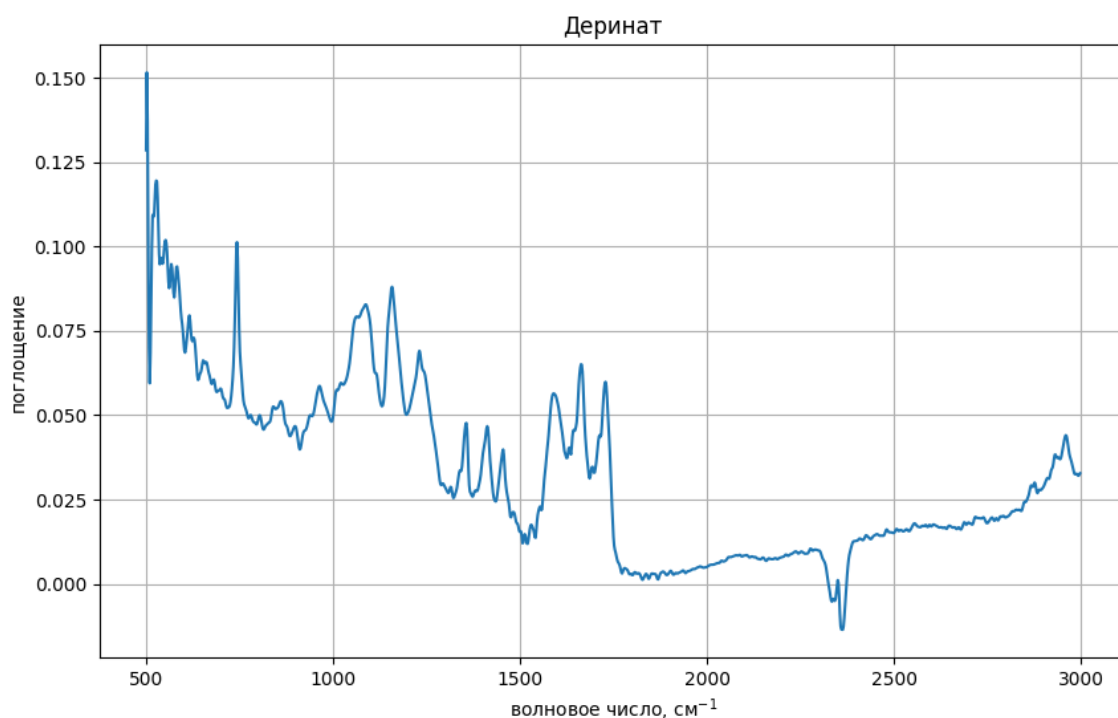


Рисунок 8 – ИК-спектр Дерината

Данный спектр был сравнен со спектром из [1]. Положения основных пиков совпали с литературными данными.

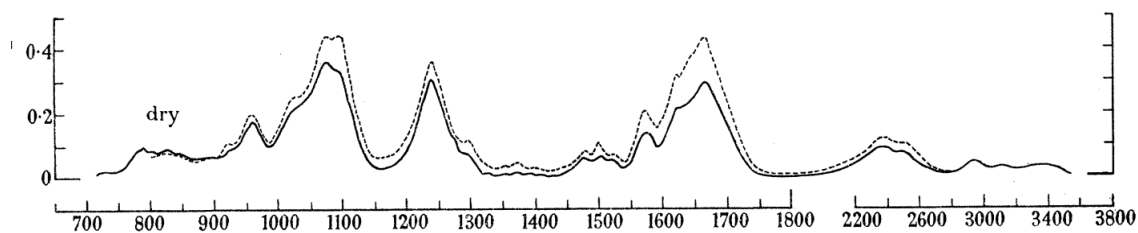


Рисунок 9 – ИК-спектр Дерината (литературные данные)

4. Было произведено сравнение спектров альбумин-гемоглобин, альбумин-триптофан и гемоглобин-триптофан. Наиболее интенсивный совпадающий пик был обнаружен при частоте  $\nu = 1455.87$  и 2300-2400 см<sup>-1</sup> для пар альбумин-триптофан и гемоглобин-триптофан. В литературе [2] указано, что именно при 1455.87 см<sup>-1</sup> находится пик, соответствующий остатку триптофана в альбумине. Из этого можно сделать предположение, что в гемоглобине этот пик также соответствует остатку триптофана.



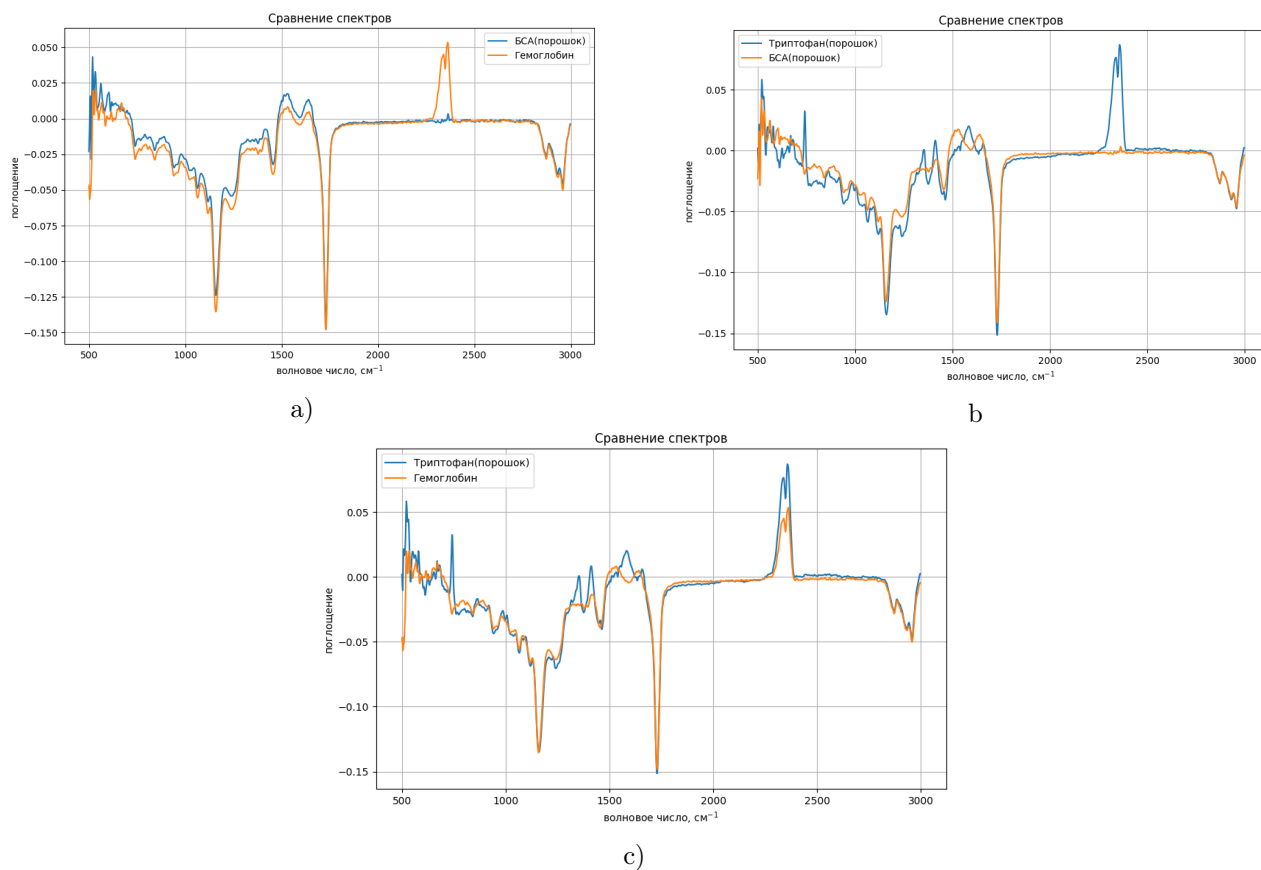


Рисунок 10 – Сравнение спектров: а) ИК-спектры альбумина и гемоглобина, б) ИК-спектры альбумина и триптофана, с) ИК-спектры гемоглобина и триптофана.

5. Спектр HCl наблюдался в области длин волн  $\lambda = 3.3$  мкм (рис. 12). На спектре хлороводорода Р и R-ветвях: с увеличением  $j$  интенсивность вращательных линий сначала возрастает (из-за линейного роста степени вырождения вращательных уровней), потом постепенно падает (из-за низкой заселённости высоких энергетических уровней).

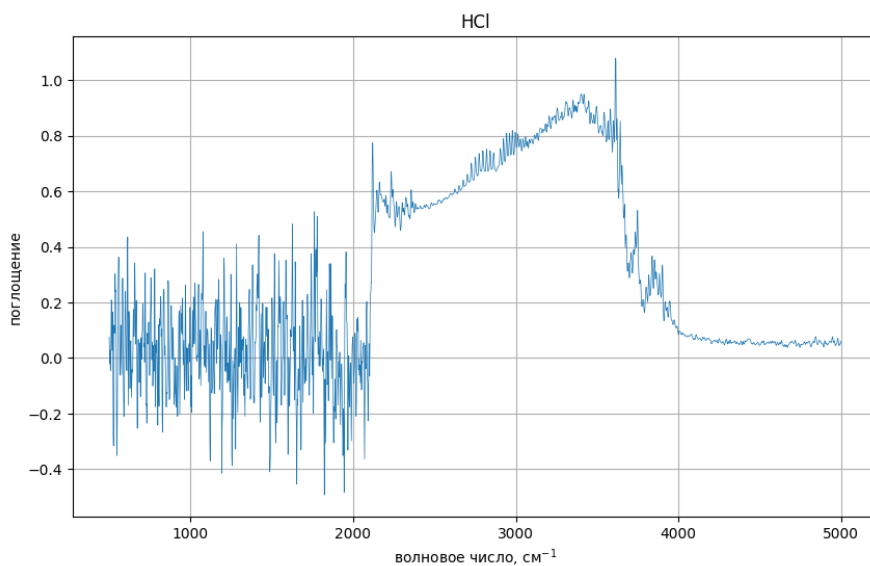


Рисунок 11 – Спектр хлороводорода

6. Был произведен анализ вторичной структуры альбумина по пику Амид I. Для этого был построен график второй производной спектра в области Амид I. Далее была произведена коррекция базовой линии (локальные минимумы были аппроксимированы многочленом, впоследствии из второй производной аппроксимация была вычтена). Для определения соотношения составляющих вторичной структуры были посчитаны площади под графиком, которые соотносятся с данными [3].

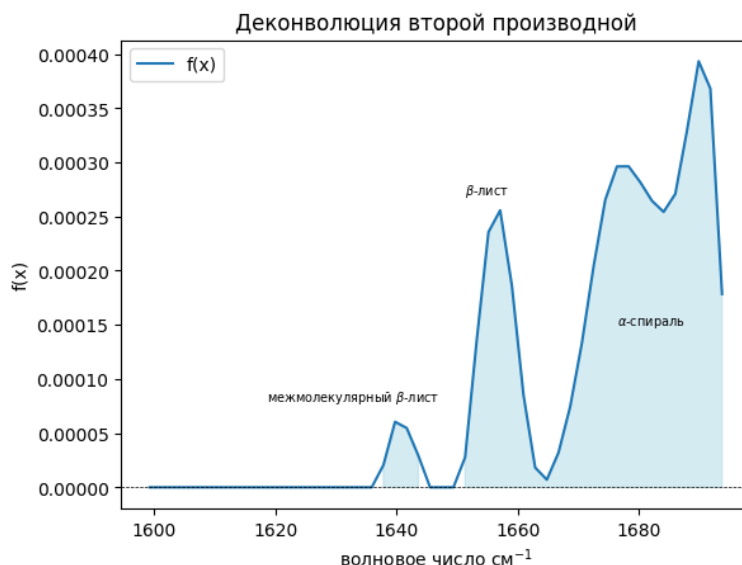


Рисунок 12 – Деконволюция второй производной в области Амид I для альбумина

Структура	Площадь, %
Межмолек. $\beta$ -лист	3,9
$\beta$ -лист	20,5
$\alpha$ -спираль	75,9

Таблица 1 – Процентное содержание структур в альбумине.

## Выводы

1. В спектрах белков найдены характерные полосы Амид: альбумин ( $1657.12 \text{ см}^{-1}$  (Амид I),  $1527.87 \text{ см}^{-1}$  (Амид II)), гемоглобин ( $1641.68 \text{ см}^{-1}$  (Амид I),  $1531.72 \text{ см}^{-1}$  (Амид II))
2. Проведено попарное сравнение спектров гемоглобин-альбумин, гемоглобин-триптофан, альбумин-триптофан. На спектрах гемоглобин-триптофан и альбумин-триптофан найдены пики, соответствующие остатку триптофана в белках.
3. Проанализирована вторичная структура альбумина деконволюцией второй производной.

## Приложения

1. Gordon Brims Black Mcivor Sutherland and M. Tsuboi. The infra-red spectrum and molecular configuration of sodium deoxyribonucleate, 451 (1957).
2. Интерпретация ИК и КР спектров альбумина. Г. Н. Тен, А. Ю. Герасименко, Н. Е. Щербакова, В. И. Баранов.
3. Сравнение методик расчета вторичной структуры белков на основе деконволюции инфракрасных спектров. Д.А. Усольцев, В.Е. Ситникова, Т.Н. Носенко, Р.О. Олехнович, М.В. Успенская