

МОСКОВСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ (НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

Физтех-школа биологической и медицинской физики

Отчёт о выполнении лабораторной работы
Инфракрасная спектроскопия поглощения.
Колебательно-вращательные спектры двухатомных
молекул.

Авторы:
Акимов Максим
Кондратюк Наталья

Б06-206

Долгопрудный
18 ноября 2024 года

1 Аннотация

Цель работы : Зарегистрировать и проанализировать ИК-спектры поглощения ряда белков, дерината и соляной кислоты.

Задачи :

- Снять спектр поглощения опорного образца (воздуха), спектры поглощения образцов (гемоглобин, альбумин, триптофан, деринат) и скотча.
- Снять спектр спектр поглощения HCl, предварительно нагрев до образования паров.
- Провести анализ полученных спектров белков.
- Сравнить спектр дерината с литературными данными.
- Провести анализ вторичной структуры альбумина.

2 Введение

2.1 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 α_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 (рис. 1) состоят из R-ветви - совокупности линий, для которых выполняется условия $\Delta j = +1$ и из P-ветви, где $\Delta j = -1$. Между сериями P и R-ветвей находится так называемый нулевой промежуток (начало полосы) ν_0 . Он соответствует чисто колебательному переходу $j'' = 0 \rightarrow j' = 0$, который для большинства двухатомных молекул запрещен правилами отбора. Поэтому отсчет P-линий начинается с $j = j'' = 1$. Ветвь R всегда расположена со стороны больших частот от ν_0 , а первая наблюдаемая линия соответствует $j = 0$.

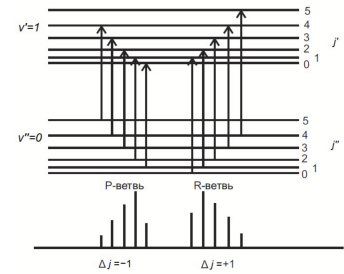


Рис. 1: P- и R-ветви колебательно-вращательного спектра двухатомной молекулы

2.2 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, ΔE_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.

2.3 FTIR-спектроскопия

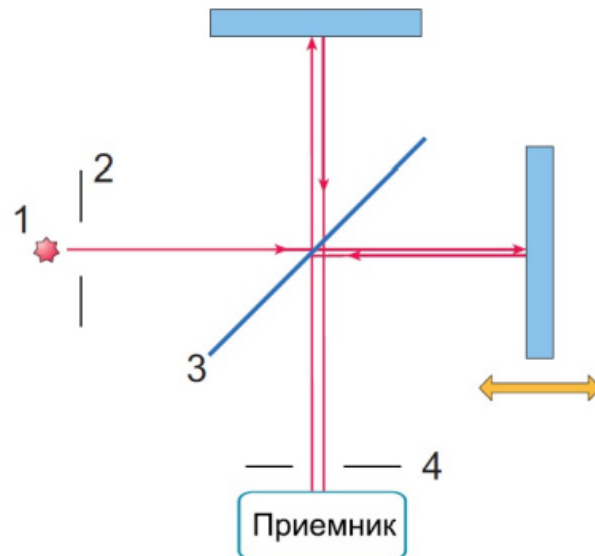


Рис. 2: Принципиальная схема прибора на основе интерферометра Майкельсона.

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), ν - частота излучения в 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 $f = \nu\nu = \frac{v}{\lambda}$ - 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 ν_1 до ν_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:

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

3 Экспериментальная установка

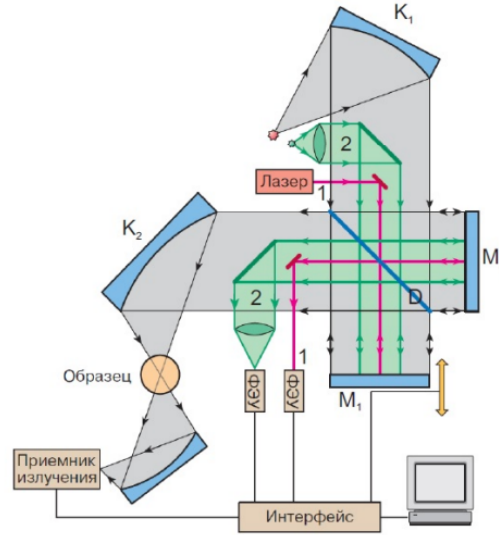


Рис. 3: Схема устройства фурье-спектрометра

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.

4 Результаты и обсуждение

4.1 Спектр скотча

Согласно методическому пособию были подготовлены порошки белков и жидкие образцы. Все измерения необходимо было регистрировать на скотче, плотно засыпав клейкую часть веществом - даже в таком случае на спектре есть возможность снять спектр скотча. Для исключения лишних пиков проведём регистрацию спектра скотча (рис. 4).

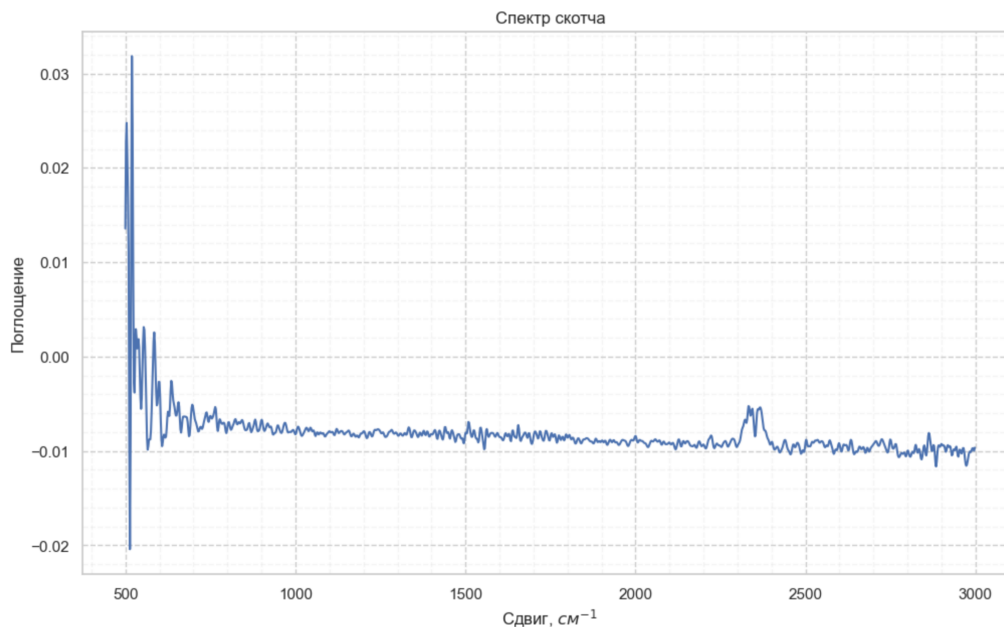


Рис. 4: Спектр поглощения скотча

Здесь мы столкнулись с проблемой регистрации спектров на данной установке - отсутствие явных чётких пиков поглощения для образцов на скотче и самого скотча. Дальнейшие измерения проводились с порошком, плотно насыпанным в лунку детектора. Также, не удалось установить пик поглощения скотча для нормировки следующих спектров.

4.2 Анализ FTIR спектров белков

В работе было проведено снятие спектров следующих порошков: альбумина, гемоглобина и триптофана. Для начала проанализируем полученные спектры, сравнив основные пики, называемые Амидами с литературными данными.

БСА

Снятый спектр и его усечённый вариант представлены на Рис. 5 и Рис. 6, соответственно.

Сравним полученные данные пиков с теоретическими (взяты из [1]). Соберём все численные значения в Таблице 1:

Таблица 1: Сравнение теоретических и экспериментальных пиков БСА.

	Теоретический диапазон	Экспериментальное значение
Пик Амид I, см^{-1}	1600 - 1690	1659,05
Пик Амид II, см^{-1}	1480 - 1575	1581,88

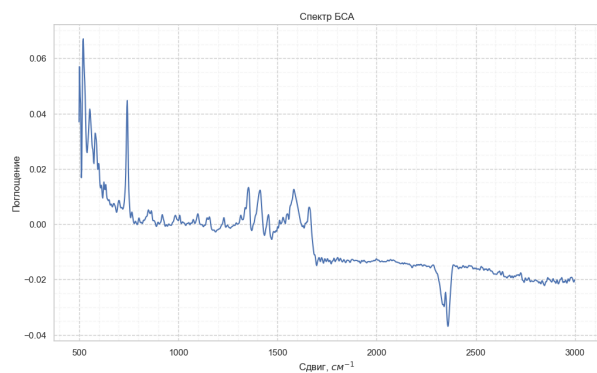


Рис. 5: Спектр поглощения БСА (порошок)

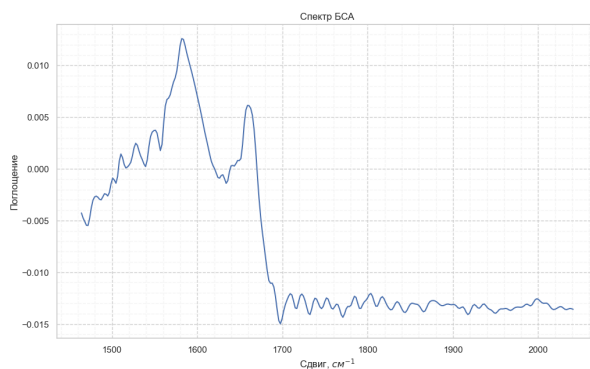


Рис. 6: Усечённый вариант спектра с интересующими пиками

Гемоглобин

Повторим те же самые эксперименты с гемоглобином на Рис. 7 и Рис. 8.

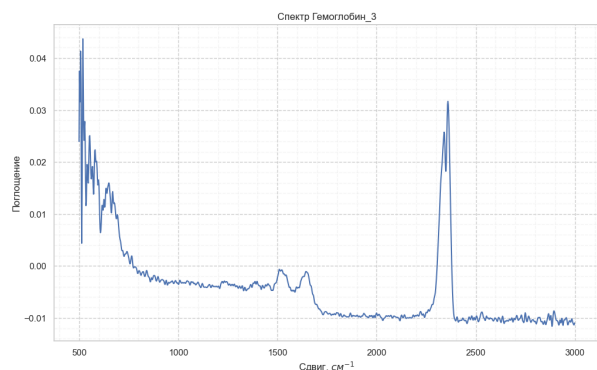


Рис. 7: Спектр поглощения БСА (порошок)

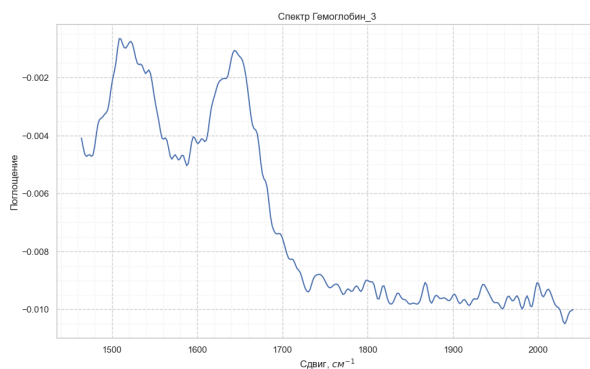


Рис. 8: Усечённый вариант спектра с интересующими пиками

Сравним полученные данные пиков с теоретическими (взятых из [1]) в Таблице 2:

Таблица 2: Сравнение теоретических и экспериментальных пиков БСА.

	Теоретический диапазон	Экспериментальное значение
Пик Амид I, см^{-1}	1600 - 1690	1643,61
Пик Амид II, см^{-1}	1480 - 1575	1508,57

Триптофан

И ещё раз проведём те же самые эксперименты с триптофаном на Рис. 9 и Рис. 10.

Сравним полученные данные пиков с теоретическими (взятых из [1]) в Таблице 3:

Таблица 3: Сравнение теоретических и экспериментальных пиков триптофана.

	Теоретический диапазон	Экспериментальное значение
Пик Амид I, см^{-1}	1600 - 1690	1662,9
Пик Амид II, см^{-1}	1480 - 1575	1581,88

БСА и гемоглобин Теперь будем проводить сравнительные анализы спектров. Начнём со спектров БСА и Гемоглобина.

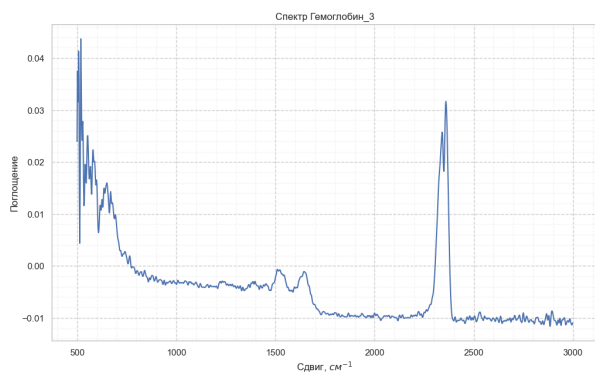


Рис. 9: Спектр поглощения триптофана (порошок)

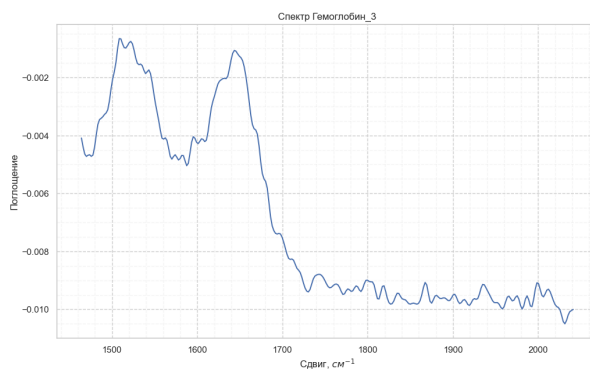


Рис. 10: Усечённый вариант спектра с интересующими пиками



Рис. 11: Спектры БСА и гемоглобина

На Рис. 11 можно отметить, что в малочастотной области можно наблюдать пики, соответствующие так называемым "отпечаткам пальцев" которые у каждой молекулы свои. В области Амид 1 и Амид 2 можно так же отметить сдвиг пиков БСА вправо, относительно гемоглобина.

БСА и триптофан Сравним теперь спектры БСА и триптофана (Рис. 12).

Можно заметить, что спектры очень похожи и отличаются лишь интенсивностью. И триптофан, и БСА абсолютно совпадают по пику Амид 2: $1581,88 \text{ см}^{-1}$. Пики Амид 1 также находятся крайне близко: $1662,9 \text{ см}^{-1}$ и $1659,05 \text{ см}^{-1}$. Таким образом, можно с уверенностью говорить, что БСА определённо содержит триптофан.

Гемоглобин и триптофан

И последние спектры гемоглобина и триптофана (Рис. 13).

В целом, два пика триптофана и у гемоглобина можно совместить. Таким образом, скорее всего в гемоглобине есть триптофан.

Вторичная структура альбумина.

Произведём анализ вторичной структуры альбумина по пику Амид I. Для этого построим график второй

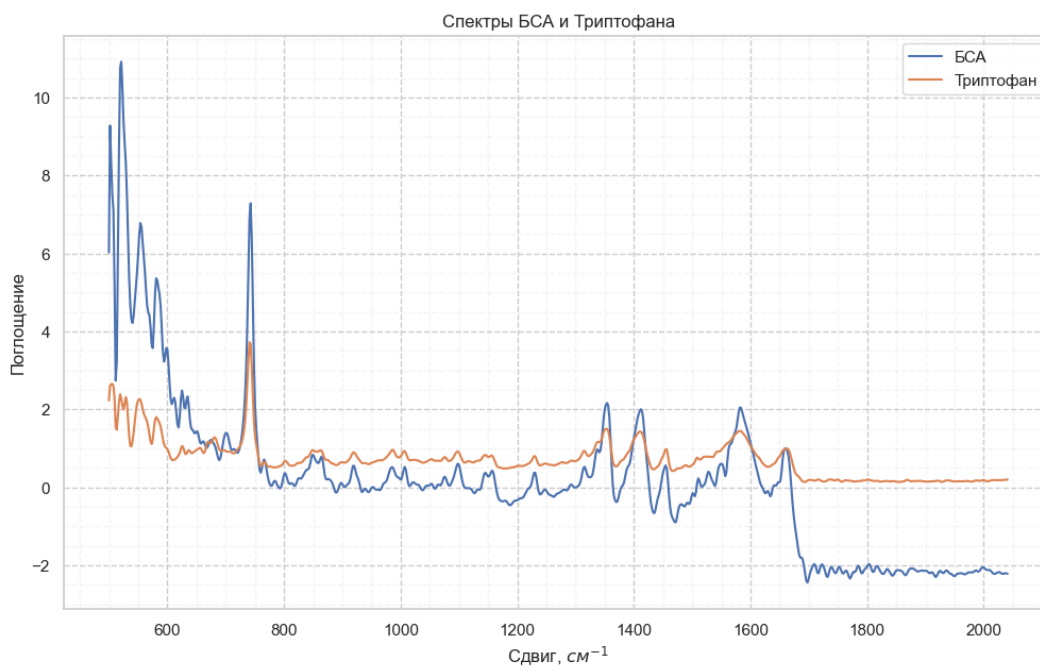


Рис. 12: Спектры БСА и триптофана

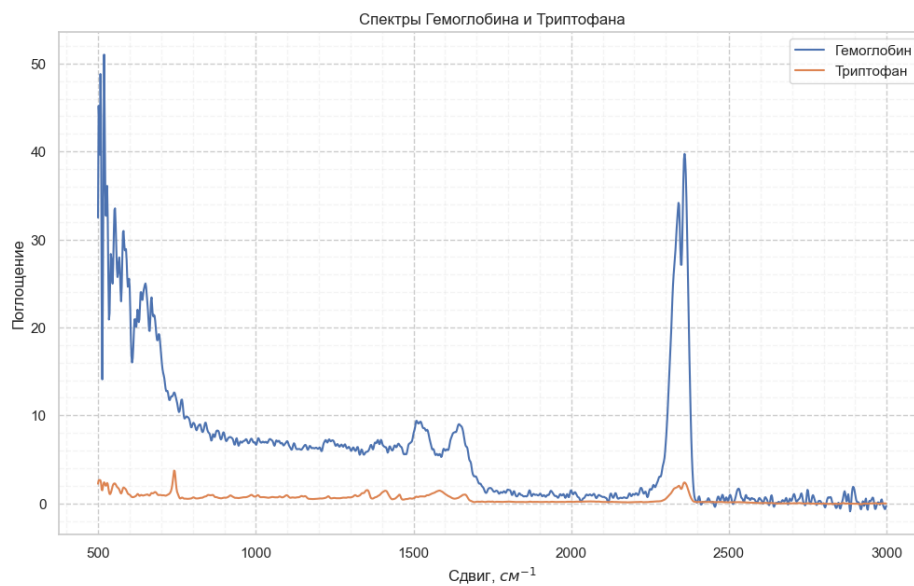


Рис. 13: Спектры гемоглобина и триптофана

производной спектра в области Амид I и проведём анализ графика на пики. Далее была произведена коррекция базовой линии. Для определения соотношения составляющих вторичной структуры были посчитаны площади под графиком, которые почти соотносятся с данными из [2]. Результаты представлены на Рис. 14 и в Таблице 4.

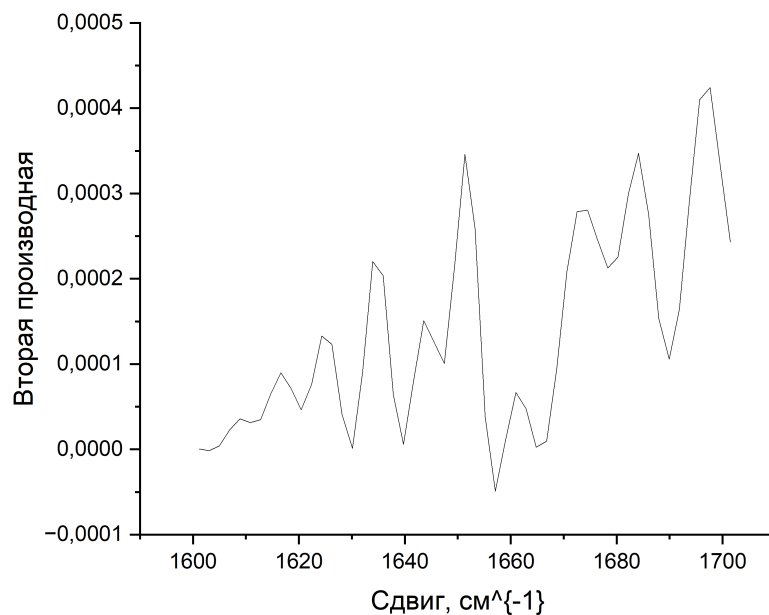


Рис. 14: Пики вторичной структуры БСА

Таблица 4: Процентное содержание структур в альбумине.

Структура	Площадь, %
β - поворот	26,6
β - лист	13,1
α - спираль	62,3

4.3 Анализ спектра дерината

Действующим веществом дерината является натрия дезоксирибонуклеат, также в состав входит вода и натрия хлорид. Удалось закристаллизовать двойную каплю дерината и снять спектр поглощения без плёнки. Сравним экспериментальный спектр (рис. 15) с эталонным (рис.16).

Пики поглощения в эксперименте оказались не такими яркими, как для порошков. Однако пики в районе 1050 и 1250 см^{-1} хорошо отличимы и совпадают с литературными данными на рис. 16. Пики в районе 1650 см^{-1} различимы уже намного хуже.

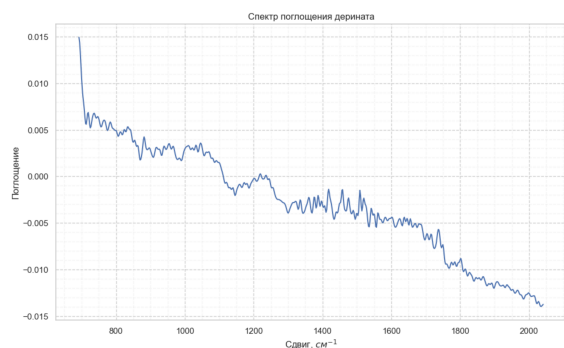


Рис. 15: Экспериментальный спектр поглощения деривата

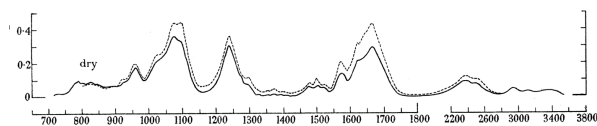


Рис. 16: Эталонный спектр поглощения деривата [3]

4.4 Спектр поглощения паров соляной кислоты

Для регистрации спектра паров соляной кислоты (рис. 17) приставка в установке была заменена на штатив с разогретой трубкой, заполненной газообразным HCl .

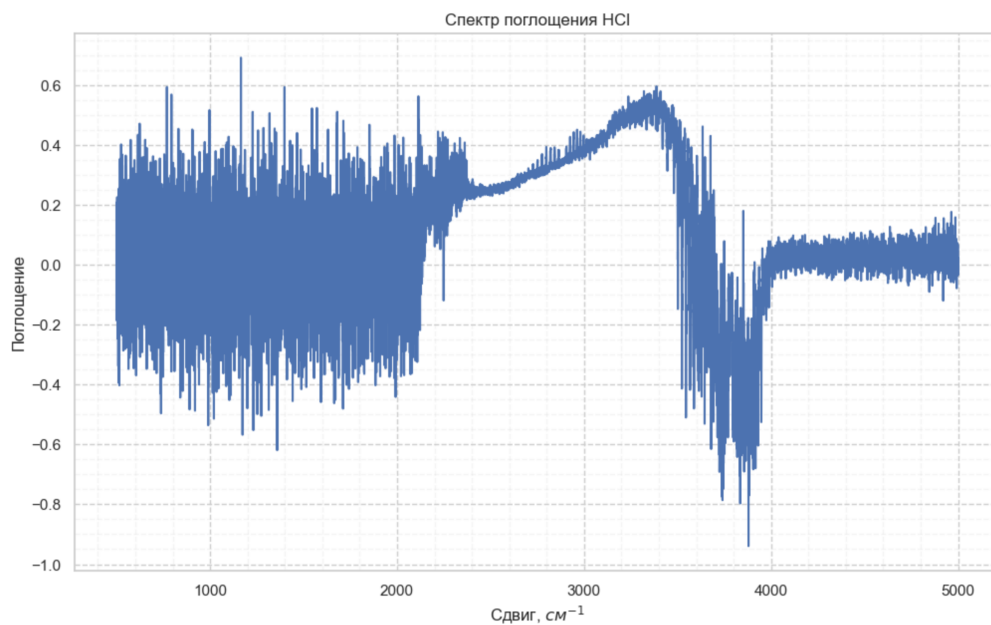


Рис. 17: Спектр поглощения паров соляной кислоты

На спектре хлороводорода в диапазоне $2700\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ заметны Р и R-ветви, причём с увеличением квантового числа интенсивность вращательных линий сначала возрастает (из-за линейного роста степени вырождения вращательных уровней), а потом постепенно падает (из-за низкой заселённости высоких энергетических уровней).

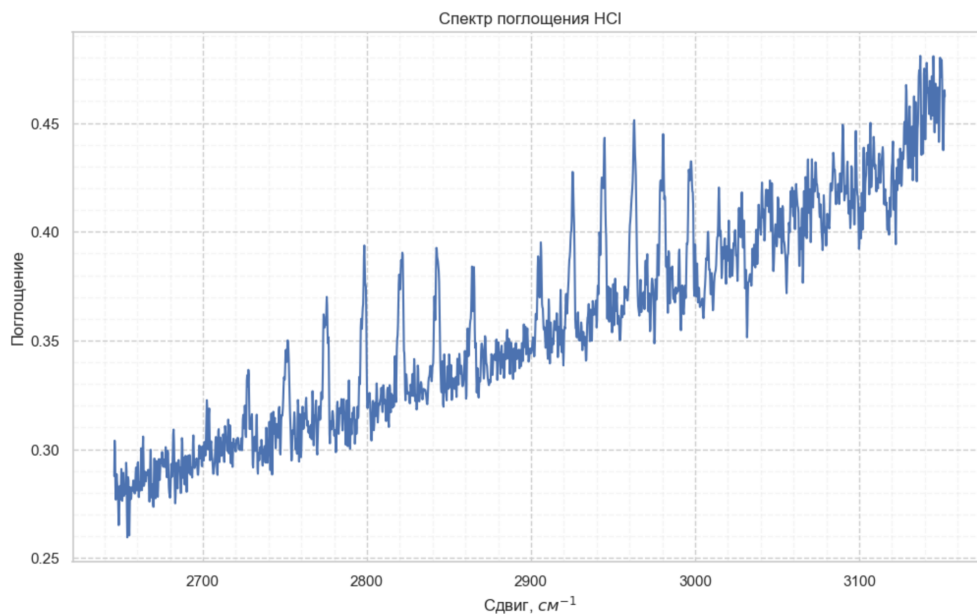


Рис. 18: Р-ветви (слева) и R-ветви (справа) на спектре поглощения HCl

5 Выводы

- В ходе выполнения работы столкнулись с особенностями работы установки, в результате чего модифицировали методику регистрации пиков на спектре поглощения. Пики, соответствующие поглощению клеейкой основы зарегистрированы не были, поэтому при обработке нормировка не использовалась.
- В ходе работы был проведён анализ спектров белков (БСА и гемоглобина), также сравнительный анализ спектров белков и триптофан. Полученные значения частот попадают в теоретические диапазоны из приведённых источников.
- Дополнительно, был изучен спектр альбумина для определения его вторичной структуры с помощью второй производной. Приведённые соотношения вполне соответствуют литературным данным.
- Был получен спектр поглощения дерината (натрия дезоксирибонуклеата) - основные пики поглощения совпали с литературными данными.
- На спектре поглощения паров соляной кислоты были зарегистрированы Р- и R-ветви колебательно-вращательных полос, причём с увеличением квантового числа интенсивность вращательных линий сначала возрастает, а потом постепенно падает.

6 Список литературы.

1. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007 Aug;39(8):549-59. doi: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x. PMID: 17687489.
2. Усольцев Д. А., Ситникова В. Е., Носенко Т. Н., Олехнович Р. О., Успенская М. В. Сравнение методик расчета вторичной структуры белков на основе деконволюции инфракрасных спектров // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. №4.
3. Gordon Brims Black Mcivor Sutherland and M. Tsuboi. The infra-red spectrum and molecular configuration of sodium deoxyribonucleate, 451 (1957).