

Инфракрасная спектроскопия поглощения.
Колебательно-вращательные спектры двухатомных и
многоатомных молекул.

Автор

2 сентября 2024 года

Содержание

1 Цели и задачи

Работа предназначена для ознакомления с основами абсорбционной молекулярной спектроскопии инфракрасного диапазона на примере двухатомной молекулы хлороводорода HCl и нескольких белковых молекулах (триптофан, деринат, гемоглобин, альбумин). Целью работы является знакомство с работой на фурье-спектрометре, изучение структуры колебательно-вращательного спектра, экспериментальное определение вращательных молекулярных постоянных путём статистической обработки спектроскопических данных.

2 Введение

2.1 Молекулярные спектры

Расстояние между вращательными энергетическими уровнями для типичной двухатомной молекулы составляет $1-10 \text{ см}^{-1}$, в то время как расстояние между ее колебательными уровнями близко к $10^3-10^4 \text{ см}^{-1}$. Так как энергии двух этих систем настолько различны, то в первом приближении можно считать их независимыми, то есть считать, что колебания молекулы не влияют на ее вращательные состояния и наоборот. Такое приближение равносильно предположению о том, что колебательно-вращательная энергия есть сумма отдельных энергий:

$$E = E_{\text{кол}} + E_{\text{вращ}} \quad (1)$$

Излучательный спектр молекулы формируется переходами, энергия которых равна разнице энергий молекулы в верхнем и нижнем состояниях. При независимом рассмотрении колебательного и вращательного движений энергию такого излучения можно записать в виде:

$$h\nu = \Delta E_{\text{кол}} + \Delta E_{\text{вращ}} \quad (2)$$

Однако в реальности изменение колебательной энергии обычно сопровождается изменением вращательной энергии. Именно такие спектры называют колебательно-вращательными. Расположение полос в колебательно-вращательных спектрах определяется величиной изменения колебательной энергии $E_{\text{кол}}$, а положение отдельных линий в полосе — величиной изменения вращательной энергии $E_{\text{вращ}}$.

2.1.1 Вращательные уровни и вращательный спектр

В первом приближении можно считать, что молекула представляет собой жесткий ротатор, то есть расстояние между атомами молекулы не зависит от энергии ее вращения, которая определяется следующим выражением:

$$E = \frac{I\omega^2}{2} = \frac{L^2}{2I} \quad (3)$$

где ω - 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:

$$L^2 = \hbar^2 \cdot j(j+1) \quad (4)$$

где величина $j = 0, 1, 2, \dots$ называется вращательным квантовым числом. Учитывая ??, получаем для энергии вращения выражение:

$$E_j = \frac{\hbar^2}{2I} \cdot j(j+1) = \frac{h^2}{8\pi^2 I} \cdot j(j+1) \quad (5)$$

Однако энергия в ?? имеет размерность [Дж], и для пересчета ее в см^{-1} используют формулу ?? с значением вращательной постоянной $B = \frac{h}{8I\pi^2 c} \text{ см}^{-1}$:

$$\epsilon_j = \frac{E_j}{hc} = \frac{h}{8\pi^2 I c} \cdot j(j+1) = B \cdot j(j+1) \quad (6)$$

Возможные чисто вращательные переходы определяются правилом отбора:

$$\Delta j = \pm 1$$

то есть возможны лишь переходы между соседними вращательными уровнями. Используя выражение для вращательных уровней энергии ??, можно определить энергии (частоты) возможных переходов (излучение или поглощение):

$$\Delta\varepsilon = 2Bj. \quad [\text{см}^{-1}] \quad (7)$$

Таким образом вращательный спектр состоит из ряда равноотстоящих по шкале частот линий, расположенных в далекой инфракрасной или микроволновой области, и расстояние между соседними линиями равно $2B$. Однако в действительности молекула не является жестким ротатором и такое приближение не является точным, так как при вращении из-за центробежной силы расстояние между ядрами увеличивается. Учесть это влияние можно следующей поправкой:

$$\varepsilon_j = B \cdot j(j+1) - D \cdot j^2(j+1)^2. \quad [\text{см}^{-1}] \quad (8)$$

При этом величина D обычно порядка $10^{-6} \div 10^{-3} \text{см}^{-1}$, при B около $10^{-1} \div 10^2 \text{см}^{-1}$, поэтому у легких молекул поправку на центробежное натяжение нужно вносить и при малых j , а у тяжелых - только при больших вращательных числах $j \geq 10$.

2.1.2 Колебательные уровни и колебательный спектр

Модель гармонического осциллятора позволяет корректно описывать положение нижних колебательных уровней молекулы. Потенциальная энергия движения ядер при расстояниях r , близких к равновесному r_e :

$$u(r) = \frac{k \cdot (r - r_e)^2}{2} \quad (9)$$

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

$$\varepsilon_v = \omega_e \cdot \left(v + \frac{1}{2}\right) \quad (10)$$

где $v = 0, 1, 2, \dots$ - колебательное квантовое число, ω_e - собственная частота осциллятора, выраженная в см^{-1} :

$$\omega_e = \frac{\nu_e}{c} = \frac{1}{2\pi c} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (11)$$

μ - приведённая масса молекулы. Для колебательных переходов гармонического осциллятора верно: $\Delta v = \pm 1$. Частота излучения, соответствующего колебательным переходам, не зависит от номера уровня и составляет $\varepsilon_{v+1 \rightarrow v} = \omega_e$. Для более точного описания колебательного движения двухатомной молекулы используют эмпирическую зависимость $u(r)$ потенциальной энергии ядер от расстояния r между ними в форме:

$$u(r) = D_e [1 - e^{\beta(r-r_e)}]^2 \quad (12)$$

D_e - энергия диссоциации молекулы, r_e - равновесное расстояние между ядрами в ней. Последовательность разрешённых уровней колебательной энергии:

$$\varepsilon_v = \omega_e \left(v + \frac{1}{2}\right) - \omega_e x_e \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 \quad (13)$$

где x_e - постоянная ангармоничности ($x_e \sim 0,01$). Энергетические уровни сгущаются по мере приближения к границе диссоциации. Рис. 1 иллюстрирует слова выше на примере кривой потенциальной энергии и колебательных уровней для двухатомной молекулы. Правила отбора для ангармонического осциллятора разрешают излучательные переходы с изменением колебательного квантового числа более чем на единицу: $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \dots$. Заметной интенсивностью обладают лишь линии с $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3$.

2.1.3 Колебательно-вращательный спектр двухатомной молекулы

Так как в течение одного оборота молекула совершает около тысячи колебаний, следует считать что длина связи постоянно меняется и колебания и вращение не являются независимыми. При гармонических колебаниях длина связи r_{cp} будет равна равновесной r_e , а в случае ангармонических колебаний она будет увеличиваться

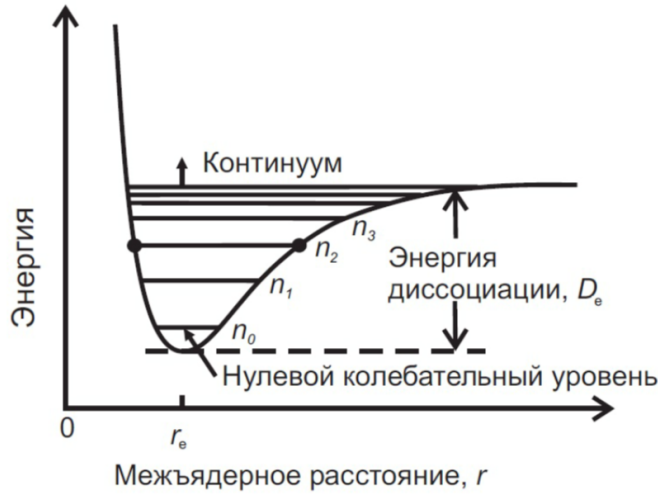


Рис. 1: Вид кривой потенциальной энергии и схема колебательных уровней двухатомной молекулы

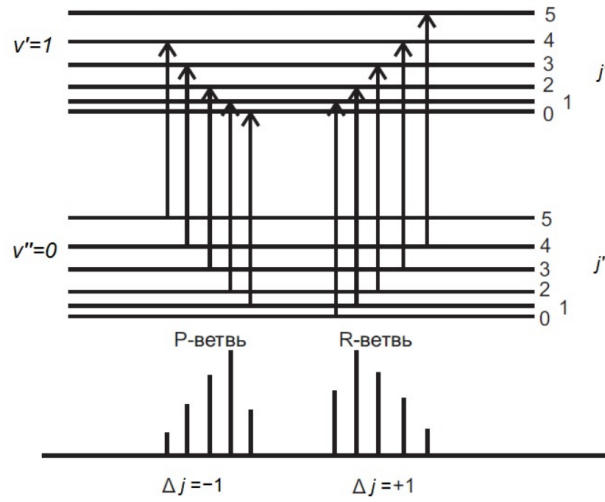


Рис. 2: Формирование Р- и R-ветвей колебательно-вращательного спектра двухатомной молекулы

с ростом номера колебательного уровня. При этом значение $B \sim r_{cp}^2$, то есть будет падать. Зависимость от квантового числа ν описывается формулой:

$$B_\nu = B_e - \alpha_e \cdot \left(\nu + \frac{1}{2}\right), \quad (14)$$

где α_e мала по сравнению с B_e , и тогда колебательную и вращательную энергии можно переписать в виде:

$$\varepsilon_{j,\nu} = B_\nu \cdot j(j+1) + \omega_e\left(\nu + \frac{1}{2}\right) - \omega_e x_e \left(\nu + \frac{1}{2}\right)^2. \quad [\text{см}^{-1}] \quad (15)$$

При этом правила отбора для комбинированного перехода практически те же: $\Delta\nu = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$; $\Delta j = \pm 1$. Колебательный переход почти всегда сопровождается вращательным, поэтому переходов с $\Delta j = 0$ практически не бывает. Тогда с учетом правила отбора и пользуясь ??, запишем уравнение перехода из $\nu = 0$ в $\nu = 1$:

$$\Delta\varepsilon_{\nu,j} = \omega_e(1 - 2x_e) + B_1 \cdot j_1(j_1 + 1) - B_0 \cdot j_0(j_0 + 1) \quad (16)$$

Колебательно-вращательные спектры состоят и Р и R ветвей, для которых выполнено $\Delta j = -1$ и $\Delta j = +1$ соответственно. Р и R ветви обозначены на ??, формулы для частот переходов можно получить из ?? и выразив j пика через предыдущий.

Если скомбинировать полученные выражения в одно, получим

$$\nu_{P,R} = \omega_e(1 - 2x_e) + (B_1 + B_0)m + (B_1 - B_0)m^2, \quad m = \pm 1, \pm 2, \dots \quad (17)$$

где положительные значения m относятся к R-ветви, а отрицательные к P-ветви. Для двухатомных молекул последний член в ?? всегда отрицательный, поэтому с ростом $|m|$ вращательные линии R-ветви сближаются, а P-ветви отдаляются. При малых j различием B_1 и B_2 можно пренебречь, и расстояние между линиями считать равным $2B$. Между сериями ветвей находится нулевой промежуток с переходом $j=0 \rightarrow j=0$, который для большинства молекул запрещен правилом отбора, поэтому отсчет начинается всегда с $j=1$.

2.2 Интенсивности линий в спектре

С увеличением квантового числа j интенсивность вращательных линий сначала возрастает, а потом постепенно падает. Это связано с особенностью заселённости вращательных состояний. Для равновесных условий заселённость энергетических уровней определяется распределением Больцмана:

$$n_i = n_0 \frac{g_i}{g_0} \exp\left(-\frac{\Delta E_i}{kT}\right) \quad (18)$$

n_i, n_0 = число молекул в i -м и нулевом энергетических состояниях, ΔE_i - разница энергий между этими состояниями, g_i, g_0 - статистические веса состояний, k - постоянная Больцмана, T - температура. Статистический вес вращательного состояния с квантовым числом j равен $g = 2j + 1$, а распределение по вращательным состояниям имеет вид:

$$n_j = n_0(2j + 1) \exp\left(-\frac{\Delta E_j}{kT}\right) \quad (19)$$

Рост интенсивности спектральных линий при малых j связан с линейным ростом степени вырождения вращательных уровней, дальнейший спад определяется экспоненциально низкой заселённостью высоких энергетических уровней.

2.3 Спектры многоатомных молекул

При недостаточной разрешающей способности спектрального прибора или при сильном уширении линий вращательная структура колебательно-вращательной полосы не наблюдается, а регистрируется только ее огибающая. Такие полосы в ИК спектроскопии обычно называют колебательными. Положение максимумов колебательных полос и их интенсивность используются в спектральном анализе для идентификации веществ и определения их концентрации. Сложная молекула, состоящая из n атомов, имеет $3n - 6$ нормальных колебаний ($3n - 5$ для линейных молекул), многие из которых могут проявляться в ИК-спектрах. Если колебание не приводит к изменению дипольного момента молекулы, то оно не поглощает ИК-излучения, и число полос в спектре уменьшается. Нормальные колебания делят на два класса: **скелетные колебания** (в равной мере затрагивают большое количество атомов молекулы) и **колебания характеристических групп** (лишь небольшая часть молекулы испытывает сильные смещения).

Скелетные колебания характерны для линейных, разветвлённо-цепных и кольцевых структур в молекуле. Отдельные полосы трудно приписать тем или иным колебаниям, но совокупность полос довольно точно характеризует молекулярную структуру.

Частоты колебаний характеристических групп почти не зависят от строения молекулы в целом. Локализация колебаний в определённых частях молекулы или на определённой связи непосредственно зависит от соотношения между массами колеблющихся атомов. Когда между собой связаны два атома существенно различной массы, то в колебаниях относительно центра масс участвует в основном лёгкий атом.

Среди форм колебаний выделяют **валентные** (изменяются длины связей, углы между связями не меняются) и **деформационные колебания** (изменяются углы между связями, длины связей приближенно остаются неизменными).

Для грубой оценки частот различных колебаний можно пользоваться формулой, аналогичной для гармонических колебаний двухатомной молекулы:

$$\omega_i = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k_i}{\mu_i}} \quad (20)$$

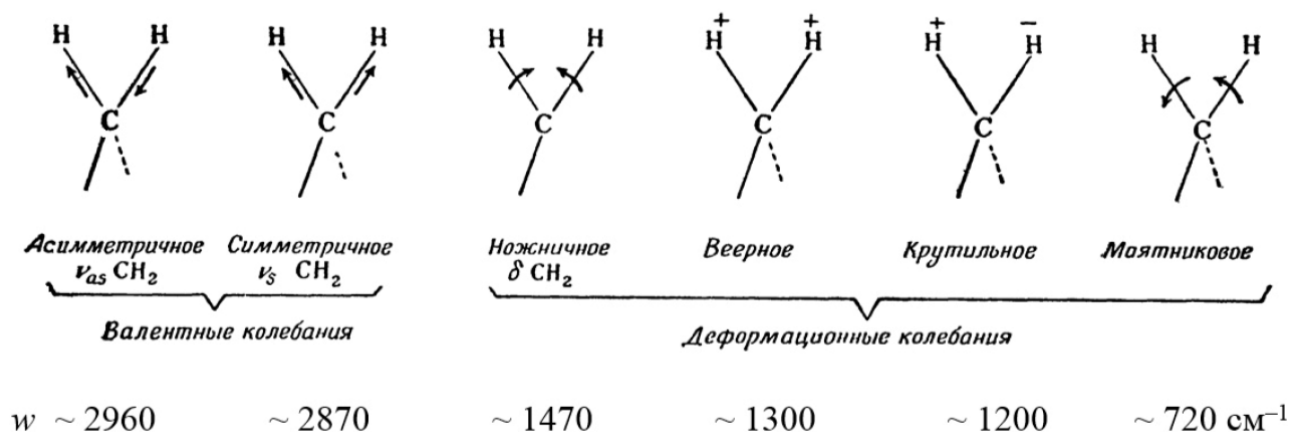


Рис. 3: Основные моды колебаний на примере группы $>\text{CH}_2$

где k_i - силовая постоянная, а μ_i - приведенная масса атомов, образующих данную связь или угол. Изменение углов между связями происходит гораздо легче, чем изменение длин этих связей. Поэтому силовая постоянная k для изменения углов мала в сравнении с константой k изменения длин связей $k \ll k$. Обычно k .

В результате взаимодействия между соседними молекулами могут возникать сдвиги частот характеристических групп. Сдвиги частот колебаний характеристических групп, обусловленные межмолекулярным взаимодействием или резонансными эффектами, являются высоко характеристическими и оказываются полезны для диагностических целей.

2.4 Принципы фурье-спектроскопии

Принципиальная схема прибора изображена на рисунке 5. В её основе лежит интерферометр. При монохроматическом освещении входнойг отверстия интерферометра и при равномерном перемещении подвижного зеркала со скоростью v , приёмником излучения, расположенным за выходной диафрагмой интерферометра, будет регистрироваться переменный сигнал $\Phi(x)$, соответствующий прохождению через выходную диафрагму интерферометра максимумов и минимумов интерференционной картины:

$$\Phi(x) \sim B \cos^2(\pi \nu x) = \frac{B}{2} (1 + \cos(2\pi \nu x)) \quad (21)$$

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} . Переменная составляющая зарегистрированного сигнала равна

$$\Phi(x) = \Phi_0 \cos(2\pi \nu x) = \Phi_0 \cos(2\pi f t), \quad (22)$$

где $f = \nu v = \frac{v}{\lambda}$ - частота модуляции. Таким образом, при монохроматическом освещении входной щели интерферометра, приемник излучения регистрирует синусоидальный сигнал, интенсивность которого пропорциональна интенсивности сигнала на входе интерферометра, а частота зависит от скорости передвижения зеркала и от длины волны излучения. Такой тип модуляции сигнала получил название интерференционной модуляции. Если входное отверстие интерферометра освещено излучением, имеющим в составе несколько монохроматических компонент, приёмником регистрируется суммарный сигнал всех компонент. Если входное отверстие интерферометра освещено излучением с непрерывным спектром, занимающим область частот от ν_1 до ν_2 , то сигнал, регистрируемый приёмником, имеет вид:

$$\Phi(x) \sim \int_{\nu_1}^{\nu_2} B_\nu(\nu) \cos(2\pi \nu x) d\nu, \quad (23)$$

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

$$B_\nu(\nu) = 2 \int_0^{2L} \Phi(x) \cos(2\pi \nu x) dx \quad (24)$$

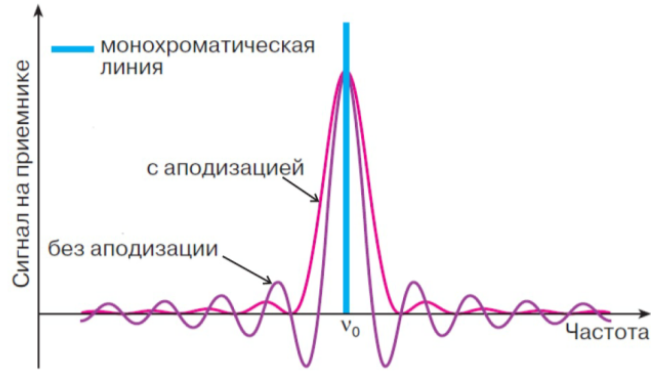


Рис. 4: Аппаратная функция фурье-спектрометра. Аппаратная функция улучшается, если использовать аподизирующую функцию $D(x)$

Если бы была возможность при регистрации сигнала изменять разность хода в пределах от $-\infty$ до $+\infty$, то первоначальный спектр восстанавливался бы без искажений преобразованием

$$B_\nu(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} \Phi(x) \cos(2\pi\nu x) dx \quad (25)$$

В реальных приборах максимальная разность хода ограничена величиной перемещения зеркала L и меняется в пределах от 0 до $2L$. Вместо первоначальной монохроматической линии восстановленный спектр имеет линию конечной ширины. Это спектральное распределение принято называть аппаратной функцией.

$$B_\nu(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} \Phi(x) D(x) \cos(2\pi\nu x) dx, \quad (26)$$

где $D(x)$ - прямоугольная функция вида

$$D(x) = \begin{cases} 0, & x \in (-\infty; 0) \cup (2L; +\infty) \\ 1, & x \in [0; 2L] \end{cases} \quad (27)$$

Аппаратная функция при этом имеет вид:

$$a(\nu) = 4L \frac{\sin(2\pi\nu \cdot 2L)}{2\pi\nu \cdot 2L} \quad (28)$$

Аппаратную функцию можно улучшить, если вместо прямоугольной функции ?? взять функцию другого вида. Данный прием называется аподизацией. Если $D(x)$ имеет вид треугольника, то аппаратная функция имеет дифракционный вид:

$$a(\nu) = 2L \frac{\sin^2(2\pi\nu \cdot 2L)}{(\pi\nu \cdot 2L)^2} \quad (29)$$

Как видно из рисунка ??, ослабление побочных максимумов влечёт за собой ухудшение разрешения - расширяется контур аппаратной функции. Нужно уменьшать входную диафрагму. Разрешение фурье-спектрометров часто определяется энергетическими условиями: яркостью источника излучения, светосилой, чувствительностью приёмника излучения.

2.5 Преимущества фурье-спектроскопии

Преимущества фурье-спектроскопии перед другими спектроскопическими методами, использующими разложение в спектр, определяются прежде всего энергетическими выигрышами, получившими название выигрыша Жакино и выигрыша Фелжетта.

Первый обусловлен тем, что у фурье спектрометров входное отверстие гораздо больше, чем у дисперсионных приборов, свет в которые попадает через узкую входную щель. Этот выигрыш виден из сравнения входных частей систем, изображенных на ??.

Второй выигрыш (Фелжетта) связан с тем, что в обычных спектрометрах регистрируется каждый спектральный интервал поочередно, в то время как в фурье спектрометрах время регистрации каждого спектрального интервала равно времени регистрации всего спектра. Выигрыш Фелжетта пропорционален $M^{\frac{1}{2}}$, где M - число разрешаемых интервалов в зарегистрированном спектре. Оба фактора вместе могут давать выигрыш в величине регистрируемой энергии в четыре порядка.

Одним из преимуществ метода является также отсутствие ограничений в спектральном разрешении за счет размеров оптических элементов.

Поскольку фурье-спектрометры не требуют очень узких входных и выходных щелей, требования к созданию оптических схем без aberrаций при их конструкции сильно снижаются. По этой причине становится возможным создание оптических схем с большим отношением диаметра объектива к его фокусу (относительным отверстием), обычно 1:3, что делает такие приборы более компактными по сравнению со щелевыми. Такое преимущество оказывается тем более важным, что для обеспечения максимально широкого спектрального диапазона в спектральных приборах обычно применяется зеркальная оптика, для которой безаберрационные схемы создавать труднее, чем при использовании линз.

2.6 Анализ вторичной структуры белка

Инфракрасные спектры белков и полипептидов демонстрируют ряд так называемых амидных полос, которые соответствуют различным колебаниям пептидного фрагмента. Из всех амидных мод пептидной группы наиболее широко используемым в исследованиях вторичной структуры белка является амид I, находящийся в диапазоне 1700–1580 см^{-1} . Он соответствует валентным колебаниям связи C=O пептидной группы. Основными факторами, ответственными за конформационную чувствительность амидных полос, являются водородная связь и связь между переходными диполями.

Величина расщепления колебания амида I зависит от ориентации и расстояния взаимодействующих диполей и обеспечивает информацию о геометрических расположениях пептидных групп в полипептидной цепи. Так как в каждой из вторичных структур белка связь C=O имеет собственную частоту колебания, наблюдаемые контуры полосы амида I представляют собой полосы сложного состава: они состоят из множества перекрывающихся компонентов, таких как α -спирали, β -листы, повороты и неупорядоченные или нерегулярные структуры. Основная трудность анализа составного контура полосы возникает из-за того, что ширина полос составляющих компонентов больше, чем расстояние между максимумами соседних пиков. Как следствие, отдельные составляющие полосы не могут быть разделены и идентифицированы в широких контурах экспериментально измеренных спектров, а извлечение структурной информации требует математической обработки экспериментальных данных.

Широко используемый подход для извлечения информации о вторичной структуре белка из ИК-спектров связан с вычислительной процедурой фурье-само-деконволюции. Эта процедура, иногда называемая «усилением разрешения», уменьшает ширину инфракрасных полос, что позволяет увеличить разрешение и лучше идентифицировать перекрывающиеся полосы компонентов, находящихся в составном контуре полосы. Увеличение разрешения перекрывающихся полос также может быть достигнуто путем вычисления второй производной спектра поглощения. Для извлечения количественной информации о вторичной структуре белка в анализе, основанном на усилении разрешения, была предложена процедура, которая включает подгонку контура амид I в виде линейной комбинации отдельных полос компонентов. Предполагалось, что данные отдельные полосы, соответствующие разным типам вторичных структур, представляют собой проценты этих структур в данном белке. В настоящее время наиболее распространенным методом количественной оценки вторичной структуры является деконволюция второй производной спектра в области частот амида I.

3 Описание установки и методы исследований

3.1 Установка

Регистрация колебательно-вращательного спектра производится с помощью инфракрасного спектрофотометра Симекс ФТ-801. Исследование твердых веществ проводилось с дополнительным блоком НПВО-ЗДО. Типичная оптическая схема фурье-спектрометра использует интерферометр Майкельсона (см. ??). 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.

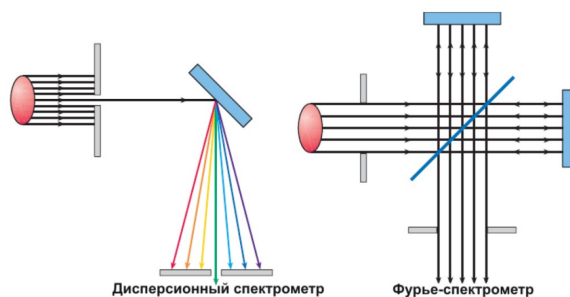


Рис. 5: Иллюстрация преимуществ фурье-спектроскопии перед дифракционными приборами

Идеальный светоделитель должен отражать и пропускать ровно по половине света и не иметь поглощения во всей спектральной области работы прибора. Отклонение от этого требования снижает эффективность его работы. Однако реализовать такое требование очень трудно, особенно в инфракрасной области спектра, где длина волны меняется в десятки раз. Поэтому в фурье-спектрометрах используют сменные фотоделители. Область работы каждого светоделителя бывает достаточно широкой: она обычно допускает пятикратное изменение длины волны, что гораздо больше, чем для призм или дифракционных решеток. В области низких частот, когда длина волны превышает 25 мкм, в качестве светоделителей используют полимерные пленки.

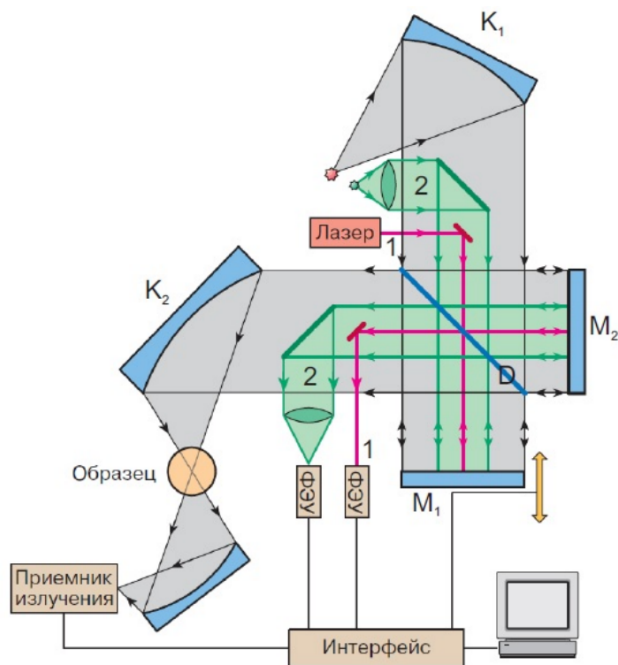


Рис. 6: Схема устройства фурье-спектрометра слева, образцы исследуемых веществ справа

После светоделителя прошедший и отраженный пучки попадают на зеркала M_1 и M_2 (их поверхность

не должна отклоняться от идеальной более чем на $1/20$ длины волны коротковолновой границе прибора). Выходящее из интерферометра излучение фокусируется зеркальным объективом K_2 в месте, куда помещается образец исследования спектра поглощения, после этого свет фокусируется на источнике излучения.

Важным элементом оптической схемы является система измерения разности хода между зеркалами интерферометра (на рис.?? обозначена красным цветом). Для этого в него вводится стабилизируемое излучение одномодового лазера (обычно He-Ne). После прохождения через интерферометр монохроматический пучок генерирует при движении зеркала синусоидальный сигнал на специальном приемнике. Период синусоиды равен длине волны лазерного излучения λ_{las} . Этот сигнал после преобразования используется в создании командных импульсов для считывания показаний с приемника излучения в приемно-усилительной системе интерферометра при смещении подвижного зеркала на расстояние, равное λ_{las} или кратное этой величине. Благодаря такой системе фурье-спектрометр становится прибором с высокой точностью измерений частот спектральных линий.

Иногда в схему встраивается еще один интерферометр - интерферометр белого света (обозначен на рис. ?? цифрой 2). Он используется для определения нулевой разности хода между зеркалами.

3.2 Методы исследований

Для исследований твердых веществ их наносили на скотч, исследование HCl производилось в газовой кварцевой кювете длиной 100 мм. Окна кюветы выполнены из кварца SiO_2 , прозрачного для ИК-излучения с волновым числом $\nu > 2100\text{см}^{-1}$.

В работе использовалась фурье-спектроскопия, принципиальная схема прибора указана на рис. ?? . В ее основе лежит интерферометр Майкельсона.

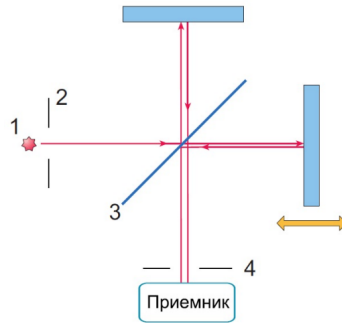


Рис. 7: Принцип работы фурье-спектрометра на основе интерферометра Майкельсона. 1 - источник излучения, 2 - входная диафрагма, 3 - светоделитель. 4 - выходная диафрагма.

Также в работе использовалась спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Суть этой методики состоит в том, что при отражении светового луча от внутренней грани призмы под достаточно большим углом $\Theta > \Theta_0$ преломленная волна отсутствует, происходит полное внутреннее отражение ($\sin\Theta_0 = n_2/n_1$, $n_2 > n_1$). Однако пучок света все же проникает через поверхность и в менее оптически плотном образце возникает затухающая с расстоянием ЭМВ. Глубина проникновения D определяется расстоянием, на котором амплитуда затухает в e раз и зависит от Θ , n_1 , n_2 :

$$d = \frac{\lambda/n_1}{2\pi(\sin^2\Theta - n_2^2/n_1^2)^{1/2}}. \quad (30)$$

Таким образом отраженный свет будет нести информацию о спектре поглощения образца, интенсивность можно приближенно описать выражением:

$$I = I_0 \exp(-\alpha C d_{eff}), \quad (31)$$

где α - показатель поглощения, C - концентрация поглощающих частиц. Важно чтобы призма была прозрачна в ИК области и оптически более плотная, чем материал образца.

4 Результаты и обсуждение

В ходе работы мы сняли спектры Альбумина (порошка и плёнки), Гемоглобина, Триптофана, Деринада и Хлороводорода, соответственно ??, ??, ??, ??, ??, ??.

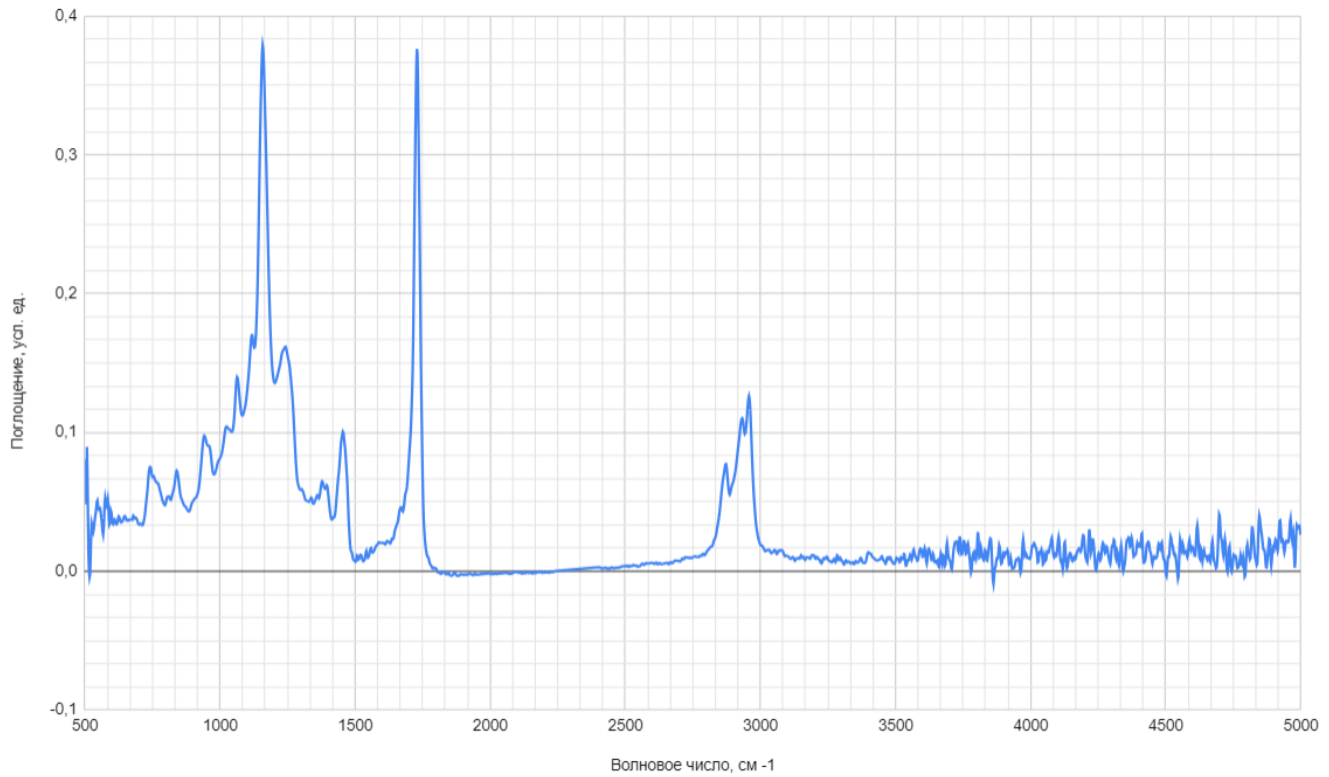


Рис. 8: Спектр рабочего скотча

На спектре Хлороводорода ?? видно чёткое распределение интенсивностей линий в P и R ветвях: с увеличением квантового числа j интенсивность вращательных линий сначала возрастает (линейный рост степени вырождения вращательных уровней), потом постепенно падает (экспоненциально низкая заселённость высоких энергетических уровней), такое распределение связано с особенностью заселённости вращательных состояний.

Так как вещества были нанесены на скотч для удобства проведения исследования, из спектров веществ был вычтен спектр скотча ??.

Для сравнения Гемоглобина, Альбумина и Триптофана были построены графики ??, ??, ??, ??.

Видно, что Гемоглобин и Альбумин имеют похожее строение.

Спектр порошка Альбумина получился неинформативным, так как агрегатное состояние порошка не позволяет правильно снять спектр, что привело к невозможности в дальнейшем использовать полученные данные.

Спектры полос Амид 1 для Гемоглобина, Альбумина, Триптофана представлены на ??, ??, ??, ??.

Для определения структуры белка Альбумина мы взяли вторую производную от полосы Амид 1 Альбумина, перевернули ??, выровняли нижние пики на ось абсцисс ??, посчитали площадь под графиком и определили содержание α -спиралей, β -структур на графике ??.

Структура	Процентное содержание
Межмолекулярные β листы	7,46
β листы	22,53
α спирали	46,43
β повороты	23,43

Таблица 1: Процентное содержание структур в Альбумине

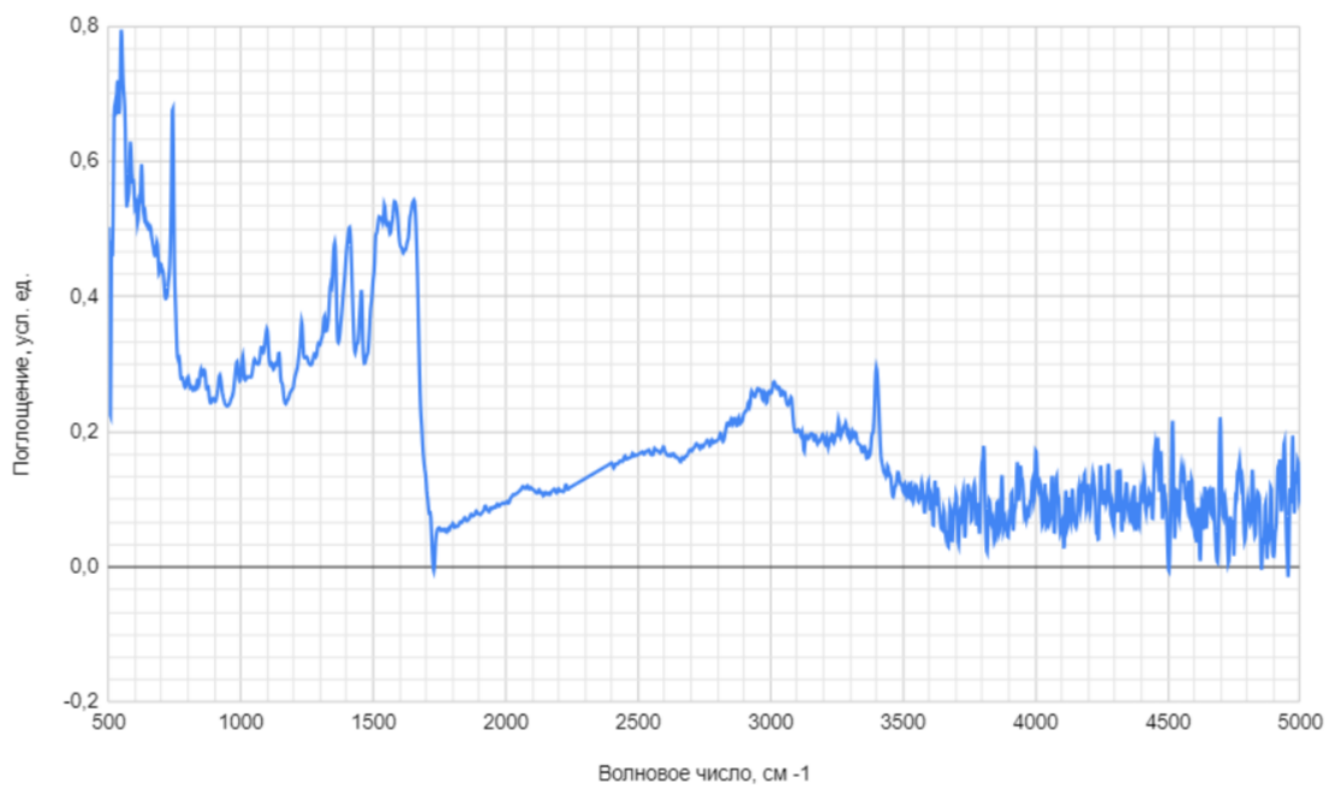


Рис. 9: Спектр порошка Гемоглобина

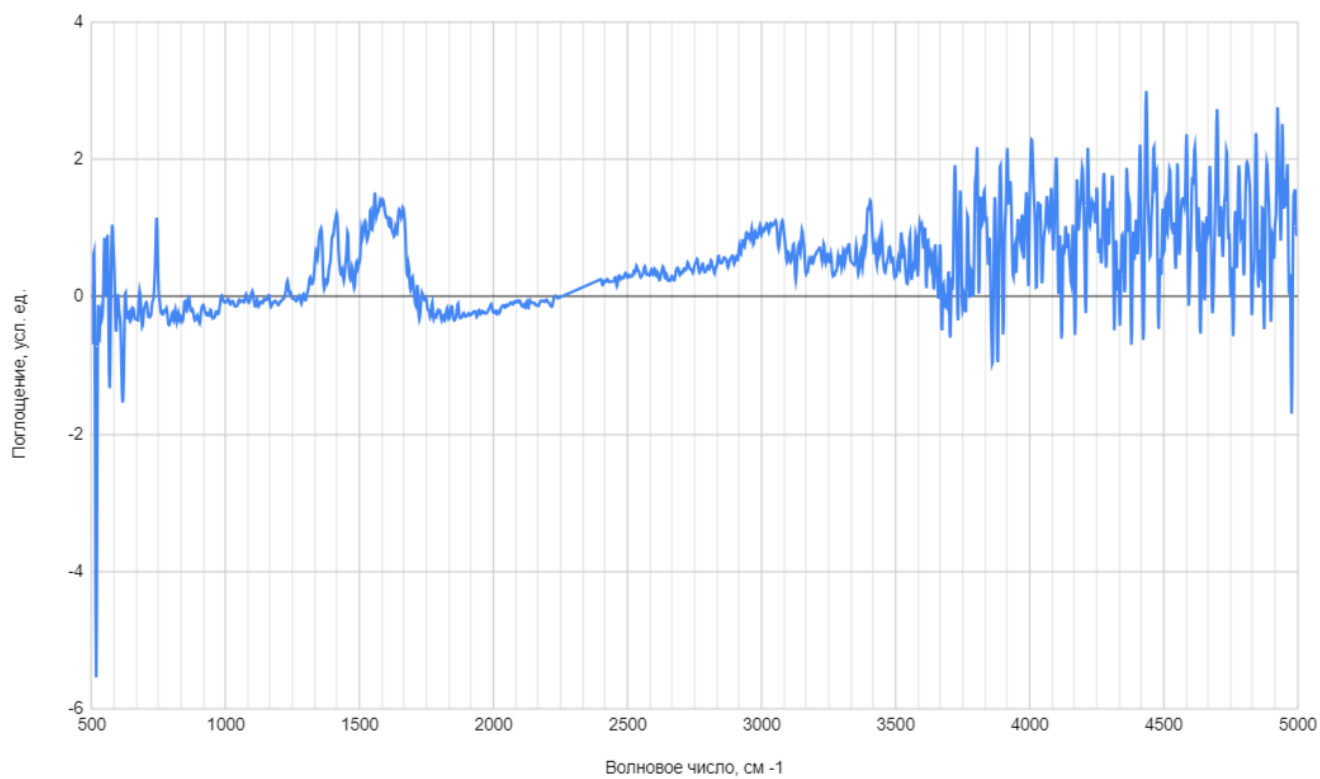


Рис. 10: Спектр порошка Альбумина

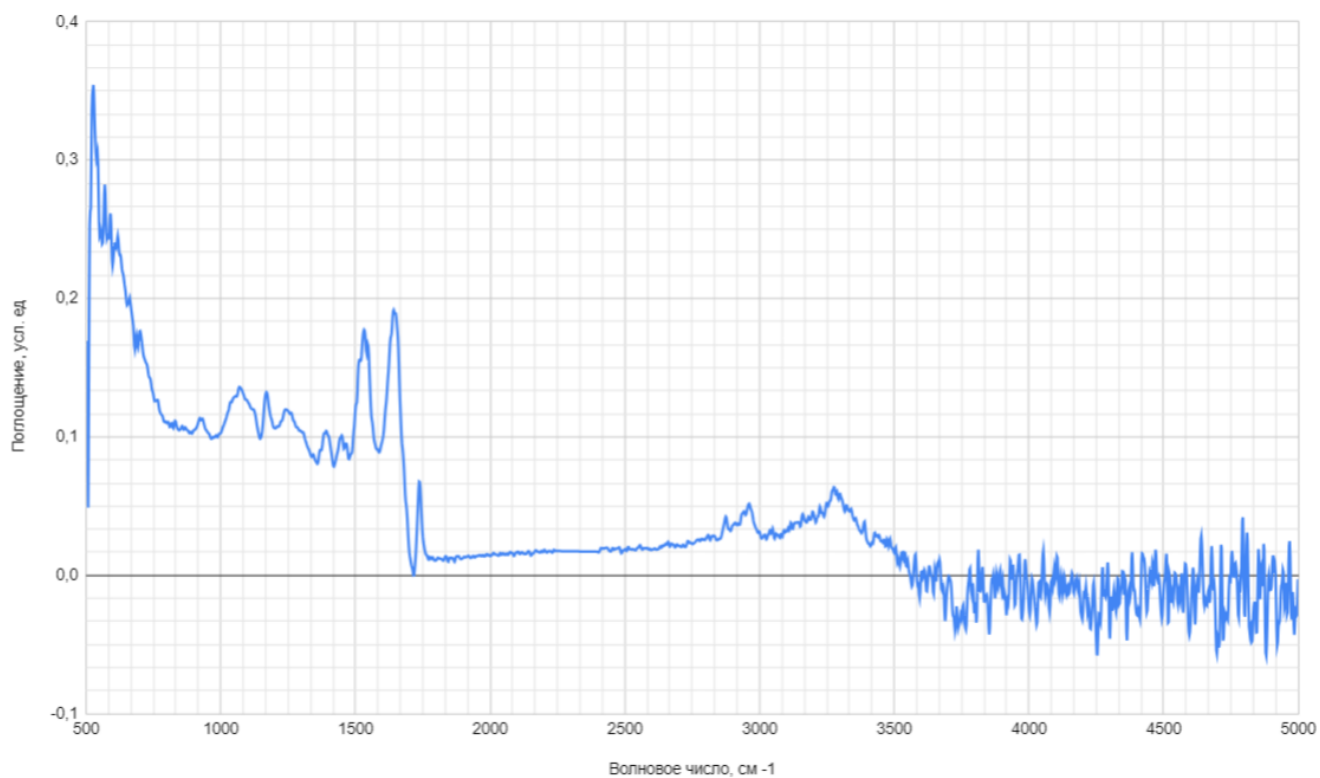


Рис. 11: Спектр плёнки Альбумина

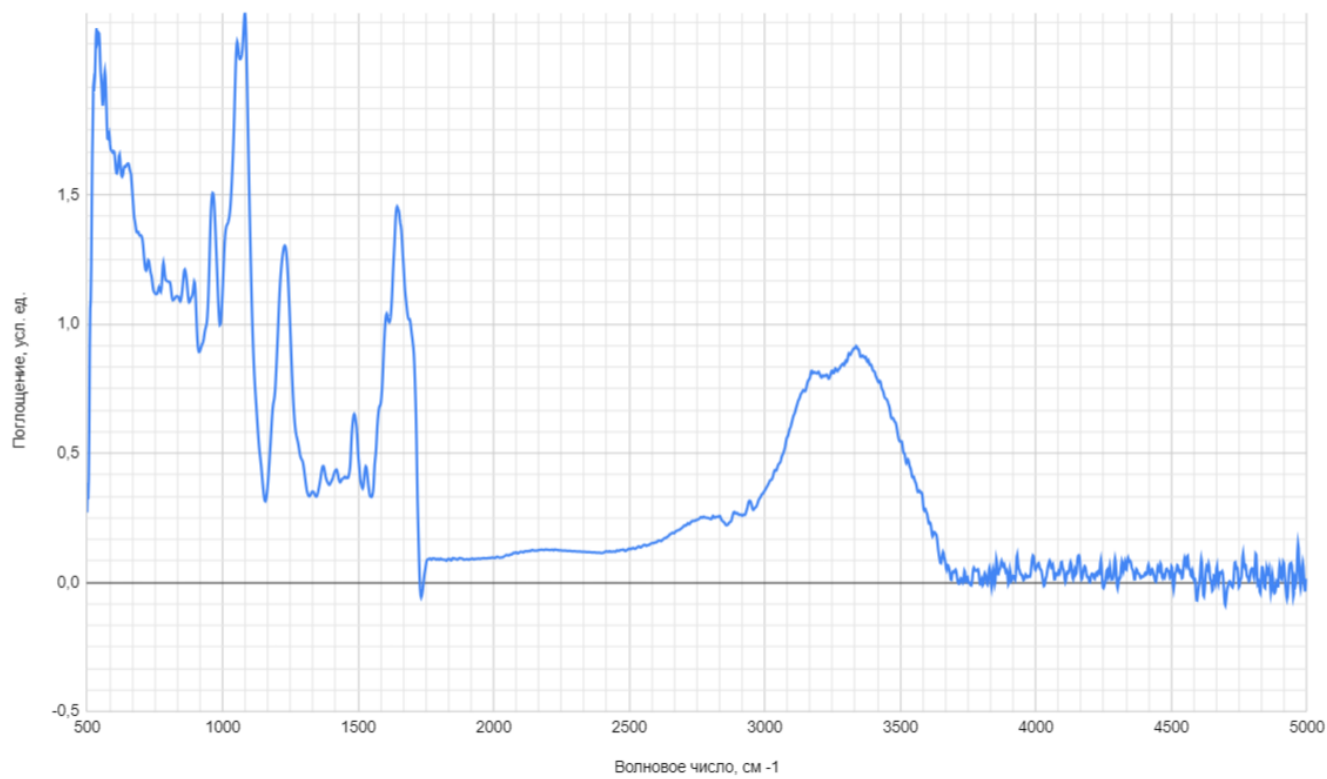


Рис. 12: Спектр плёнки Деринада

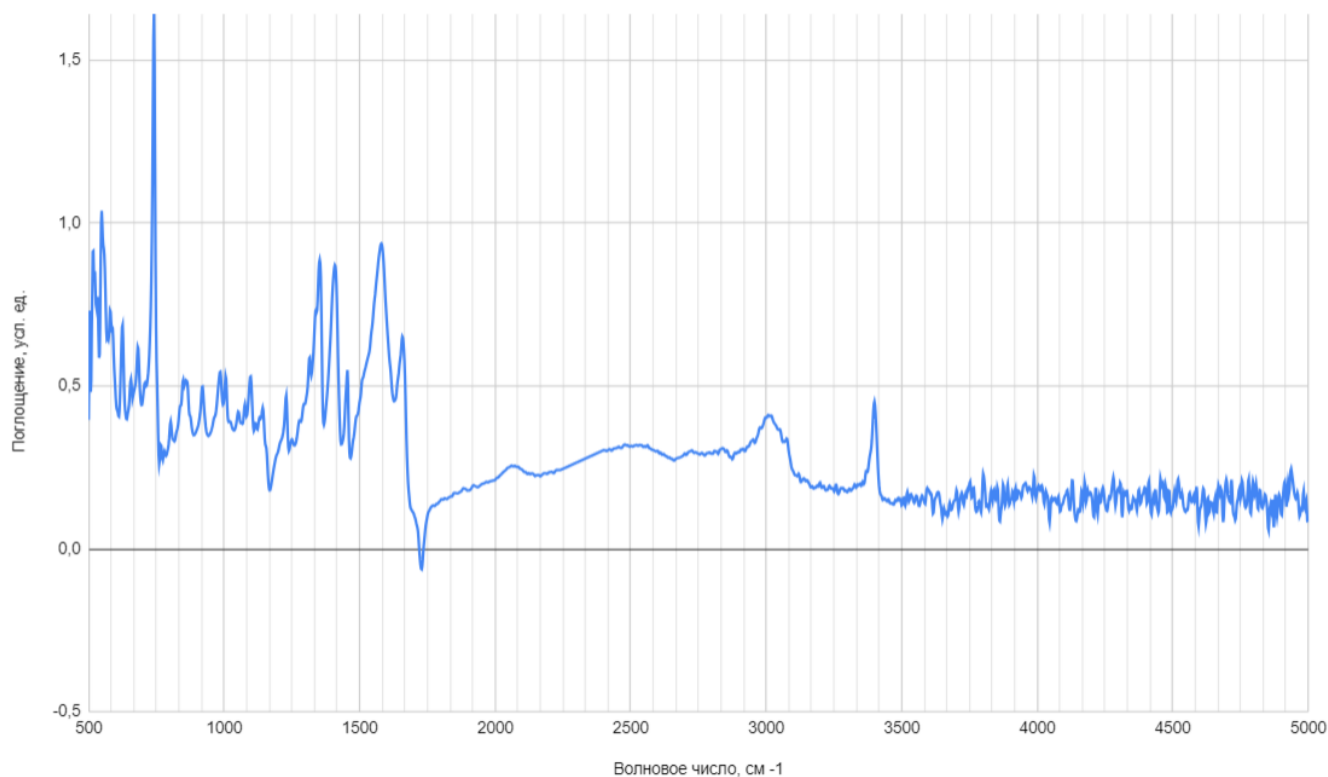


Рис. 13: Спектр порошка Триптофана

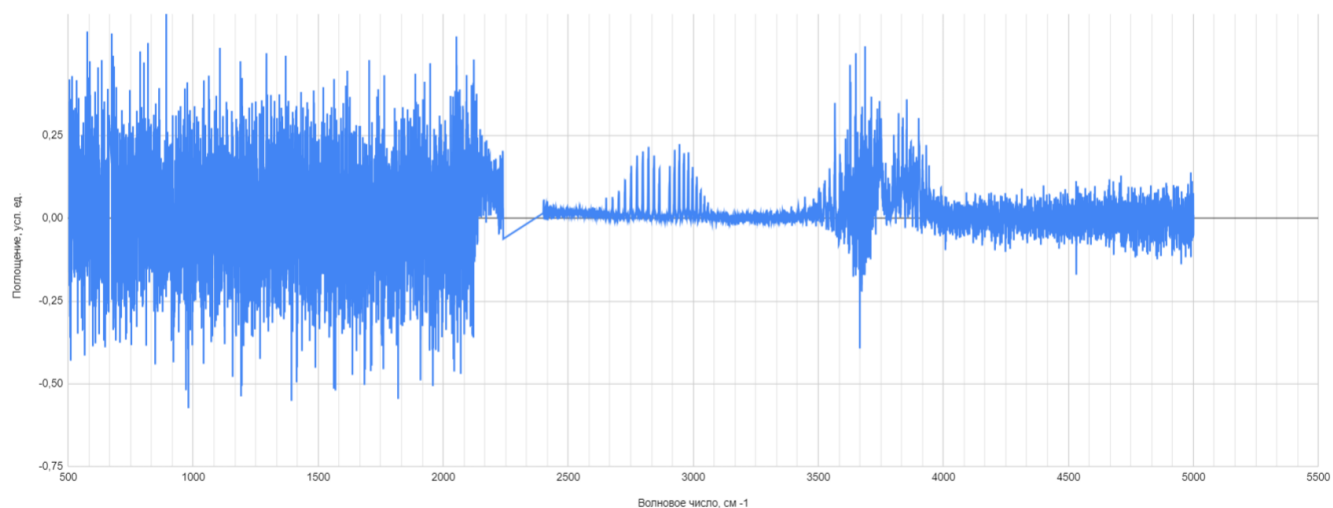


Рис. 14: Спектр Хлороводорода

В нашем исследовании мы определили, что в Альбумине 46,43% от всего белка составляют α -спирали. В научной статье, методы которой мы использовали, мы нашли информацию о 69,50%, помимо этого в статьях присутствует информация об интервале содержания α -спиралей от 47 до 70%. Скорее всего, такое большое расхождение с данными из статьи связано с тем, как проводилось наше исследование: мы использовали скотч, что не делается в исследованиях, требующих большей точности, и нормировали спектры всех веществ относительно полученного спектра скотча. Также обработка спектра полосы Амид 1 Альбумина проводилась вручную, а не специальными программами с большей точностью. Помимо этого скотч не является оптически однородным и легко подвержен загрязнению веществами с поверхности рук. Анализ второй производной скотча не принес понимания причины разделения пиков α -спирали на два, однако основная теория остается

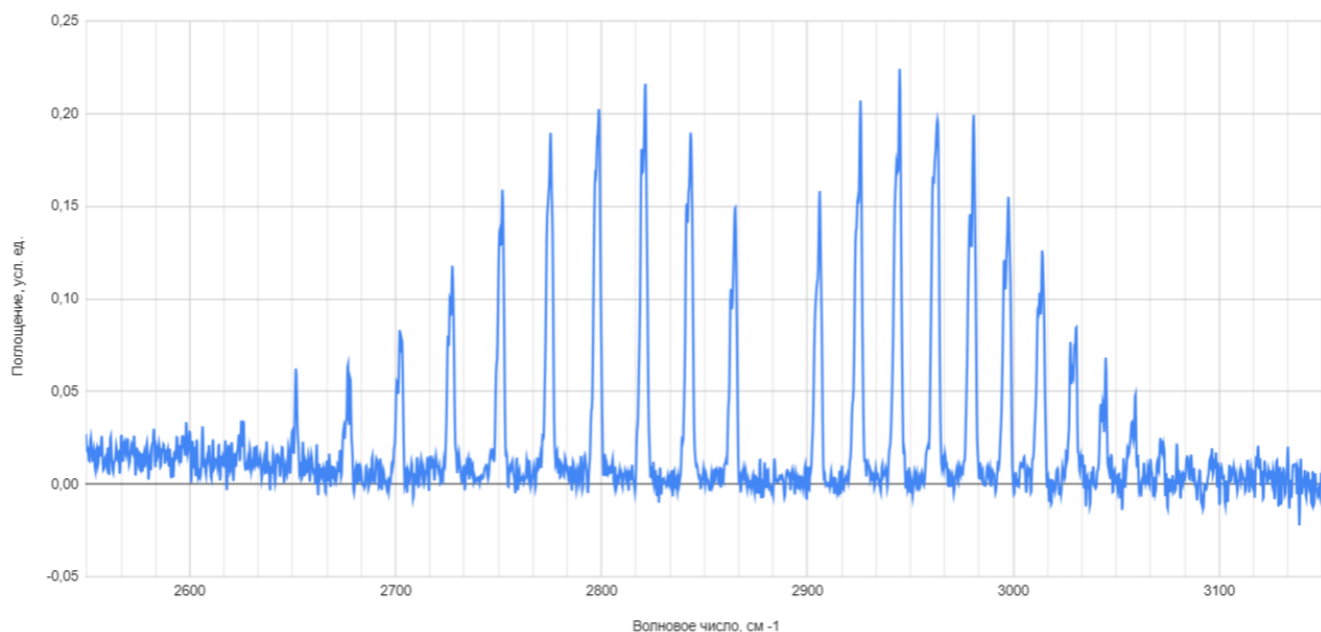


Рис. 15: Участок спектра Хлороводорода

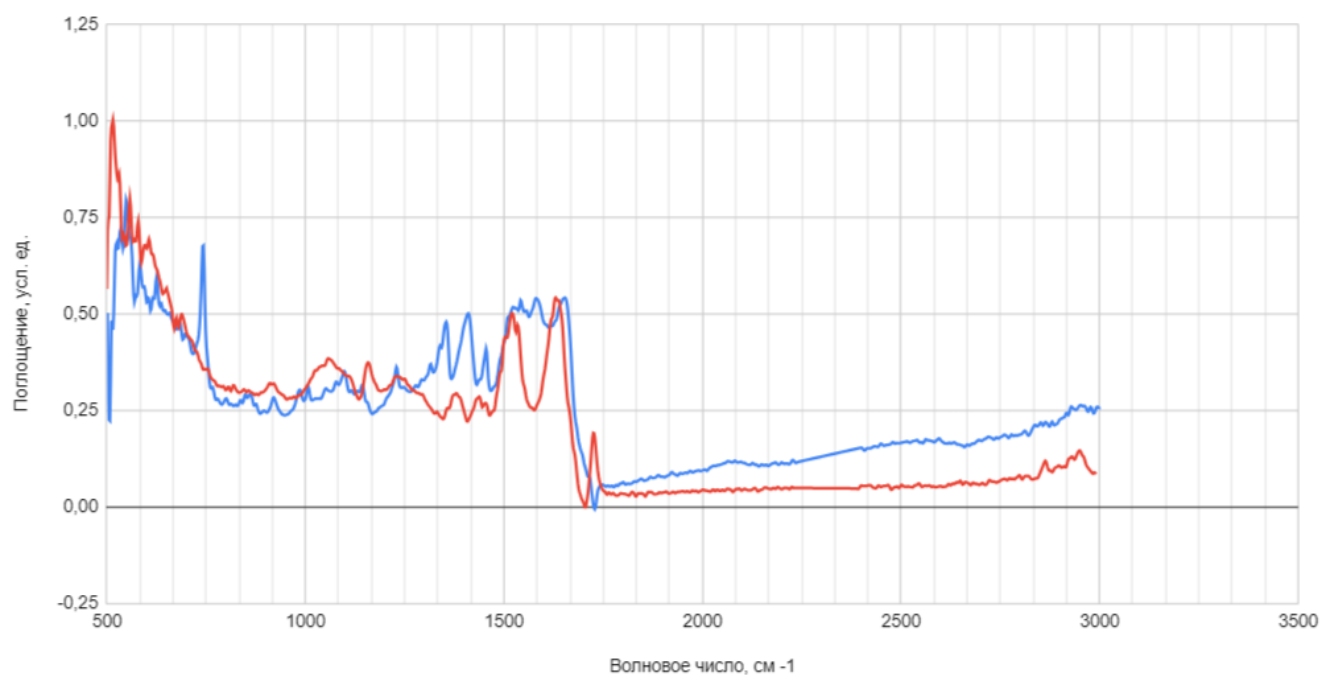


Рис. 16: Спектры Альбумина и Гемоглобина. Гемоглобин голубой, Альбумин красный.

прежней - из-за использования скотча. Также отличие может быть связано с тем, что было выбрано для установки 10 накоплений, вместо 100.

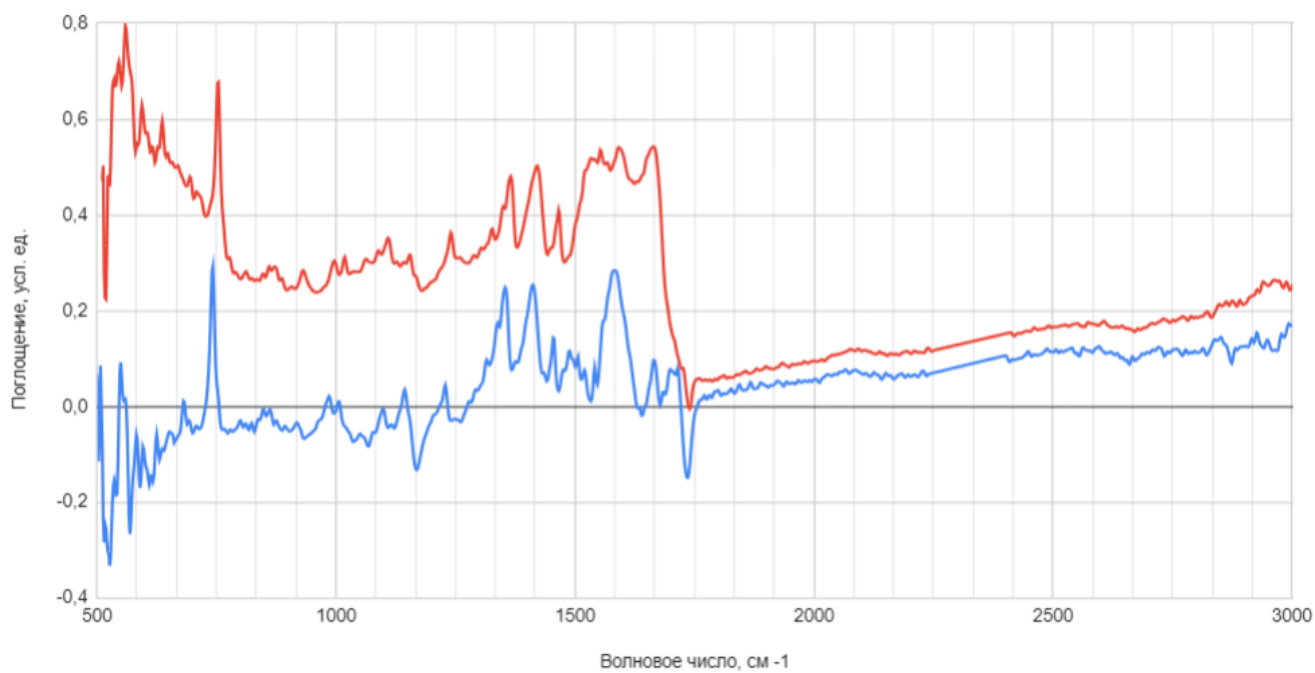


Рис. 17: Спектры Гемоглобина и Гемоглобина с вычетом Альбумина. Гемоглобин с вычетом Альбумина голубой, Гемоглобин красный.

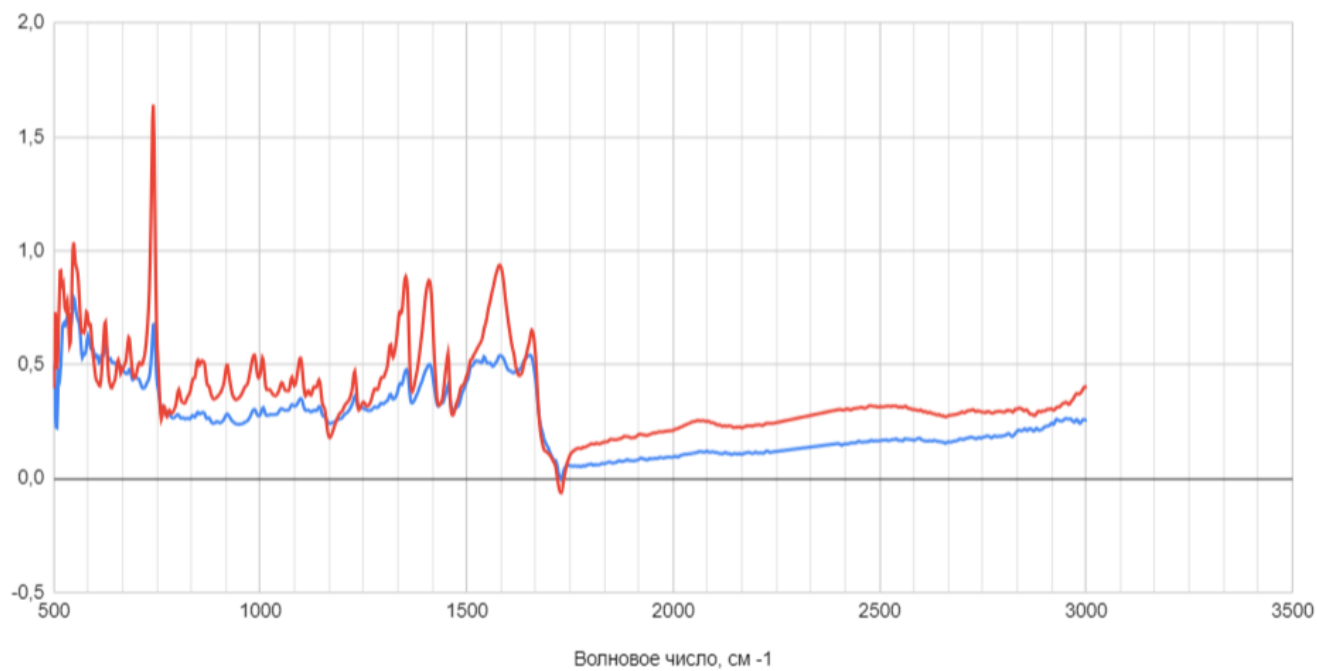


Рис. 18: Спектры Гемоглобина и Триптофана. Гемоглобин голубой, Триптофан красный.

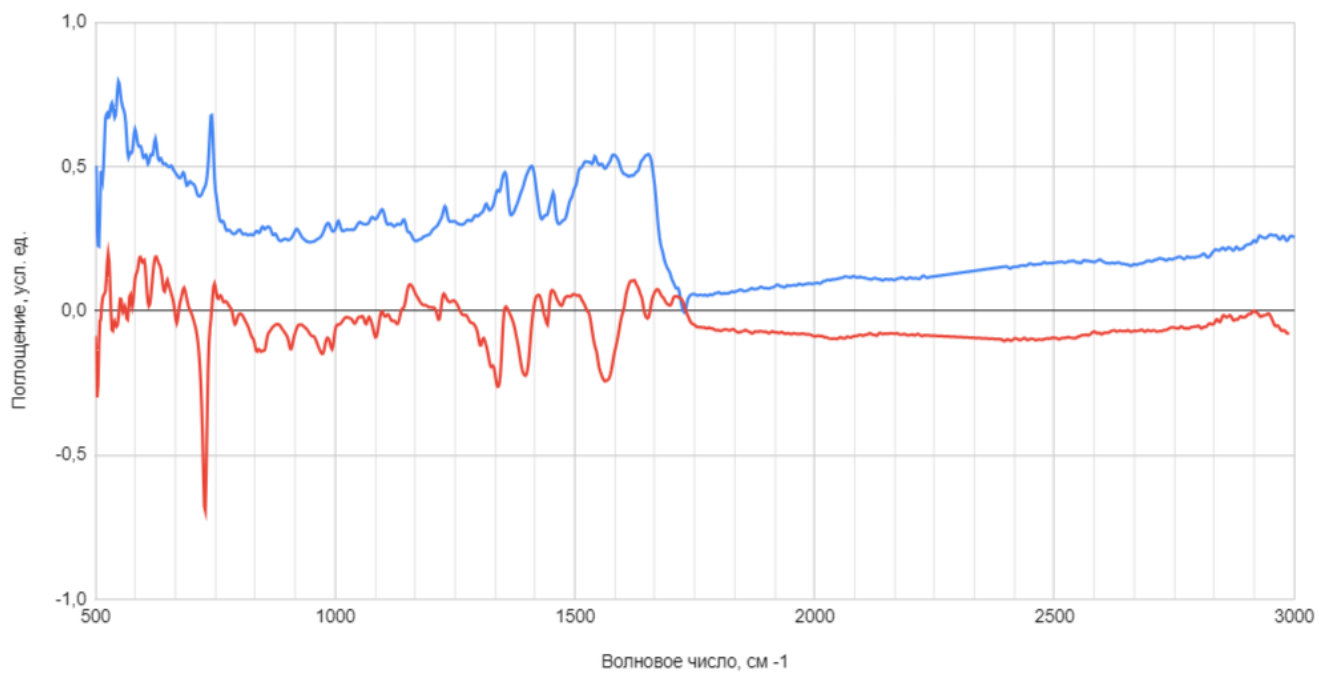


Рис. 19: Спектры Гемоглобина и Гемоглобина с вычетом Триптофана. Гемоглобин голубой, Гемоглобин с вычетом Триптофана красный.

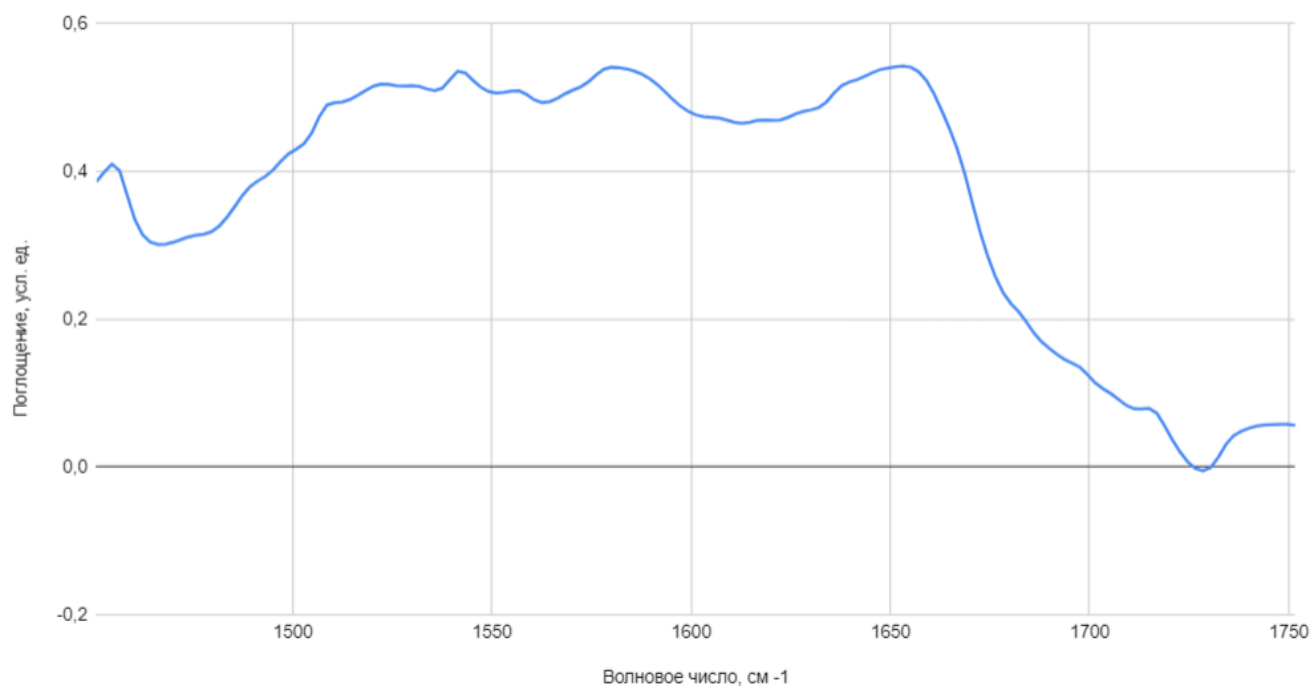


Рис. 20: Спектр Гемоглобина. Полоса Амид 1.

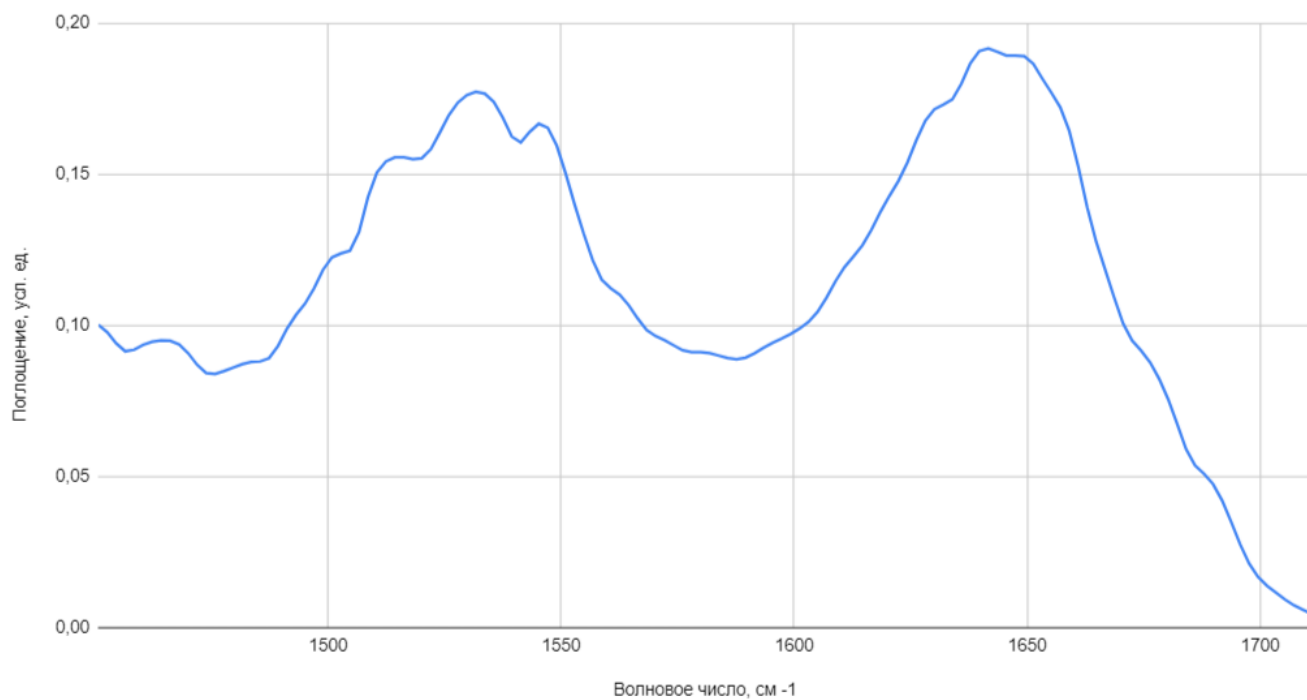


Рис. 21: Спектр плёнки Альбумина. Полоса Амид 1.



Рис. 22: Спектр порошка Альбумина. Полоса Амид 1.



Рис. 23: Спектр Триптофана. Полоса Амид 1.

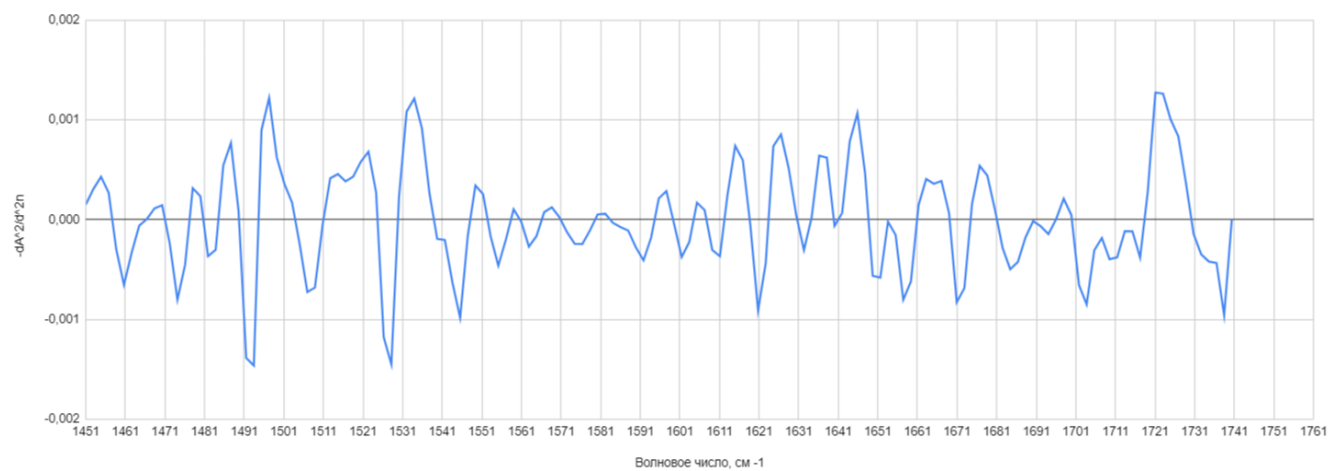


Рис. 24: Перевернутый график второй производной от спектра Альбумина на полосе Амид 1.

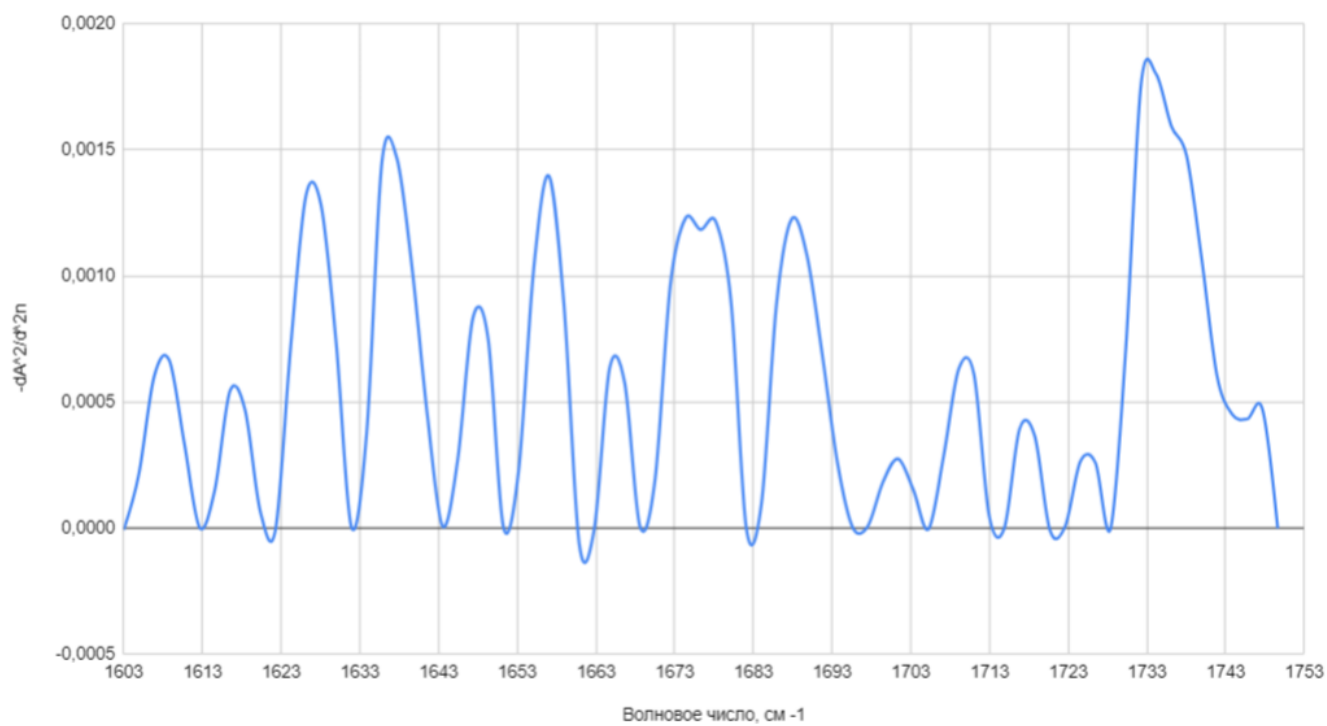


Рис. 25: Поднятый график второй производной спектра Альбумина на полосе Амид 1.

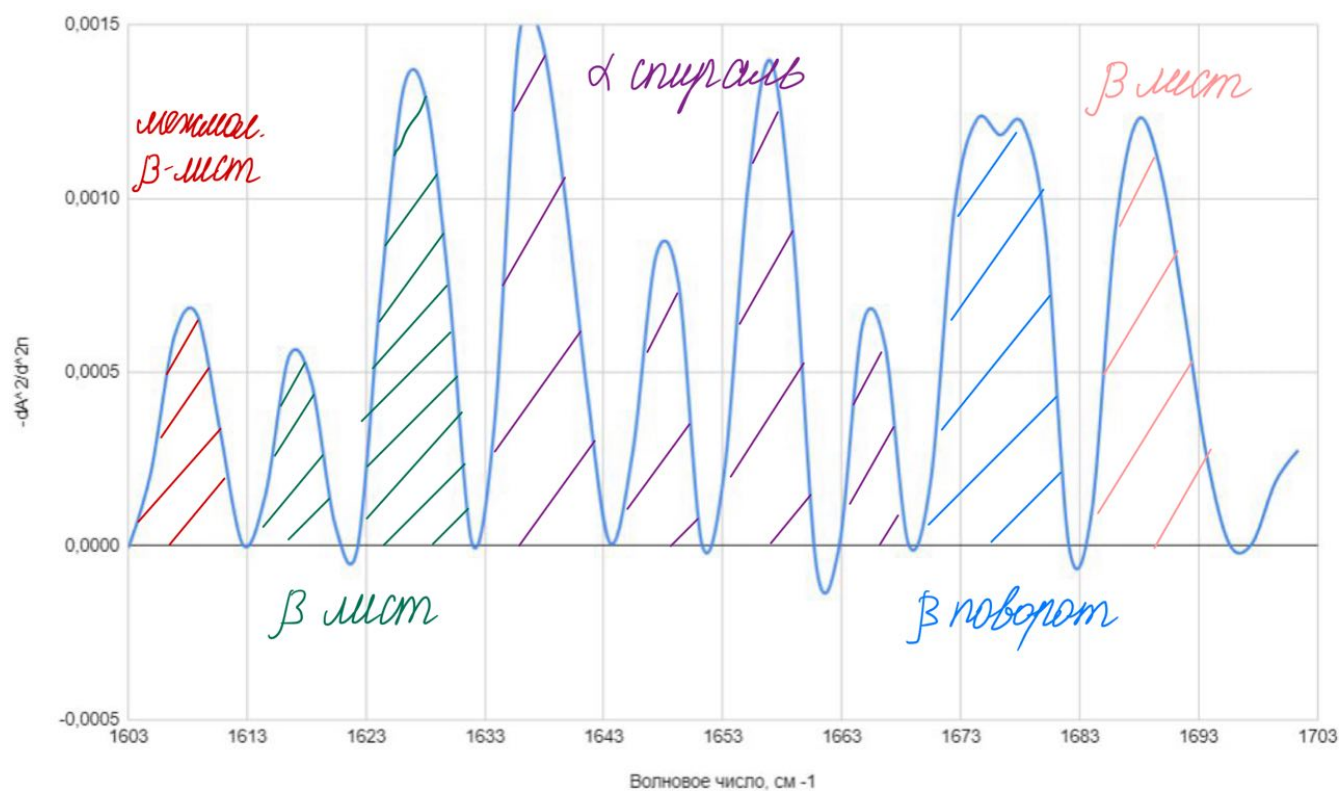


Рис. 26: График спектра Альбумина на полосе Амид 1 с выделенными структурами.

5 Выводы

1. Были получены спектры белковых молекул: Гемоглобина, порошка Альбумина, плёнки Альбумина, Триптофана, и нуклеиновой кислоты Дернада.
2. Проведено сравнение белков, которое показало схожесть строения Гемоглобина и Альбумина.
3. Проведён анализ строения белка Альбумина, который показал содержание α спиралей 46,43 %. В опорной статье результат отличается значительно, однако значения из других статей попадают в доверительный интервал.
4. Был получен колебательно-вращательный спектр двухатомной молекулы HCl с хорошо выраженными вращательными уровнями. Распределение пиков совпадает с теоретическим.

Список литературы

1. Д.А. Усольцев, В.Е. Ситникова, Т.Н. Носенко, Р.О. Олехнович, М.В. Успенская. Сравнение методик расчета вторичной структуры белков на основе деконволюции инфракрасных спектров // Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики. 2019. V. 19. N. 4. doi: 10.17586/2226-1494-2019-19-4-586-593
2. Byler.M., Susi.H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra // Biopolymers. 1986. V. 25. N. 3. P. 469-487. doi: 10.1002/bip/360250307
3. Guglielmellia A., Rizzutib B., Guzzi R. Stereoselective and domain-specific effects of ibuprofen on the thermal stability of human serum albumin // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018 V. 112 P. 122-131. doi: 10.1016/j.ejps.2017.11.013
4. Ge Y.-S., Jin Ch., Song Z., Zhang J.-Q., Jiang F.-L., Liu Y. Multi-spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of curcumin and its derivatives with human serum albumin: A comparative study // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014 V. 124 N 265 P. 265-276. doi: 10.1016/j.saa.2014.01.009
5. Ahmed M.H., Byrne J.A., McLaughlin J., Ahmed W. Study of human serum albumin adsorption and conformational change on DLC and silicon doped DLC using XPS and FTIR spectroscopy // Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology. 2013 V. 4. N. 2. P. 194-203. doi: 10.4236/jbnb.2013.42024
6. Yang H., Yang Sh., Kong J., Dong A., Yu Sh. Obtaining information about protein secondary structure in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // Nature protocols. 2015. V. 10. N. 3. doi: 10.1038/nprot.2015.024