

Физические методы исследования биологических объектов

Лекция 1

АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

(СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ)

Предмет биофизики

Взаимодействия
в биологических системах
разного уровня организации

Виды взаимодействий

На сегодня **достоверно известно** существование четырёх фундаментальных взаимодействий

Взаимодействие	Текущее описание теорией	Радиус воздействия (м)	
Гравитационное	Общая теория относительности	∞	Действует от атомного до межпланетного уровня. Доминирует при взаимодействиях космического масштаба
Слабое	Теория электрослабого взаимодействия	10^{-18}	Характерно для микромира: например, распад $n \rightarrow p e^- \bar{\nu}$
Электромагнитное	Квантовая электродинамика	∞	Действует от атомного до межпланетного уровня. Практически скомпенсировано на космическом уровне
Сильное	Квантовая хромодинамика	10^{-15}	Характерно для микромира: протоны и нейтроны в ядрах, кварки внутри частиц

Электромагнитные взаимодействия в биологических системах

молекулах
клеточных структурах
тканях
органах
организме в целом.

Как обнаружить существование
электромагнитных взаимодействий?

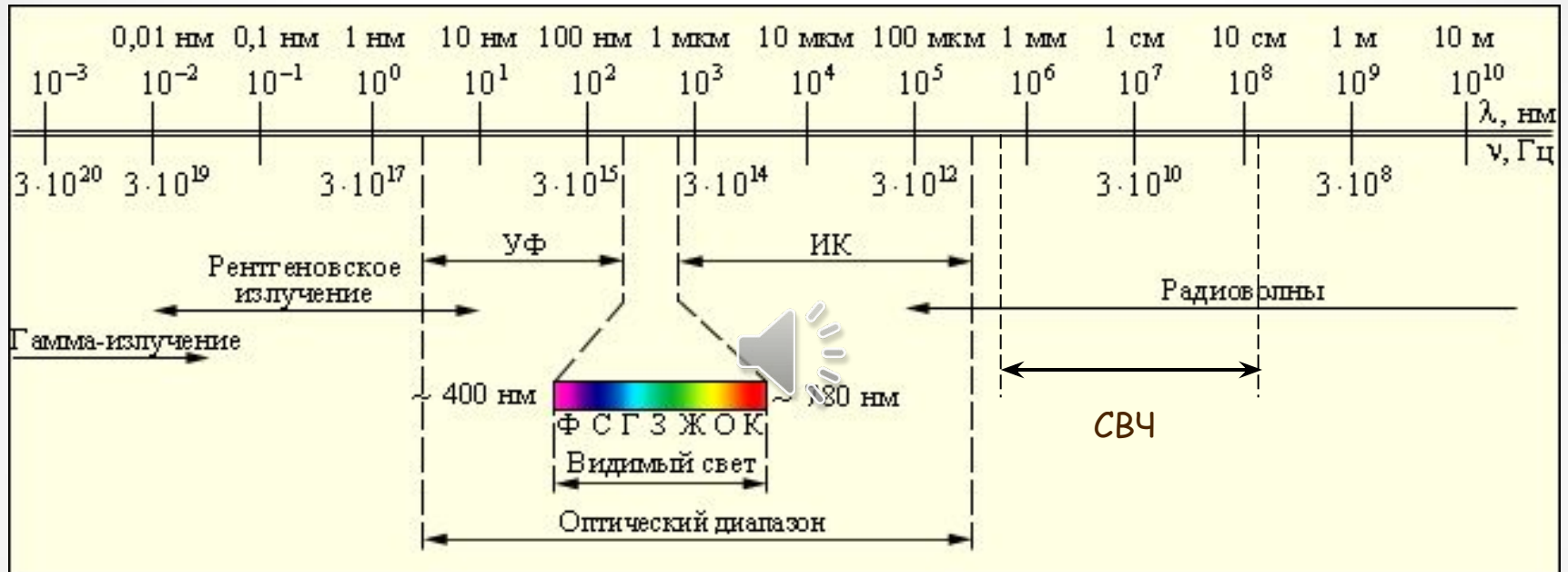
Воздействовать на объект исследования
электромагнитным излучением

И

Регистрировать результат с помощью
физических и физико-химических
методов,

в том числе, спектроскопии

Шкала ЭМВ



Спектральные методы исследования

ОСНОВАНЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИИ
электромагнитного излучения с веществом

Спектральная область	Причина поглощения	Метод
Мягкое рентгеновское излучение, 10-100 нм	Переходы электронов внутренних оболочек атомов	Рентгеноструктурный анализ
Ультрафиолетовая (УФ) до 400 нм	Переходы валентных электронов	УФ-спектроскопия
Видимая (ВИ), до 700 нм	Переходы валентных электронов Колебательные переходы молекул	Спектроскопия ВИ
Инфракрасная (ИК), до 300 мкм	Колебательные переходы молекул Вращательные переходы молекул	ИК-спектроскопия
Короткие радиоволны, до 200м	Спиновые переходы ядер и электронов	ЯМР-спектроскопия ЭПР-спектроскопия

Оптические методы исследования

основаны на взаимодействии света с веществом

- **Спектрофотометрия:**

- Абсорбционная спектроскопия
- Дифференциальная спектрофотометрия
- Производная спектроскопия
- Линейный дихроизм
- Круговой дихроизм

- **Люминесцентный анализ:**

- Флуоресцентная спектроскопия
- Поляризационная спектрофлуориметрия
- Фосфороскопия
- Импульсная спектрофлуориметрия

- **Рамановская спектроскопия** (спектроскопия комбинационного рассеяния)

- **Рефрактометрия**

Механизм взаимодействия электромагнитного излучения с веществом в разных областях электромагнитного спектра различен, но в любом случае происходит **поглощение** молекулой определенного количества **энергии** (абсорбция) **и переход молекулы в возбужденное состояние.**

Предметом молекулярной спектроскопии является изучение спектров молекулярных систем – спектров поглощения, испускания и рассеяния. Более глубокая задача спектроскопии состоит в определении, на основе изучения спектров, характеристик уровней энергии (т.е. стационарных состояний) молекулярных систем и характеристик переходов с излучением между уровнями.

действие света на живые системы

```
graph TD; A[действие света на живые системы] --> B[фотосинтез<br/>фототропизм<br/>фотопериодизм<br/>фототаксис<br/>зрительное восприятие<br/>мутагенное действие УФ-облучения<br/>фотодинамические эффекты]; B --> C[фотобиологические процессы<br/>в биологических системах в целом]; B --> D[первичные стадии<br/>фотобиологических процессов<br/>(физические и физико-химические)]; C --> E[фотобиология]; D --> F[биофизика<br/>фотобиологических процессов];
```

фотосинтез
фототропизм
фотопериодизм
фототаксис
зрительное восприятие
мутагенное действие УФ-
облучения
фотодинамические эффекты

фотобиологические процессы
в биологических системах в целом

первичные стадии
фотобиологических процессов
(физические и физико-химические)

фотобиология

биофизика
фотобиологических процессов

Оптические методы исследования биологических систем

ОСНОВАНЫ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СВЕТА С ЖИВОЙ МАТЕРИЕЙ:

- биологически важными молекулами,
- клеточными структурами,
- тканями,
- органами,
- с организмом в целом.

Можно также сказать, оптические методы служат изучению поведения электрона в биологически важных молекулах.

Спектральный состав излучения Солнца

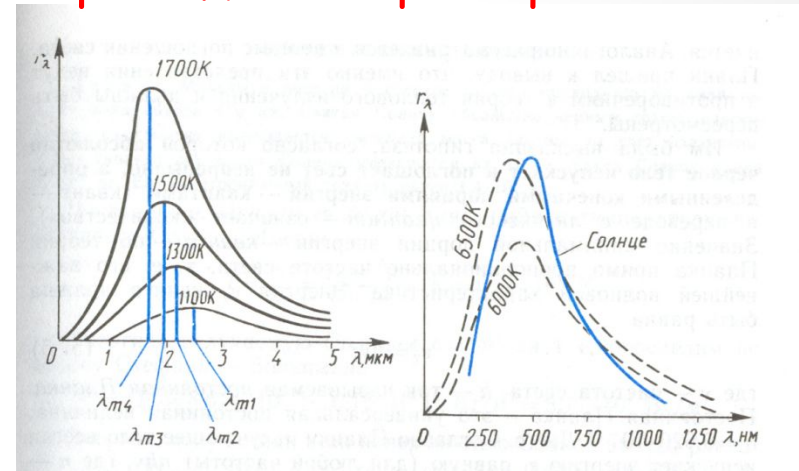
Спектральный состав излучения Солнца очень близок к спектральному составу излучения абсолютно черного тела.

Максимум энергии излучения Солнца приходится примерно на 470 нм.

Распределение энергии в спектре излучения абсолютно черного тела между волнами различной длины волны .

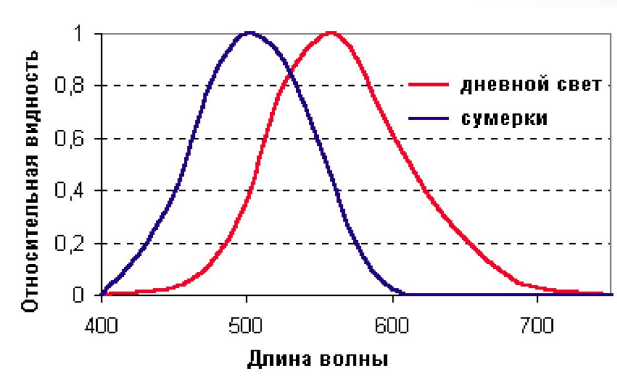
Площадь под кривой определяет интенсивность излучения абсолютно черного тела. С увеличением температуры площадь растет пропорционально четвертой степени температуры. (Закон Стефана-Больцмана).

При повышении температуры абсолютно черного тела длина волна, на которую приходится максимум излучения, уменьшается согласно закону Вина.



$$R = \sigma T^4 \quad \sigma = 5,671 \cdot 10^{-8} \text{ Вт} / (\text{м}^2 \cdot \text{К}^2)$$

$$\lambda_m = b / T \quad b = 2,898 \cdot 10^{-3} \text{ м} \cdot \text{К}$$



Характеристики светового излучения.

Длина волны λ (нм, мкм, м)

Частота ν (Гц): $\nu = c / \lambda$

Энергия квантов E (Дж, эВ, 1 Эйнштейн (Дж/моль)):

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Энергия 1 моля квантов: $E_{\mu} = EN_A = N_A h\nu = N_A hc / \lambda$

Поток излучения (мощность излучения) Φ (Вт, Эйнштейн/с) равен энергии, переносимой через некоторую поверхность S за единицу времени:

$$\Phi = E / t$$

Интенсивность света I (Вт/м², Эйнштейн/м²с) - плотность потока излучения т.е. поток, падающий на единицу площади, перпендикулярной к направлению распространения света

$$I = \Phi_{\perp} / S$$

Доза излучения D (Дж/м², Эйнштейн/м²) - Энергетическая экспозиция - равна произведению интенсивности на время облучения

$$D = It$$

СВОЙСТВА СВЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Световое излучение – это поток частиц (фотонов). Согласно уравнению Эйнштейна энергия фотона

$$E = mc^2 \quad (1)$$

Масса покоя фотона равна 0.

Световое излучение – это электромагнитная волна. Длина световой волны:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

Согласно уравнению Планка энергия электромагнитной волны

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2)$$

Импульс фотона из (1) и (2)

$$p = \frac{h}{\lambda} \quad (3)$$

$$h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ Дж} \cdot$$

Энергия фотона используется при его поглощении молекулами, импульс фотона проявляется в способности светового потока оказывать давление на отражающую поверхность.

Свойства электрона

Электрон - частица с энергией
импульсом

$$E = \frac{mv^2}{2}$$

$$p = mv$$

Электрон - волна с импульсом
(согласно идее де Бройля)
длиной волны

$$p = \frac{h}{\lambda}$$

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Электрон в атоме.

Интерференция электронной волны.

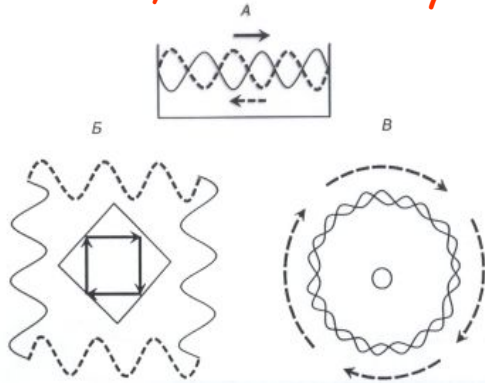
Электроны локализованы около ядер в атомах и молекулах. Волна, соответствующая каждому из них, интерферирует сама с собой.

Пример.

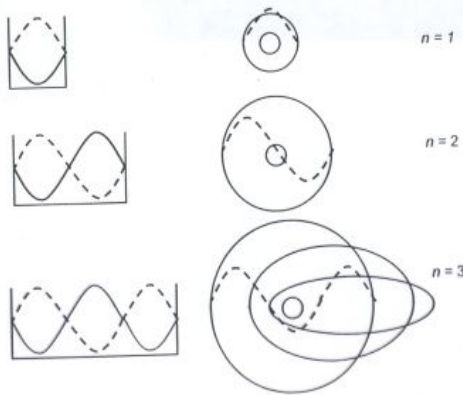
В результате интерференции волн отражающихся от стенок гипотетического ящика при специально подобранных размерах ящика (или λ) таким образом, что в ящик укладывается целое число полуволн, система приходит в устойчивое (стационарное) состояние, при котором **образуется стоячая волна**.

Электроны в атомах и молекулах могут одновременно изменять скорость вращения и размеры орбитали, устойчивыми оказываются те значения этих величин, при которых образуются стоячие волны. Электроны могут бесконечно долго находиться только на орбитах таких размеров, при которых образуются стоячие волны размером в целое число полуволн.

Радиус стационарной орбиты соответствует такому расстоянию, при котором электронная волна, интерферируя в атоме, сама с собой, образует стоячую волну.



Не в каждом ящике может образоваться стоячая волна



В квантовой механике состояние системы характеризуется волновой функцией Ψ , зависящей от координат и времени, энергией E . Решение уравнения Шредингера позволяет рассчитать волновые функции и энергию уровней молекулы.

$$\underline{\hspace{2cm}} n_2, E_2, \psi_2$$

$$\underline{\hspace{2cm}} n_1, E_1, \psi_1$$

Уравнение Шредингера

Уравнение Шредингера в общем случае для совокупности взаимодействующих частиц с потенциальной функцией U и массами m_k в декартовой системе координат имеет вид:

$$-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{k=1}^N \frac{1}{m_k} \left[\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x_k^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial y_k^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z_k^2} \right] + U\Psi = i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad (*)$$

Классическая потенциальная функция при переходе к квантовой механике сохраняется без изменений. Если потенциальная функция системы не зависит от времени, то уравнению Шредингера удовлетворяет произведение

$$\Psi(x, y, z, t) = \Psi(x, y, z) \exp\left(-\frac{iEt}{\hbar}\right)$$

Произведение $|\Psi|^2 = \Psi\Psi^* = \Psi^2(x, y, z) \exp\left(-\frac{iEt}{\hbar}\right) \exp\left(\frac{iEt}{\hbar}\right) = \Psi^2(x, y, z)$

не зависит от времени

Это значит, что вероятность обнаружить частицы в некоторой области пространства также не зависит от времени, а зависит от места расположения этой области в пространстве декартовых координат. Такие состояния называются стационарными.

Уравнение Шредингера для стационарного состояния системы взаимодействующих частиц

При интерференции и образовании стоячих волн волновая функция не меняется во времени.

$$-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{k=1}^N \frac{1}{m_k} \Delta \Psi + U \Psi = E \Psi$$

Параметр E - собственное значение стационарного состояния, U имеет смысл потенциальной энергии.

В результате решения уравнения находят собственные (возможные) значения E и соответствующие ему решения - собственные функции Ψ .

Физический смысл параметра: E - передает допустимые для данной системы значения полной энергии. Значения E - непрерывны для свободных частиц и дискретны для локализованных.

Дискретные уровни E называются уровнями энергии.

Пример: при поглощении кванта электромагнитного излучения молекула может изменить свое стационарное состояние и перейти в другое, также стационарное.

Электрон в одномерном потенциальном ящике.

Пример. Расчет Ψ , E для модельного случая – электрона в потенциальном ящике.

Этот воображаемый ящик должен обладать следующими свойствами:

- электронная волна свободно движется в нем вдоль оси x в $[0; l]$;
- волновая функция вне интервала $[0; l]$ $\Psi=0$; $\Psi(0)=0$; $\Psi(l)=0$;
- потенциальная энергия внутри интервала $U=0$;
- система находится в стационарном состоянии: $\Psi=f(x)$, $\Psi \neq f(t)$,
- е обладает только кинетической энергией, которая не растрчивается.

Уравнение Шредингера для стационарного состояния электрона в одномерном потенциальном ящике

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \frac{2m}{\hbar^2} E \Psi = 0$$

Положим, что

$$\omega^2 = \frac{2m}{\hbar^2} E$$

Уравнение приобретает вид:

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \omega^2 \Psi = 0$$

Его решение находится в виде:

$$\Psi = \Psi_0 \sin \omega x$$

Параметр ω находим из условия:

$$\Psi(l) = 0 \Rightarrow \sin \omega l = 0 \Rightarrow \omega l = \pi n \Rightarrow \omega = \pi n / l$$

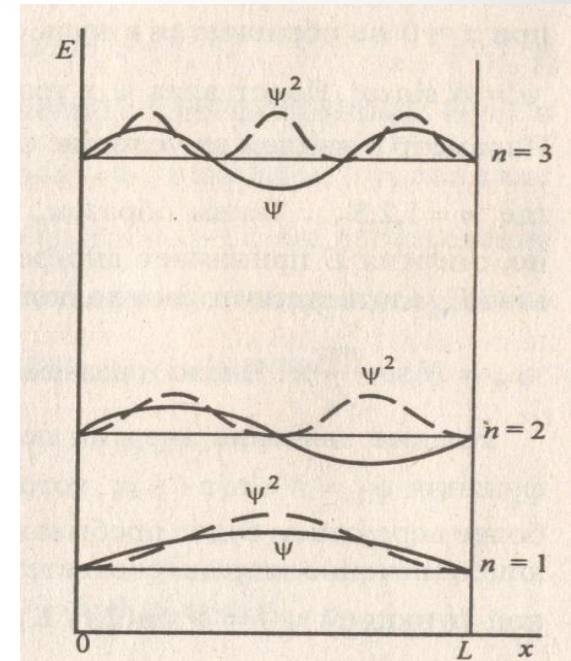
Таким образом, энергия принимает дискретные значения

$$E = E_n = \frac{\hbar^2 \pi^2 n^2}{2ml^2}$$

Каждому значению энергии соответствует своя волновая функция вида

$$\Psi_n = \Psi_0 \sin \frac{\pi n}{l} x$$

n - главное квантовое число



Для $n=1$ $\Psi_1 = \Psi_0$ при $x=l/2$, т.е. наиболее вероятным будет пребывание частицы в центре интервала.

Для $n=2$ $\Psi_2 = \Psi_0$ при $x=l/4$ и $x=3l/4$, при $x=l/2$ $\Psi_2 = 0$.

Наиболее вероятной областью локализации частицы будет

область около точек $x=l/4$ и

$x=3l/4$

Решение уравнения Шредингера для атомной системы позволяет найти, по крайней мере, две величины:

1. распределение электронной плотности вокруг ядра
2. энергию электрона в атоме.

Задача расчета уровней энергии молекулы с использованием уравнения Шредингера чрезвычайно сложна

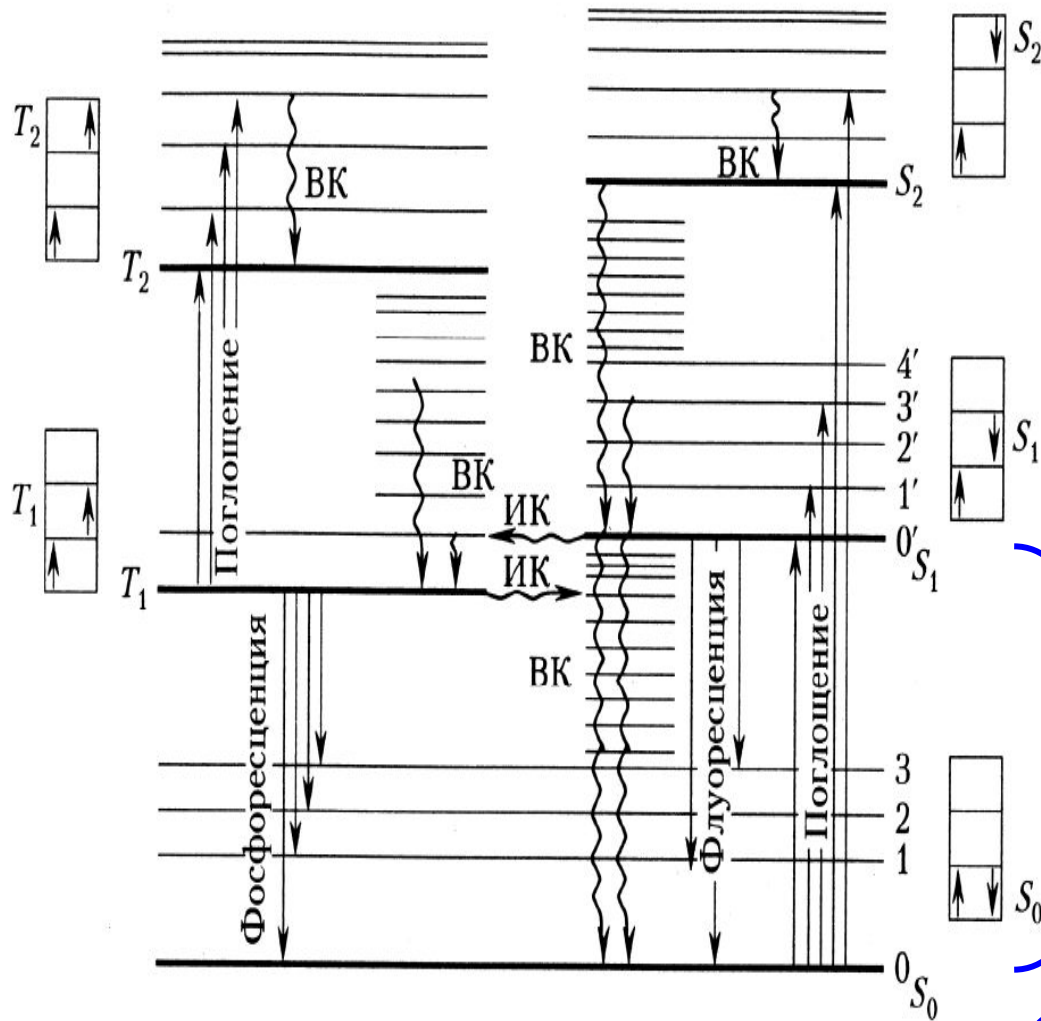
Взаимодействие света с веществом

Фотофизические процессы в молекулах

При взаимодействии света с веществом может происходить либо **преломление** света и **рассеяние**, либо **поглощение**, или то и другое одновременно. Поглощение фотонов и переход молекул в возбужденное состояние может сопровождаться высвечиванием квантов **люминесценции**.



Уровни энергии в молекуле. Схема энергетических уровней. (диаграмма Яблонского)



Согласно закону сохранения энергии **переходы** молекулы из одного состояния в другое связаны с получением и отдачей энергии системой. Электромагнитное излучение, связанное с переходом молекулы из одного стационарного состояния в другое, является монохроматическим и его частота **определяется правилом частот Бора.**

$$E_i - E_j = h\nu$$

ОСНОВНОЙ КВАНТОВЫЙ ЗАКОН

Основные типы уровней молекулы	Расстояние между уровнями	Переходы Методы исследования
Электронные уровни , связанные с движением внешних электронов относительно ядер.	1-10 эВ (10000см ⁻¹).	Переходы $S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2 \dots$ Оптическая спектроскопия ВИ и УФ областях
Колебательные уровни молекул , связанные с колебательными движениями ядер в молекулах около некоторых равновесных положений, с колебаниями молекул, приближенно являющимися гармоническими.	0,025-0,5 эВ (200-4000см ⁻¹)	Переходы между колебательными уровнями энергии: ИК - спектроскопия Спектроскопия КР Оптическая спектроскопия ВИ и УФ областях: электронно-колебательные спектры.
Вращательные уровни молекул , связанные с вращательным движением молекулы как целого. Приближенно вращение молекулы рассматривают как свободное вращение твёрдого тела.	0,001-0,01 эВ (0,1-100см ⁻¹)	Переходы между вращательными уровнями энергии: Инфракрасная спектроскопия (далекая ИК-область) Комбинационное рассеяние ЭПР. колебательно-вращательные спектры (близкая ИК-область) Оптическая спектроскопия ВИ и УФ областях: электронно-колебательные спектры.

Энергия молекулы

$$E = E_{эл} + E_{кол} + E_{вр}$$

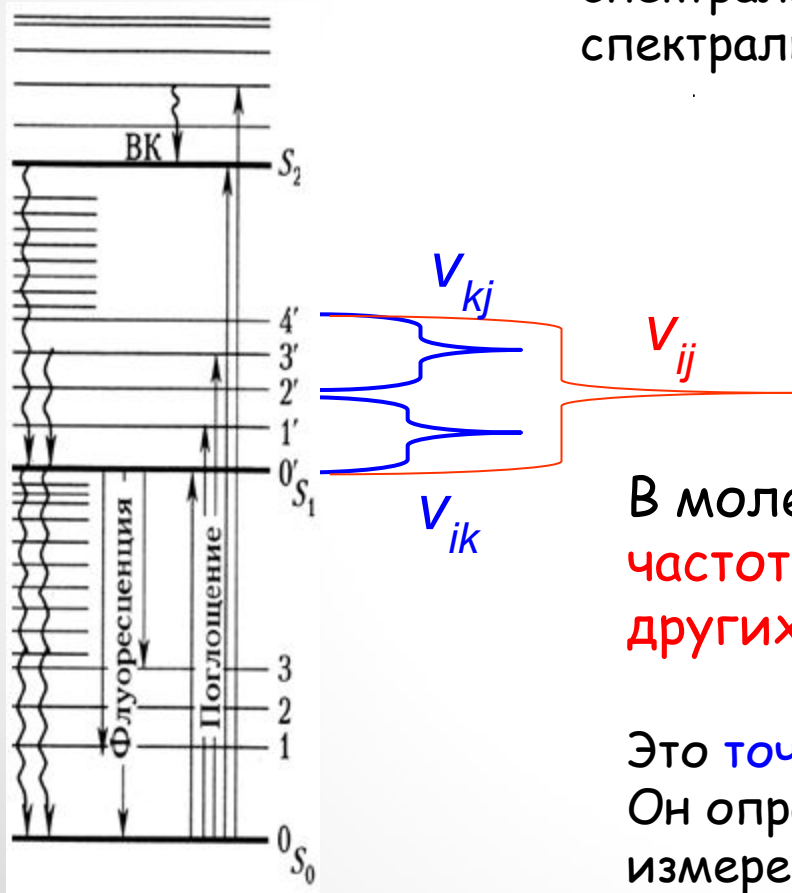
Волновая функция

$$\Psi = \Psi_{эл} \cdot \Psi_{кол} \cdot \Psi_{вр}$$

Комбинационный принцип в спектроскопии – следствие основного квантового закона

Каждому возможному переходу между дискретными уровнями энергии соответствует определенная спектральная линия. Между частотами различных спектральных линий имеются соотношения типа

$$\nu_{ij} = \nu_{ik} + \nu_{kj}$$



В молекуле могут наблюдаться **переходы с частотами, равными комбинациям двух других переходов.**

Это **точный принцип.**

Он оправдывается тем точнее, чем выше точность измерений. Предел его точности определяется шириной спектральной линии.

Шкалы E , ν , $\tilde{\nu}$, kT

Шкала энергий E пропорциональна шкале частот ν и волновых чисел $\tilde{\nu}$.
Для атомных систем можно пользоваться шкалой абсолютных температур T и шкалой kT , являющейся мерой средней тепловой энергии.

$$1 \text{ кал} = 4,19 \text{ Дж}$$

$$\begin{aligned} \lambda \text{ (нм)} &= 10^7 / \tilde{\lambda} \text{ (см}^{-1}\text{)} = \\ &= 28.591 / E \text{ (ккал/моль)} = \\ &= 1239,8 / E \text{ (эВ)} \end{aligned}$$

или

$$\begin{aligned} E \text{ (ккал/моль)} &= 23,0609 E \text{ (эВ)} = \\ &= 0,02859 \nu \text{ (см}^{-1}\text{)} = 28591 \lambda \text{ (нм)} \end{aligned}$$

λ	нм	$\lambda = c/\nu$	1250	800
E	эВ	E	1	1,5
ν	Гц	$\nu = E/h$	$2,4 \cdot 10^{14}$	
$\tilde{\nu}$	см^{-1}	$\tilde{\nu} = \nu/c = 1/\lambda$	8000	
T	К	$T = h\nu/k$	12000	
kT	кал/моль	$kT = h\nu$	23000	

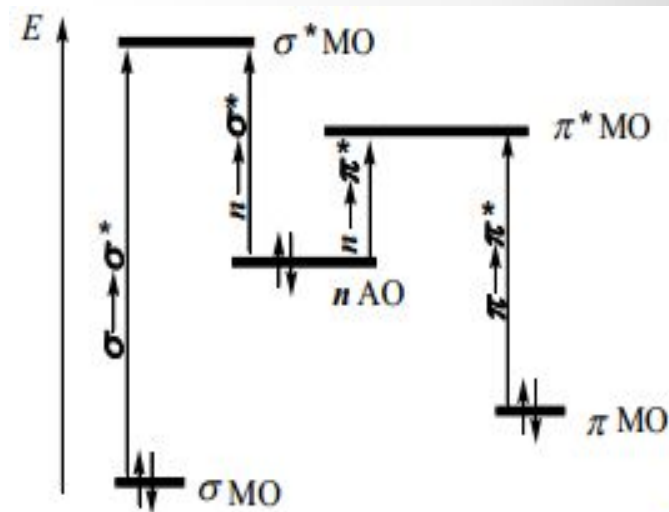
Электронные переходы в молекулах

Электронный переход – это переход электронов с орбиталей молекулы, находящейся в основном состоянии, на свободные орбитали при поглощении света.

В молекулах органических веществ в электронных переходах могут участвовать электроны трех типов:

- **s-электроны**, участвующие в образовании связей;
- **p-электроны**, участвующие в образовании двойных и тройных связей;
- **n-электроны**, не участвующие в образовании связей.

Электроны, образующие химическую связь, находятся в молекуле на молекулярных орбиталях: σ -, π -, δ -....



Согласно принципу Паули на каждом уровне молекул могут располагаться только два электрона с противоположными спинами.

Предполагается, что молекулярные орбитали являются линейной комбинацией атомных орбиталей (ЛКМО), которые при взаимодействии образуют две молекулярные орбитали – связывающую ($\psi = \psi_A + \psi_B$) и разрыхляющую ($\psi = \psi_A - \psi_B$).

Образование связывающих орбиталей является энергетически выгодным, поскольку энергия при этом уменьшается (относительно свободных атомов). Образование разрыхляющей орбитали связано с повышением энергии. Самой низкой по энергии является связывающая σ -орбиталь, далее следует связывающая π -орбиталь. Самой высокой по энергии является разрыхляющая σ^* -орбиталь

Например, в молекуле этилена ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) два атома углерода соединены одной σ и одной π связью. Поглощение фотона соответствующей энергии может привести к переходу одного из π -электронов на разрыхляющие орбитали, обозначаемые π^* . Такой переход называется $\pi \rightarrow \pi^*$ (рис. 1-3).

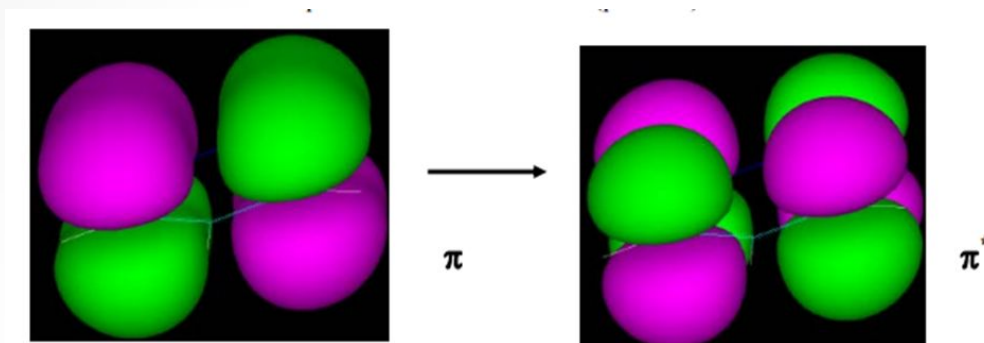


Рис. 1-3. Электронный переход между π и π^* орбиталями.

Молекула также может иметь свободные электроны, локализованные на гетероатомах, например, кислорода и азота. Соответствующие им молекулярные орбитали обозначаются буквой n . Переход этих электронов на разрыхляющую орбиталь возможен и обозначается как $n \rightarrow \pi^*$ (рис. 1-4).

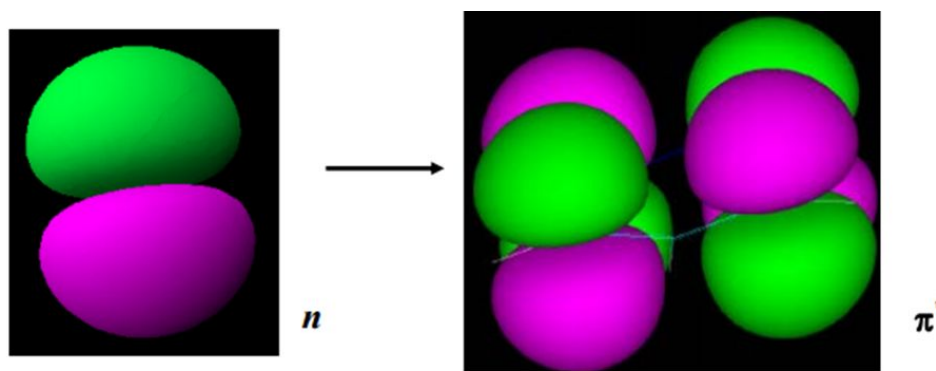


Рис. 1-4. Электронный переход между n и π^* орбиталями.

Энергии таких электронных переходов увеличиваются в следующем ряду: $n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$

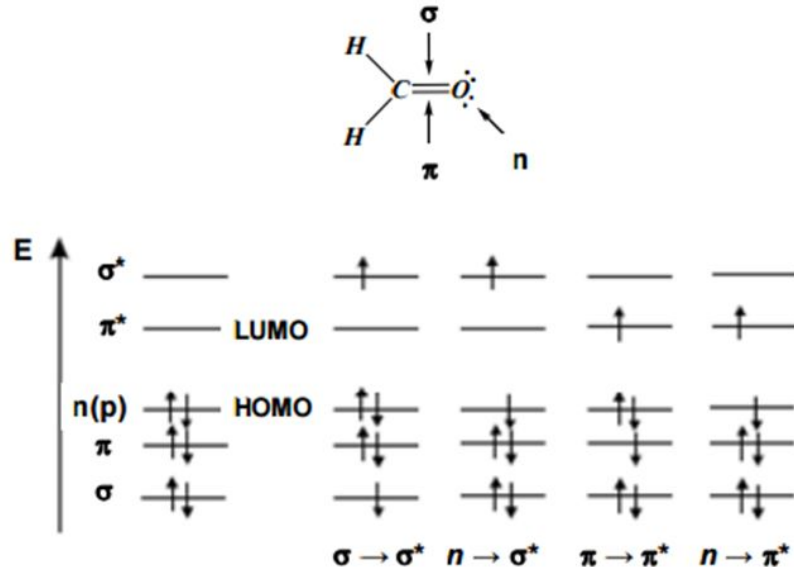


Рис. 1-5. Молекулярные орбитали формальдегида и возможные электронные переходы.

В спектроскопии поглощения и флуоресценции обсуждаются два основных типа орбиталей: высшая занятая молекулярная орбиталь (highest occupied molecular orbital, HOMO) и низшая свободная молекулярная орбиталь (lowest unoccupied molecular orbital, LUMO). Обе эти орбитали относятся к основному состоянию молекулы. Например, для формальдегида (рис. 1-5) HOMO – это n орбиталь, а LUMO – это π^* орбиталь. Когда один из двух электронов с противоположными спинами (принадлежащими молекулярным орбиталям молекулы, находящейся в основном состоянии) переходит на молекулярные орбитали с более высокими энергиями, то его спин не изменяется, поэтому общее спиновое квантовое число остается равным нулю. Уровни, для которых мультиплетность (величина, характеризующая спин атома или молекулы; $M = 2\sum S_n + 1$; где n – число электронов в молекуле или атоме, S – спиновое число каждого электрона) основного и возбужденного состояний равна 1, называются синглетными уровнями (обычно обозначаются как S_0 для основного состояния и $S_1, S_2, \dots$ для возбужденных состояний) (рис. 1-6). Соответствующий переход называется синглет-синглетным. Позднее будет показано, что молекула из возбужденного синглетного состояния может переходить в такое состояние, при котором электрон меняет спин, тогда два электрона имеют параллельные спины, поэтому общее спиновое квантовое число равно 1, тогда как мультиплетность равна 3 (рис. 1-6). Это состояние называется триплетным, поскольку соответствует трем состояниям, равным по энергии. В соответствии с правилом Хунда триплетное состояние имеет более низкую энергию, чем синглетное состояние той же молекулы.

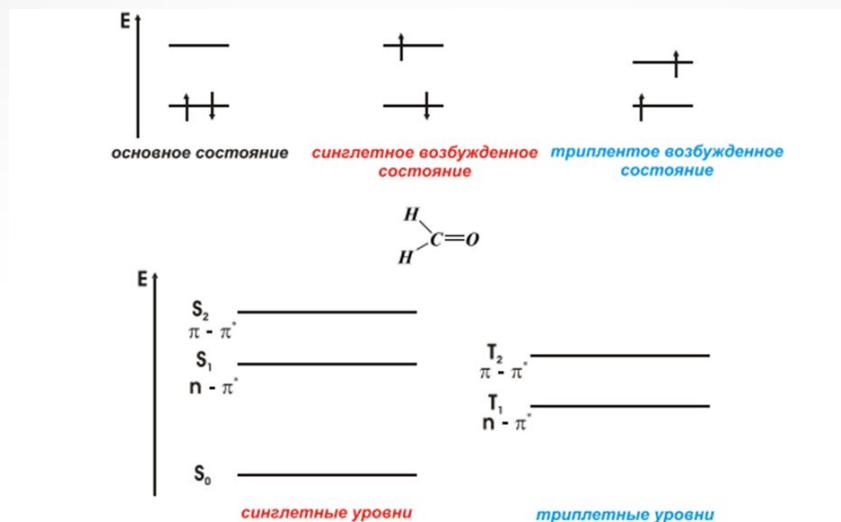


Рис. 1-6. Различие между синглетными и триплетными уровнями на примере молекулы формальдегида.

В таких молекулах как формальдегид, связывающие и разрыхляющие орбитали локализованы (как связи) между парами атомов. Такая картина локализованных орбиталей имеет место для σ орбиталей одинарных связей и для π орбиталей изолированных двойных связей, но не является закономерной в случае чередующихся одинарных и двойных углерод-углеродных связей (в сопряженных системах). В действительности, перекрывание π орбиталей обеспечивает делокализацию электронов во всей системе (эффект резонанса). Бутадиен и бензол являются простейшими случаями линейной и циклической сопряженных систем, соответственно. Поскольку между σ и π орбиталями нет перекрывания, то π электронная система может быть рассмотрена как независимая от σ связей. Необходимо помнить, что чем выше протяженность π электронной системы, тем ниже энергия низшего $n \rightarrow \pi^*$ перехода, и, как следствие, больше длина волны соответствующей полосы поглощения. Это правило применимо к линейным сопряженным системам (полиенам) и циклическим сопряженным системам

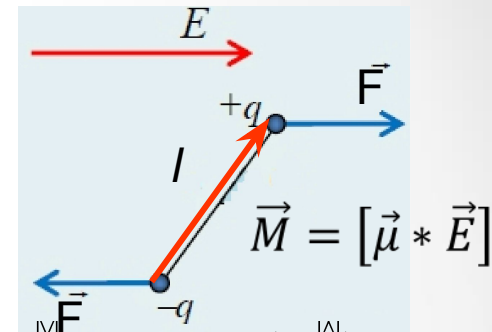
Условия поглощения электромагнитного излучения.

Т.к. размеры молекул намного меньше длины волны видимого излучения со стороны электромагнитной волны на нее действует вращающий момент

1. Дипольное строение молекулы

(Любая в целом электронейтральная система, содержащая электрические заряды, в некотором приближении (то есть собственно в дипольном приближении) может рассматриваться как электрический диполь. Дипольное приближение будет корректным, если расстояние, на котором изучается электрическое поле системы, велико по сравнению с её характерными размерами)

$$\vec{\mu} = ql$$



2. Условие резонанса

(необходимое условие).

Условия частот Бора:

3. Правило отбора 1.

(достаточное условие).

Квадрат дипольного момента перехода

$$|\vec{\mu}_{12}|^2 \neq 0$$

4. Правило отбора 2.

Суммарный спин молекулы не изменяется $\Delta S = 0$

5. Золотое правило Ферми

$$W_{1 \rightarrow 2} = \frac{(\vec{\mu}_{12} \vec{E})^2}{4\hbar^2}$$

$$W \sim |\vec{E}|^2 \cdot |\vec{\mu}|^2 \cdot \cos^2 \theta \quad \theta = \left(\vec{E}; \vec{\mu} \right)$$

$$|\vec{\mu}_1| = \int \psi_1^* |ql| \psi_1 dV$$

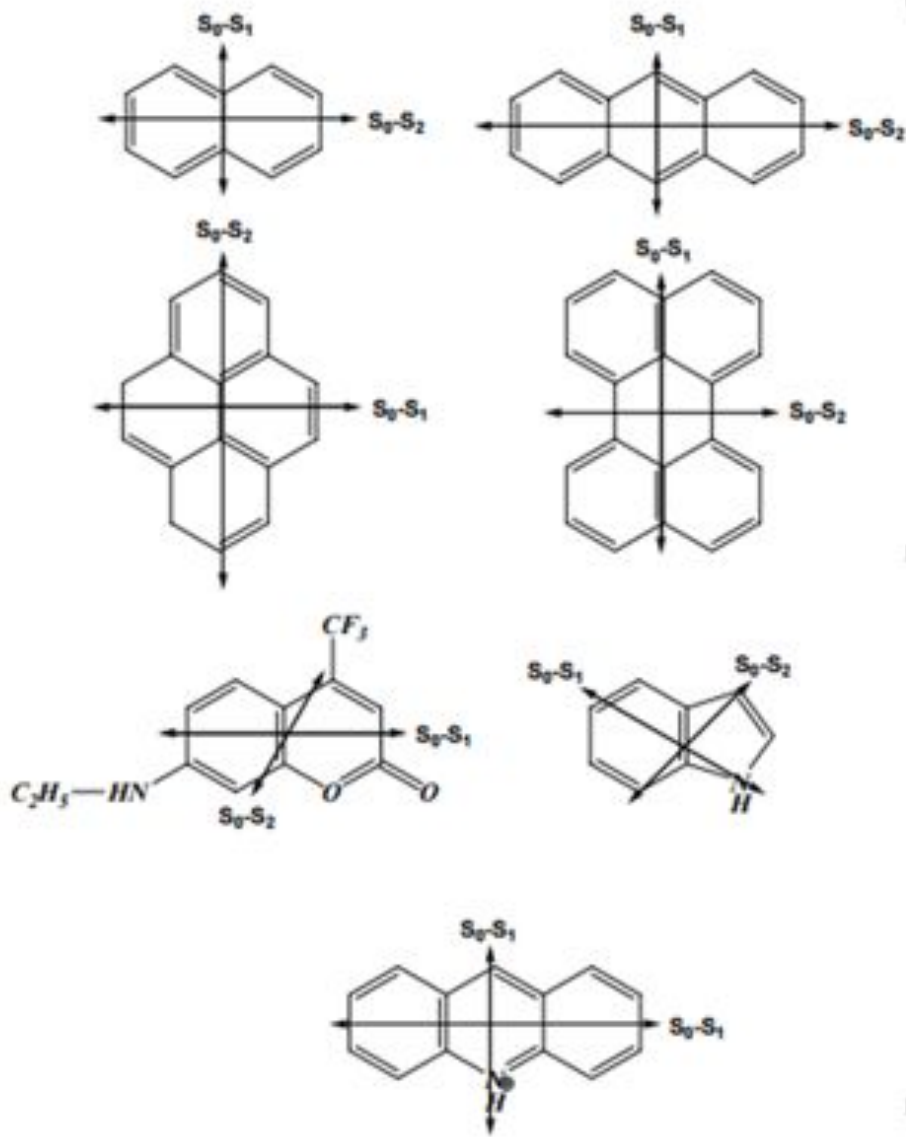
$$|\vec{\mu}_2| = \int \psi_2^* |ql| \psi_2 dV$$

$$|\vec{\mu}_{12}| = \int \psi_1^* |\vec{\mu}_{12}| \psi_2 dV$$

Дипольный момент перехода

В квантовой механике понятие дипольного момента перехода вводится для характеристики электронного перехода между начальным и конечным состояниями. Дипольный момент перехода отображает переходный диполь, образующийся в результате смещения зарядов в процессе перехода, таким образом, это не строго дипольный момент.

В большинстве случаев дипольного момента перехода может быть нарисован как вектор в координатах системы, определяемой положением ядер атомов (Следует отметить, что это неприменимо для молекул, имеющих особую симметрию, таких как бензол (D_{6h}), трифенилен (D_{3h}) и C_{60} (I_h)). Поэтому молекулы, чьи переходные моменты поглощения параллельны вектору напряженности электрического поля, при поглощении линейно поляризованного падающего света предпочтительно возбуждаются. Вероятность возбуждения пропорциональна квадрату скалярного произведения переходного момента и вектора напряженности электрического поля. Эта вероятность принимает максимальное значение, когда два вектора параллельны, и равна нулю, когда они перпендикулярны друг другу.



Для $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов у ароматических углеводородов переходный момент поглощения расположен в плоскости молекулы. Направление переходного момента в соответствии с осями молекулы зависит от электронного состояния, в которое она переходит при возбуждении. Например, у нафталина и антрацена, переходный момент ориентирован вдоль коротких осей для перехода $S_0 \rightarrow S_1$ и вдоль длинных осей для $S_0 \rightarrow S_2$. Различные примеры молекул и их переходных моментов приведены на рис.

Правила отбора при электронных переходах

Правила отбора устанавливают, какие из квантовых переходов (как излучательных, так и безызлучательных) возможны (являются разрешенными), а какие запрещены. Они исходят из наиболее общих соображений о симметрии пространства - времени и о симметрии индивидуальной молекулярной системы.

Каждое из правил отбора связано с одним из законов сохранения и симметрией.

Различают

строгие правила отбора, связанные, например, с сохранением при квантовых переходах полной энергии системы или полного момента количества движения и проекции полного момента на одну из координатных осей,

и

приближенные правила отбора, возникающие в результате введения дополнительных (приближенных) законов сохранения, обусловленных наличием каких-либо малых взаимодействий, например, спин-орбитального взаимодействия.

Правила отбора при электронных переходах

Существует **два основных правила отбора** электронных переходов при поглощении энергии молекулой.

1. Переходы, запрещенные по спину. В нерелятивистском приближении электронный спин системы является сохраняющейся величиной, и, как следствие, разрешенными могут быть только электронные квантовые переходы без изменения спина. Электронные переходы между уровнями с различной мультиплетностью запрещены. Однако, в силу приближенного характера данного правила вероятность квантовых переходов с изменением спина (интеркомбинационная конверсия) отлична от нуля и может быть при определенных условиях достаточно велика: между волновыми функциями состояний с различной мультиплетностью всегда существует слабое взаимодействие за счет спин-орбитального перекрывания*. В результате волновая функция синглетного (или триплетного) состояний всегда содержит небольшую долю триплетной (или синглетной) волновой функции; это приводит к возникновению небольшой, но не пренебрежимо малой, величины интенсивности интеграла перекрывания между синглетным и триплетным состояниями и наоборот. Несмотря на очень низкие молярные коэффициенты поглощения, такие переходы можно наблюдать.

* Спин-орбитальное перекрывание в общем случае может быть объяснено при рассмотрении движения электрона на Боровской орбите. Вращение вокруг ядра порождает магнитный момент (m_l), кроме того, электрон вращается вокруг своей собственной оси, при этом возникает собственный магнитный момент вращения электрона – спин (m_s). Спин-орбитальное перекрывание есть результат взаимодействия между этими двумя магнитными моментами.

Правила отбора при электронных переходах

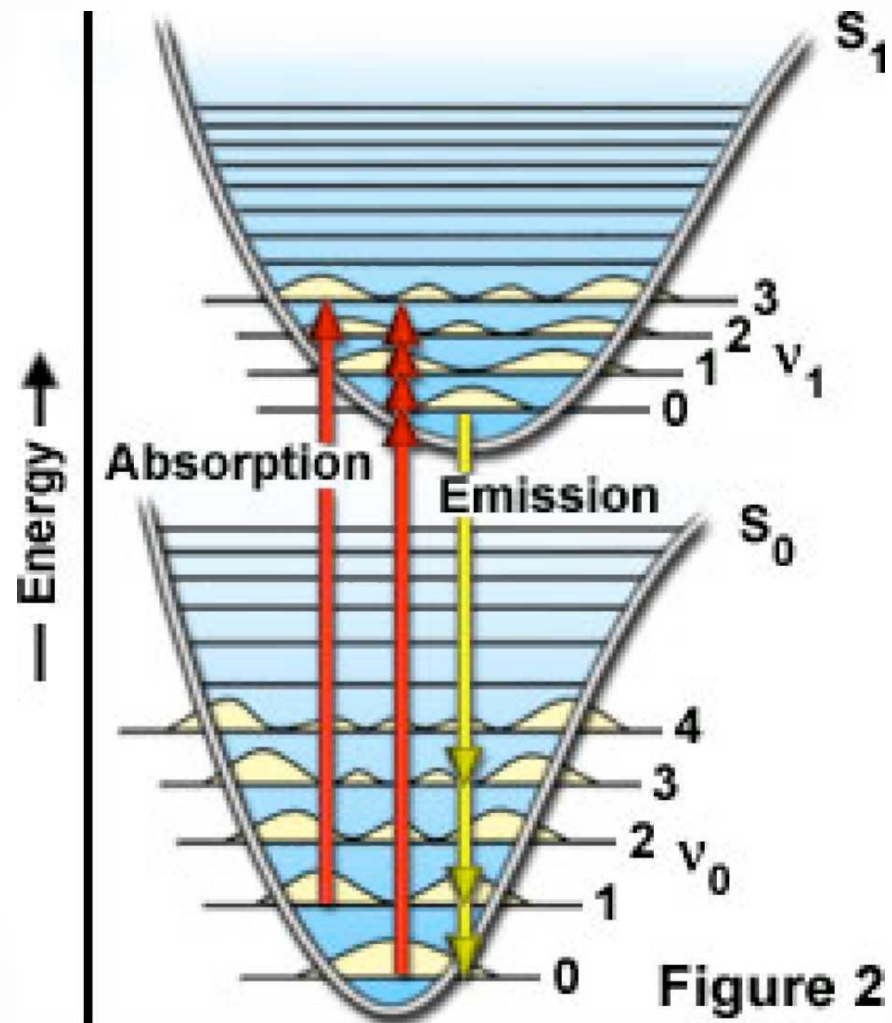
2. Переходы, запрещенные по симметрии. Момент перехода как векторная величина может быть разложен на x-, y- и z- компоненты:

$$M_{mn}(X) = \int \Psi_m^* M_X \Psi_n d\tau;$$

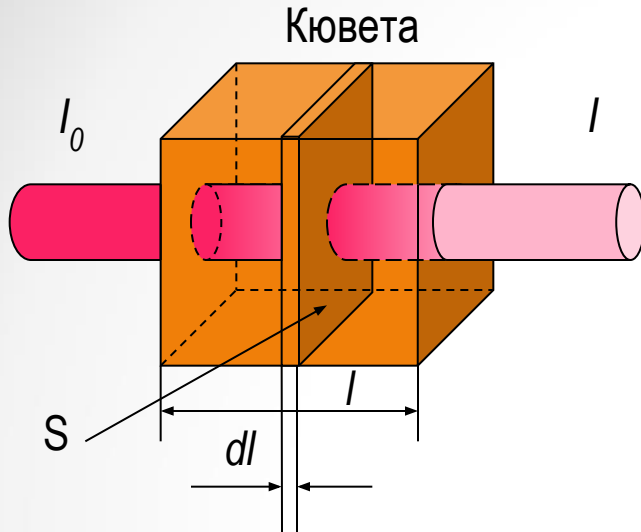
$$M_{mn}(Y) = \int \Psi_m^* M_Y \Psi_n d\tau;$$

$$M_{mn}(Z) = \int \Psi_m^* M_Z \Psi_n d\tau.$$

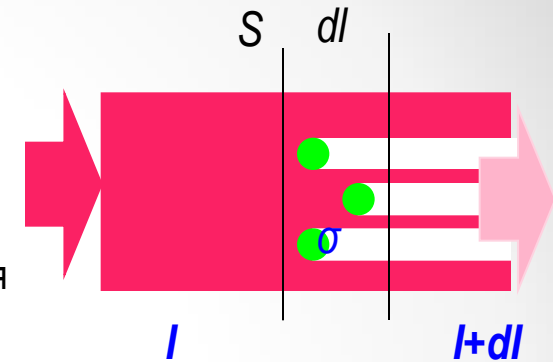
Если симметрия основного и возбужденного состояний молекулы такова, что все эти интегралы равны нулю, то переход запрещен по симметрии. В том случае, когда хотя бы один из интегралов будет отличаться от нуля, переход разрешен. Правило запрета выведено без учета колебательных взаимодействий. Поскольку при колебаниях симметрия может изменяться, то и соответствующие запрещенные по симметрии переходы могут проявляться в спектре в виде полос, имеющих невысокую интенсивность. Чаще всего это наблюдается для $n \rightarrow \pi$ переходов в растворах, которые не содержат водородных связей ($\epsilon \approx 100 - 1000 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).



Закон Бугера – Ламберта – Бера



Молекулы хромофоров
распределены в растворе
равномерно
 $nSdl$ – число молекул в объеме Sdl
 σ – поперечное сечение поглощения
одной мишени
 $nSd\sigma$ – сумма поперечных сечений
мишеней
 $nSd\sigma / S = n\sigma dl$ – суммарная
площадь мишеней на 1 см^2



Согласно теории мишени

Ослабление интенсивности света слоем dl

$$\frac{dI}{I} = -n\sigma dl \quad \Rightarrow \quad \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -n\sigma \int_0^l dl \quad \Rightarrow \quad \ln \frac{I}{I_0} = -n\sigma l$$

Переходя к более распространенным размерностям концентрации c и десятичному логарифму - **Оптическая плотность**

Пропускание

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-n\sigma l}$$

$$D = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \epsilon c l$$

$$\epsilon = \frac{N_A \lg e}{1000} \sigma = 2,62 \cdot 10^{20} \sigma$$

Для хромофора $\epsilon \approx 10^5$

$$\Rightarrow \sigma = 10^{-16}$$

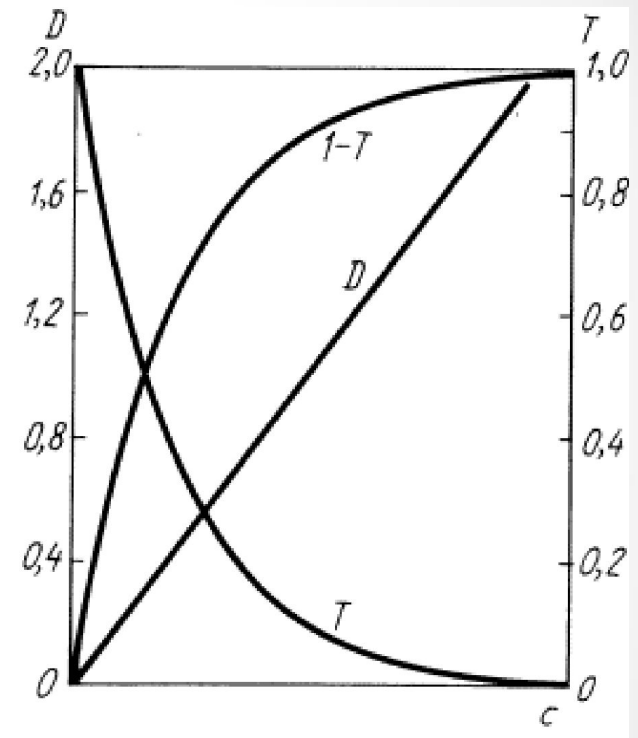
Физический смысл σ : каждая молекула как бы эквивалентна светонепроницаемой площади 10^{-16} см^2 .

I - интенсивность падающего света, I_0 - интенсивность прошедшего света, l - длина кюветы, n - концентрация, молекул / м^3 , S - площадь сечения пучка, σ - поперечное сечение поглощения одной мишени, T - пропускание, A - коэффициент поглощения, D - оптическая плотность, c - число молей в литре (моль/л), ϵ - молярный коэффициент экстинкции (поглощения) (л/(моль · см)), равный оптической плотности 1 M раствора, измеренной при $l=1 \text{ см}$

Отклонения от закон Бугера-Ламберта-Бера

Возможные причины появления отклонений:

1. Молекулы хромофоров **распределены** в растворе **неравномерно**. **Занижение D тем выше, чем больше оптическая плотность частиц.**
2. В формулировке закона БЛБ **подразумевается**, что ϵ **является константой**, не зависящей от концентрации. (Если, например, происходит агрегация молекул), то фотофизические свойства молекул, в том числе и значение ϵ , будут изменяться.
3. При **использовании немонохроматического света** зависимость D от c может отклоняться от линейной.
4. В растворе под действием измеряющего света не должны сколько-нибудь заметно протекать **фотохимические превращения хромофоров**.
5. При достаточно **большой интенсивности** в результате поглощения света **концентрация невозбужденных молекул может заметно уменьшаться** в ходе измерения, происходит **занижение D**
6. Если помимо поглощения **образец рассеивает свет**, то произойдет **завышение D** .
7. Точному измерению оптической плотности может мешать **люминесценция образца**. Если фотоны люминесценции будут попадать на фотодетектор, то это приведет к **занижению D** .



Зависимости пропускания (T), коэффициента поглощения ($1 - T$) и оптической плотности (D) от концентрации (C) хромофора в растворе

Спектр поглощения

Спектром поглощения называется **зависимость оптической плотности от длины волны** (частоты), поглощаемого излучения.

$$D = f(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl$$

При работе с чистыми веществами D приводят к стандартным условиям:
 $l=1$ см, $c=1$ моль /л,

$$\varepsilon = f(\lambda)$$

Условия регистрации спектров: $0,1D < D < 1D$, желательно $(0,3-0,5)D$.

(При $D \geq 1$ $(1-T) \approx 100\%$ - на детекторе света мало. При $D < 0,1$ $(1-T) \rightarrow 0$ - на детекторе света много.)

Для смеси поглощающих компонентов:

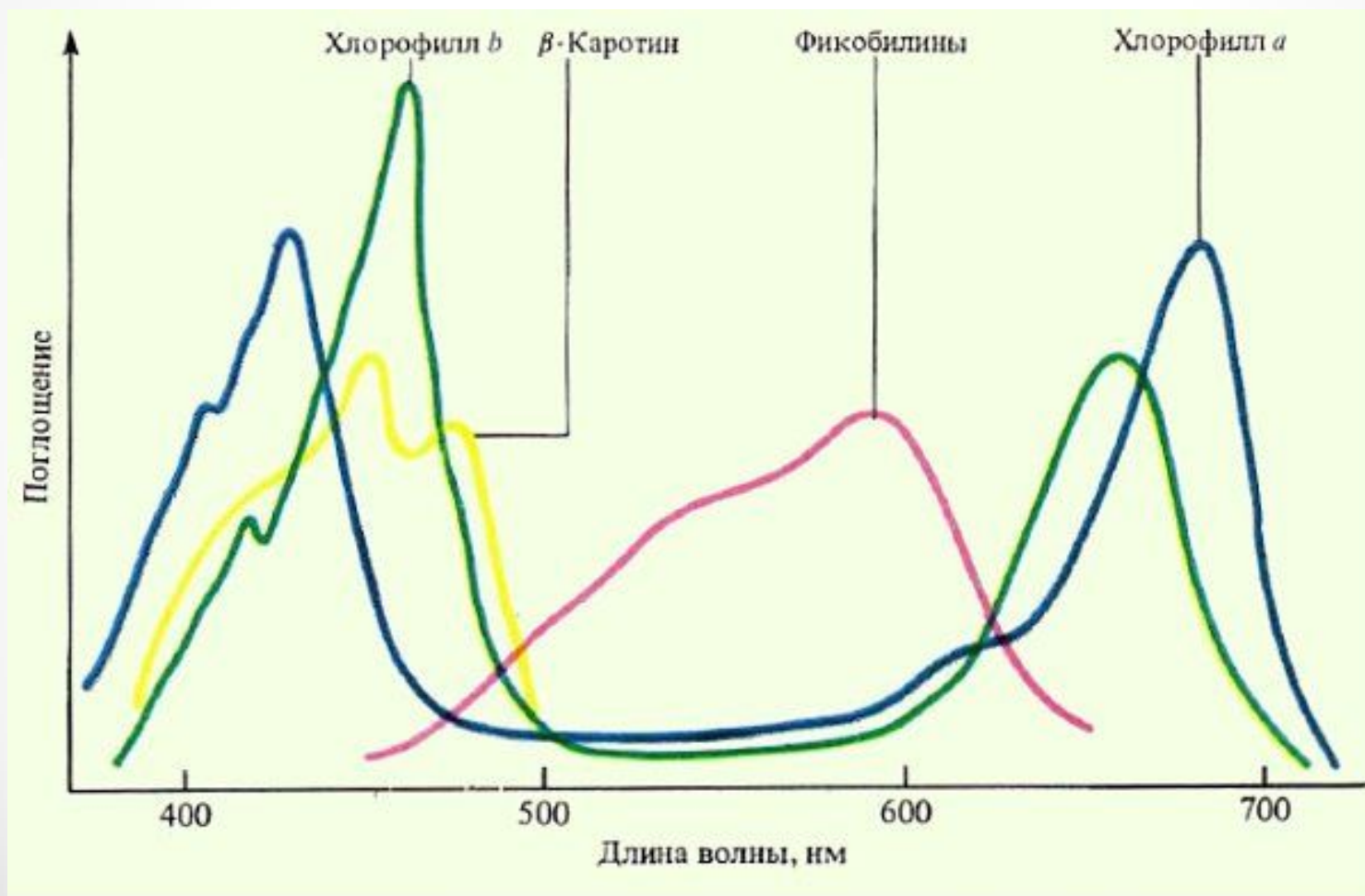
$$D = \sum_{i=1}^n D_i$$

т.к.
$$I = I_0 T_1 T_2 T_3 \dots T_n$$

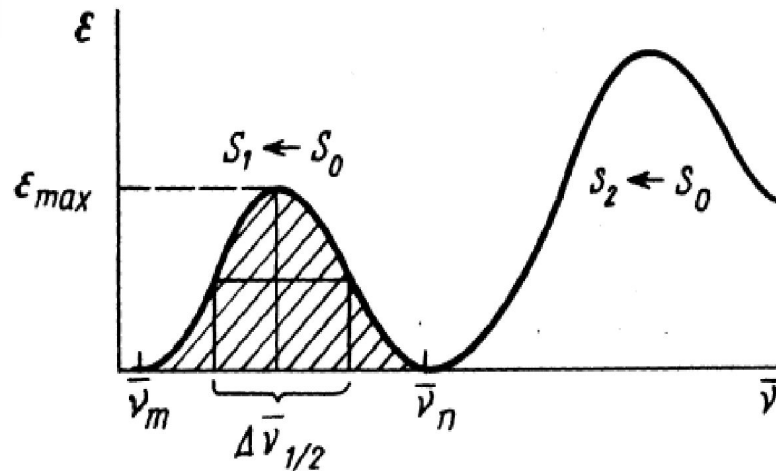
$$\lg \frac{I_0}{I} = D = -\lg T_1 - \lg T_2 - \lg T_3 \dots - \lg T_n = D_1 + D_2 + D_3 + \dots + D_n$$

• n - число компонентов. •

Спектры поглощения биологически важных соединений



Характеристики спектра поглощения



1. **Положение максимума** - соответствует наиболее вероятной усредненной энергии электронного перехода: $E = h\nu$
2. **Площадь под кривой поглощения** - пропорциональна вероятности электронных переходов f_{ij}
3. **Амплитуда** - оптическая плотность в максимуме поглощения ϵ_{max}
4. **Полуширина полосы поглощения** - интервал частот $\Delta\nu_{1/2}$ ($\Delta\lambda_{1/2}$) между точками на кривой поглощения, соответствующими $\epsilon_{max}/2$

Молярный коэффициент поглощения

Молярный коэффициент поглощения, $\varepsilon(\lambda)$, отражает способность молекулы поглощать свет в данном растворителе. В рамках классической теории поглощение света молекулой вещества может быть описано, если представить ее как колеблющийся диполь, который позволяет ввести величину, называемую силой осциллятора (или силы колебания), которая напрямую связана с интегралом полосы поглощения следующим образом:

$$f = 2303 \frac{mc_0^2}{N_A \pi e^2 n} \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = \frac{4.32 \times 10^{-4}}{n} \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}$$

где m и e – масса и заряд электрона, соответственно, c_0 – это скорость света, n – коэффициент отражения, а $\tilde{\nu}$ – волновое число (в см^{-1}), f – безразмерная величина, причем ее значения нормированы таким образом, что максимальное равно 1.

Для $n \rightarrow \pi^*$ переходов значения ϵ составляют порядка нескольких сотен или меньше и соответствующие им значения сил осцилляторов не выше чем $\sim 10^{-3}$. Для $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов значения ϵ и f , в принципе, гораздо выше (кроме переходов, запрещенных по симметрии): f близко к 1 для некоторых соединений, а соответствующие значения ϵ – порядка 10^5 . В табл. приведены некоторые примеры значений ϵ .

Величины молярных коэффициентов поглощения, ϵ , для некоторых органических соединений.*

Вещество	ϵ , моль ⁻¹ ·см ⁻¹	Вещество	ϵ , моль ⁻¹ ·см ⁻¹
бензол	≈200	акридин	≈12000
фенол	≈2000	бифенил	≈16000
карбазол	≈4200	биантрил	≈24000
1-нафтол	≈5400	аридиновый оранжевый	≈30000
индол	≈5500	перилен	≈34000
флуорен	≈9000	эозин Y	≈90000
антрацен	≈10000	родамин Б	≈105000
сульфат хинина	≈10000		

* Значения ϵ приведены для длины волны, соответствующей максимальной полосе поглощения. Даны только примерные значения, поскольку значения ϵ сильно зависят от растворителя

Площадь под кривой поглощения

Связь между молярным коэффициентом поглощения (экстинкции) и молекулярными свойствами вещества.

1. Сила осциллятора электронного перехода f_{ij} - мера интенсивности поглощения. Определяется вероятностью перехода молекулы из основного состояния i в возбужденное - j .

$$f_{ij} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\tilde{\nu}_1}^{\tilde{\nu}_2} \varepsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} = 4,32 \cdot 10^{-9} \varepsilon_{\max} \Delta\tilde{\nu}_{1/2}$$

$\int_{\tilde{\nu}_1}^{\tilde{\nu}_2} \varepsilon(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}$ - интегральный молярный коэффициент экстинкции равный площади под кривой поглощения.

Правило сумм Куна - Томаса: $f_{ij} = 1$
(Для многих сильно окрашенных соединений)
В общем случае сила осциллятора принимает значения $0,1 < f_{ij} \leq 1$

2. Дипольная сила перехода D_{ij} равна квадрату дипольного момента перехода:

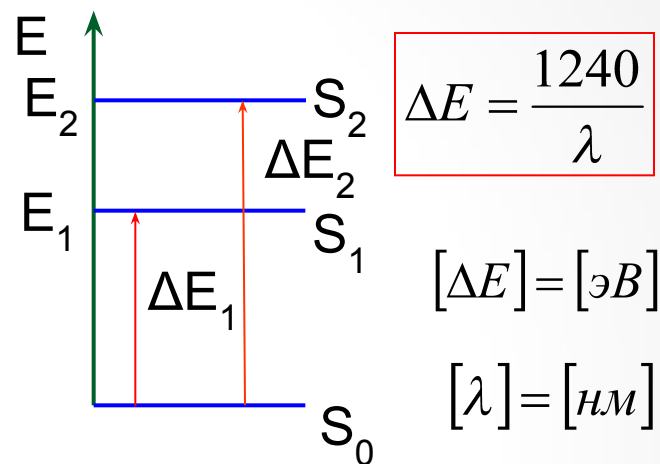
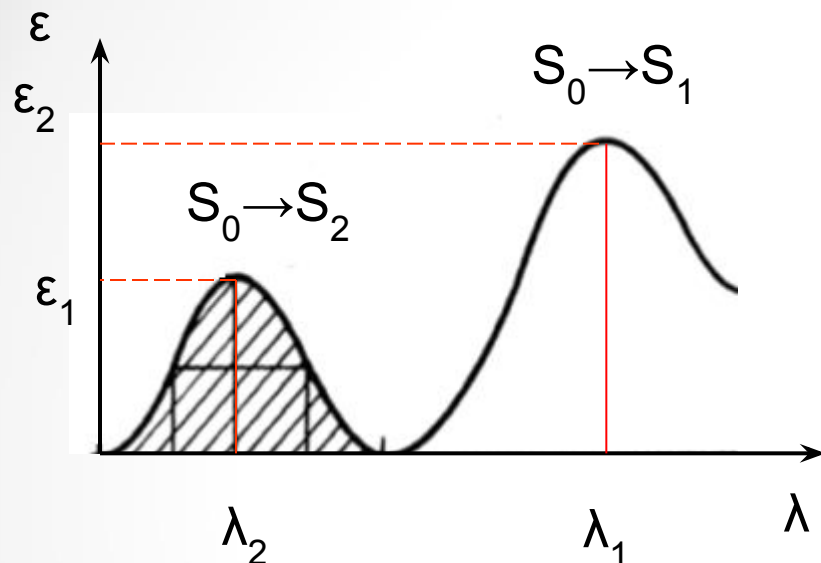
$$f_{ij} = \frac{8\pi^2 mc}{3he^2} \tilde{\nu} D_{ij}^2 \quad D_{ij} = 9,1 \cdot 10^{-3} \int_{\tilde{\nu}_1}^{\tilde{\nu}_2} \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu}$$

3. Дипольный момент перехода μ_{ij} - определяет вероятность перехода $i \rightarrow j$.

Пример: $\Delta\nu_{1/2} \approx 5000 \text{ см}^{-1}$. Если $f_{ij} = 1$, то $\varepsilon_{\max} = 5 \cdot 10^4 \text{ л/(моль} \cdot \text{см)}$, что соответствует значению ε в максимуме наиболее окрашенного соединения.

$$D_{ij} = \left| \mu_{ij} \right|^2$$

Информация из спектра поглощения



1. Определить частоту (длину волны) поглощения
2. Рассчитать энергии электронных переходов соответствии с формулой
3. Определить силу осциллятора.
4. Определить дипольную силу перехода.
5. Рассчитать дипольный момент перехода.
6. В соответствии с законом БЛБ рассчитать концентрацию поглощающего вещества.

Спектры поглощения органических молекул

Большой экспериментальный материал показывает, что **появление поглощения в области 200-800 нм** связано с наличием в органических молекулах кратных связей или функциональных групп, имеющих неподеленные пары электронов (**C=O, NO, N=N**). Эти группы атомов, получили название хромофорных

Длина волны, на которой происходит поглощение света веществом, зависит от наличия в нем двойных связей и от их числа.

Спектры поглощения биологически важных соединений

1 - фосфолипиды,
выделенные из мозга ($N = 1$);

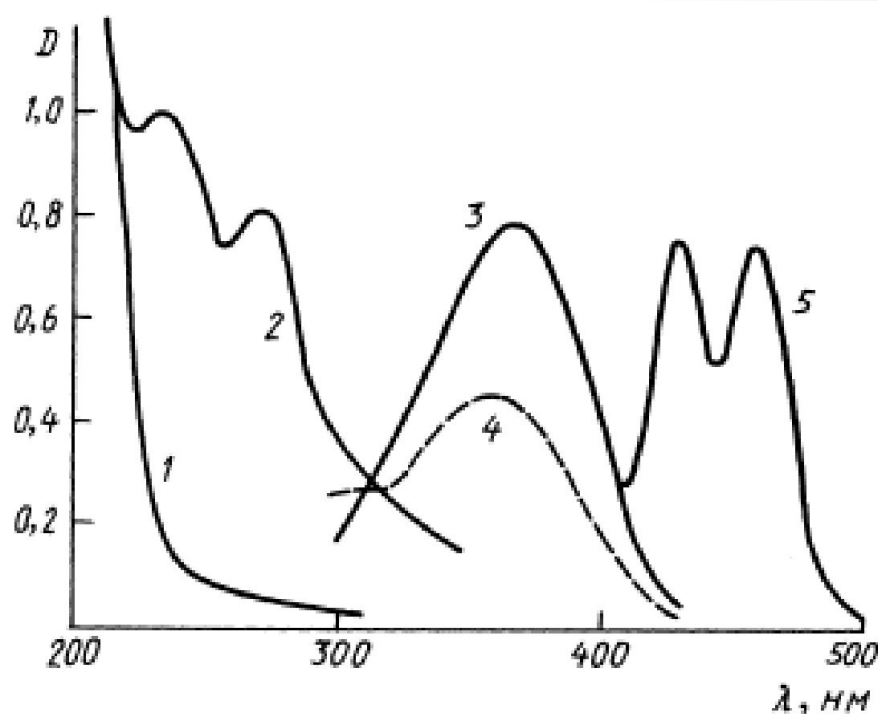
2-окисленные фосфолипиды:
диеновые конъюгаты
 $\lambda_{\text{max}} = 233 \text{ нм}$ ($N = 2$),

3 - триеновые конъюгаты
 $\lambda_{\text{max}} = 270\text{-}280 \text{ нм}$ ($N = 3$),
частично, карбонильные
соединения;

4 - полностью-транс-ретиноаль
($N=6$);

5 - каротиноиды ($N = 11$).

Зависимость положения
длинноволнового максимума
поглощения от числа сопряженных
двойных связей (N) в молекуле.



N — число сопряженных двойных связей

Спектры поглощения биологически важных соединений

Спектры молекул, содержащих гетероатомы (O, N), входящие в систему сопряженных связей или непосредственно примыкающие к ней.

Энергия верхних заполненных уровней гетероатомов (**n-орбитали**) значительно превышает

не только энергию σ -электронов, образующих одинарные связи (**σ -орбитали**), но и часто

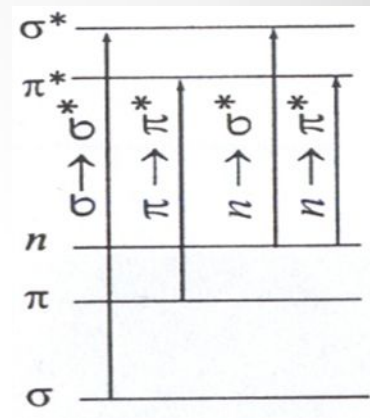
превышает энергию заполненных орбиталей сопряженных двойных связей (**π -орбитали**)

Возможные переходы при поглощении ВИ и ближней УФ области спектра:

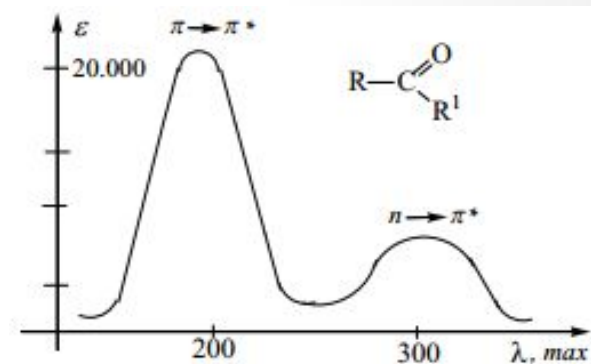
$n \rightarrow \pi^*$ - переход (проявляется в виде плеча на основной полосе поглощения)

$\pi \rightarrow \pi^*$ - переход (основной)

Наиболее изучен **$n \rightarrow \pi^*$ - переход** в карбонильной группе **$>C=O$** , присутствующей в молекуле ацетона, в составе пептидных связей, белках и т.д. $\lambda_{\max} \approx 280 \text{ нм}$, $\epsilon_{\max} = 17 \text{ л/(моль*см)}$



КАРБОНИЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ



Увеличение размера углеводородного радикала (или накопление алкильных групп) приводит к батохромному сдвигу и увеличению интенсивности поглощения

Влияние растворителя на спектры поглощения

Важным экспериментальным критерием отнесения полосы к $n \rightarrow \pi^*$ или к $\pi \rightarrow \pi^*$ переходам является направление смещения максимума поглощения (правило Мак-Конелла) при переходе от неполярных растворителей (например гептан, четыреххлористый углерод) к полярным (спирт, вода). Для $n \rightarrow \pi^*$ перехода наблюдается «синий» или *гипсохромный* сдвиг длины волны (*коротковолновый*), а для $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода чаще «красный» или *батохромный* (длинноволновый) сдвиг.

Эффект растворителя для $n \rightarrow \pi^*$ перехода можно наблюдать на примере ацетона

Растворитель	C_6H_{14}	$CHCl_3$	CH_3OH	H_2O
λ_{max} , нм	279	277	270	264.5

Самым надежным критерием отнесения полосы к переходу с участием несвязывающих электронов $n \rightarrow \pi^*$ является ее исчезновение в кислых средах

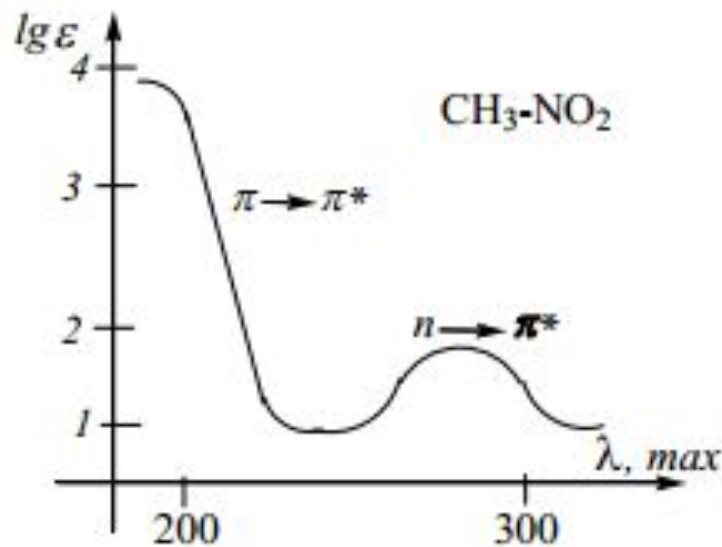
Сравнительная характеристика электронных переходов

Тип перехода	О П И С А Н И Е			
	структура полос	влияние полярности растворителя	кислая среда	положение полосы в спектре, $\epsilon_{\max}$
$\sigma \rightarrow \sigma^*$				дальняя УФ-обл, от 100 до 200 нм, $\epsilon_{\max} = 200-300$
$\pi \rightarrow \pi^*$	заметна в большинстве растворителей; набор колебательных полос для C=C	переходы сдвигаются в батохромную сторону (красную)	не влияет	средняя и ближняя УФ- область, от 130 до 300 нм (в зависимости от C=C связи) $\epsilon_{\max} = 10000$
$n \rightarrow \pi^*$	отчетливая в неполярных растворителях; размазанная в полярных; набор колебательных полос C=O	переходы сдвигаются в гипсохромную (синюю) область	исчезает	ближняя УФ-область или видимая; от 250 до 500 нм, $\epsilon_{\max} = 10-400$ (низкая)
$n \rightarrow \sigma^*$				средняя УФ-область, от 190 до 250 нм,

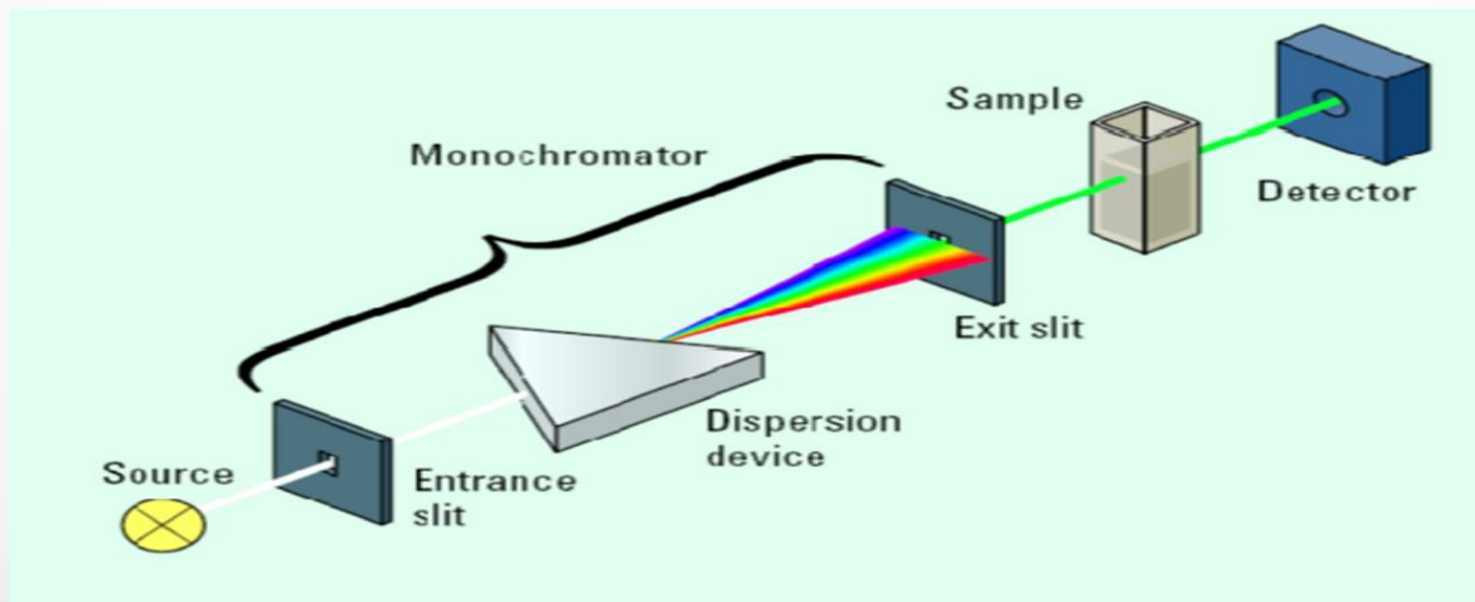
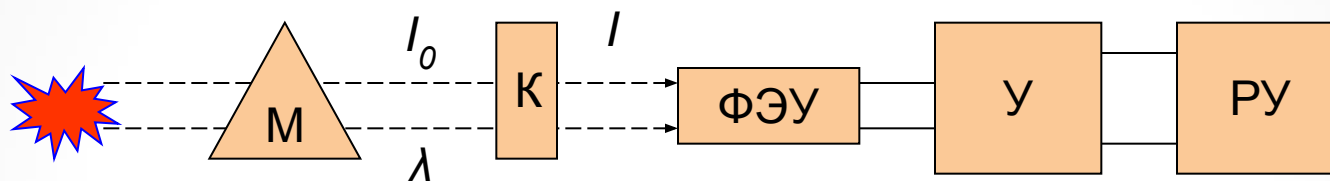
АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ. В аминах наблюдается две полосы поглощения, относящиеся к $n \rightarrow \pi^*$ переходу, которые смещаются в длинноволновую часть спектра при увеличении числа заместителей. Метиламин ($\lambda_{\max} \approx 173$ и $\lambda_{\max} \approx 213$ нм). Присоединение аминогруппы к этиленовой группе вызывает bathochromic shift полосы на 40-50 нм и увеличение интенсивности до 20000.

Азосоединения ($N=N$) имеют малоинтенсивные полосы в видимой ($\epsilon_{\max} = 20-400$) и УФ- (200 нм, $\epsilon_{\max} = 1000$) областях

НИТРОСОЕДИНЕНИЯ. Нитроалканы дают две полосы поглощения: полосу $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода (200 нм, $\epsilon_{\max} = 50\,000$) и полосу $n \rightarrow \pi^*$ перехода (270 нм, $\epsilon_{\max} = 20-40$), например, спектр нитрометана



Блок-схема однолучевого спектрофотометра



Качественный спектрофотометрический анализ

Качественный спектрофотометрический анализ основывается на том, что каждое соединение имеет характерный для него спектр поглощения.

Для идентификации вещества наиболее важны следующие параметры:

- 1) число максимумов в спектре поглощения,
- 2) положение (длина волны) каждого максимума;
- 3) значение коэффициентов поглощения в каждом из максимумов (в единицах ϵ или E);
- 4) отношение амплитуд максимумов, т. е. отношение коэффициентов поглощения в максимумах, если их несколько.

Сложность спектра поглощения зависит от того, какому числу электронных переходов между разными уровнями соответствует данный спектр. Считается, что каждый электронный переход дает полосу поглощения, которая на графике представлена кривой, близкой к гауссовой кривой нормального распределения.

Количественный спектрофотометрический анализ

Количественный спектрофотометрический анализ основан на применении закона Бугера-Ламберта-Бера.

При количественном анализе можно одновременно определять концентрацию нескольких веществ, если спектры их поглощения различаются по форме.

Суммарный спектр поглощения D_{Σ} нескольких веществ есть простая сумма спектров поглощения компонентов, так как при всех длинах волн оптические плотности компонентов суммируются.

Например, для двухкомпонентной смеси при любой длине волны D_A и D_B – оптические плотности компонентов.

$$D_{A+B} = \varepsilon_A c_A l + \varepsilon_B c_B l$$

Трудности при измерении спектров поглощения биологических объектов

- Спектр поглощения – суперпозиция кривых поглощения индивидуальных компонентов.
- Сильное рассеяние.
- Большая оптическая плотность (используется только для исследования веществ в малых концентрациях).
- Высокая светочувствительность.
- Гетерогенность образцов.
- Поскольку метод измерения поглощения по сути является дифференциальным (оптические свойства объекта всегда сравниваются с оптическими свойствами контрольного объекта), могут возникнуть ошибки, связанные с регистрацией и последующим сравнением этих спектров.

Пути преодоления трудностей

- Использование светочувствительных приемников, фотоумножителей, интегрирующих сфер.
- Добавление к объекту веществ, увеличивающих показатель преломления (глюклаза, глицерин)
- Разложение спектра на составляющие
- Использование информации о коэффициентах поглощения компонентов)
- Дифференциальная спектрофотометрия
- Производная абсорбционная спектроскопия

Разностная спектрофотометрия

Метод регистрации спектров поглощения имеет **ряд недостатков**:

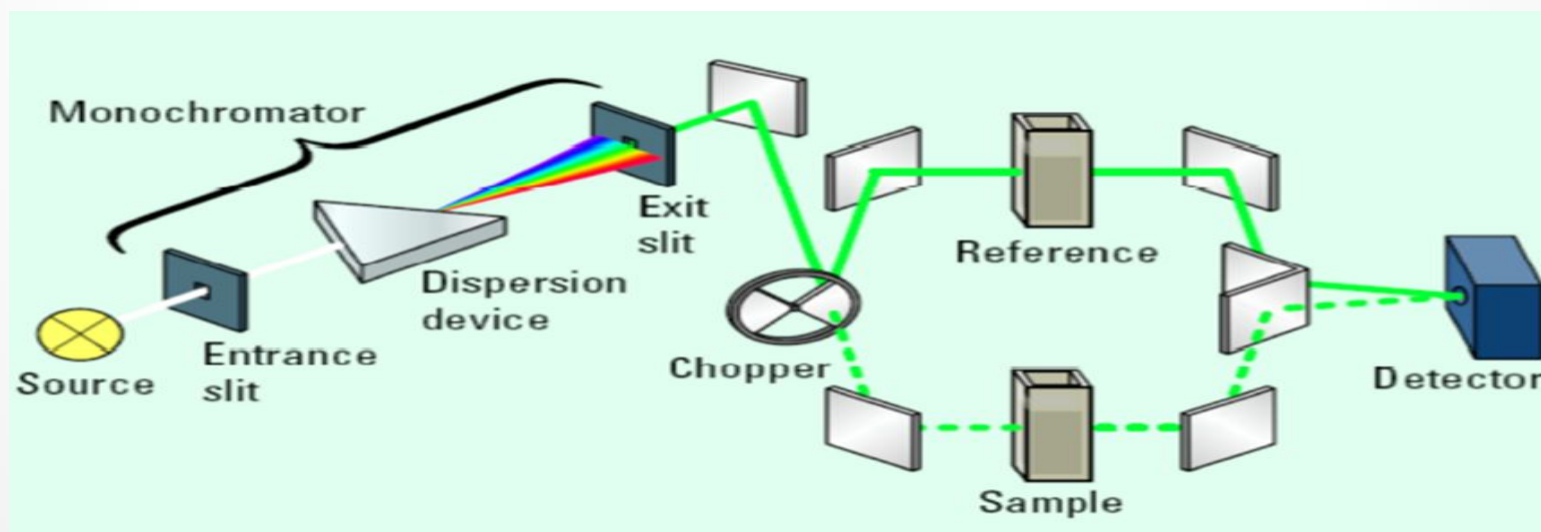
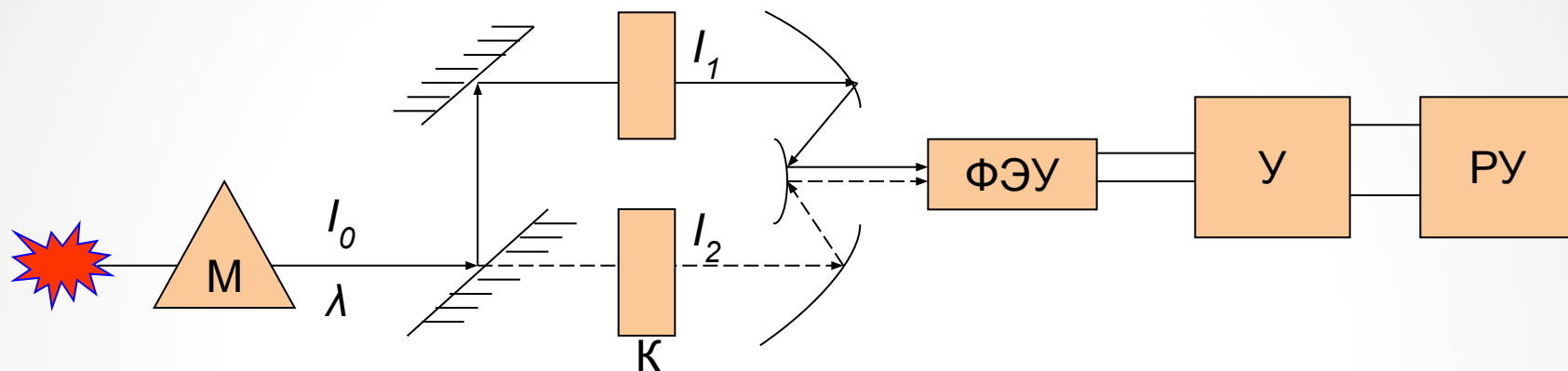
- 1.Используется только для исследования **веществ в малых концентрациях**.
- 2.Поскольку метод измерения поглощения по сути является дифференциальным (оптические свойства объекта всегда сравниваются с оптическими свойствами контрольного объекта), могут возникнуть **ошибки, связанные с регистрацией и последующим сравнением этих спектров**.

Двухлучевые (или двухволновые) спектрофотометры, позволяют регистрировать непосредственно разность оптических плотностей ΔD по интенсивностям света, прошедшего через исследуемый и контрольный объекты.

$$\Delta D = \lg \left(\frac{I_1}{I_2} \right)$$

Прямые измерения разностных (дифференциальных) спектров поглощения заключается в регистрации ΔD или ε в зависимости от длины волны: $D=f(\lambda)$.

Блок-схема двухлучевого спектрофотометра



Достоинства метода:

1. Точность метода.
2. Возможность использования оптически плотных объектов, но близких по концентрации.

Разрешающая способность спектрофотометра.

Необходимый предел разрешения

Успешный анализ спектров поглощения зависит от точности регистрации спектров, а также определяется разрешающей способностью и чувствительностью спектрофотометра.

Разрешающая способность оптических приборов характеризует способность этих приборов давать раздельное изображение двух близких друг к другу точек объекта.

Наименьшее линейное (или угловое) расстояние между двумя точками, начиная с которого их изображения сливаются и перестают быть различимыми, называется линейным (или угловым) пределом разрешения. Обратная ему величина служит количественной мерой разрешающей способности оптического прибора.

$$R = \frac{\lambda}{\delta\lambda}$$

Повышение разрешающей способности достигают увеличением угловой дисперсии или сужением щели монохроматора. Однако, с уменьшением ширины щели уменьшается световой поток. Поэтому следует оценить нижнюю границу спектрального интервала, выделяемого монохроматором.

$$\frac{\Delta\varphi}{\Delta\lambda}$$

Ширина спектрального интервала, выделяемого монохроматором,
 $1/D$ - **линейная дисперсия**

$$\Delta\lambda = \frac{1}{D} S$$

Выбор ширины щели

Выбор ширины щели определяется данными о ширине измеряемой полосы. (Экспериментально $\Delta\lambda$ может быть определена как полуширина полосы, полученной при записи очень узкой спектральной линии (например, эмиссионного спектра Hg или Fe).)

Для практических целей, в случае полос, контур которых описывается гауссовой кривой, $\Delta\lambda$ должна быть в 6-7, иногда в 10 раз меньше полуширины измеряемой полосы.

Пример. При измерении спектра поглощения ряда фотосинтетических объектов

- в красной и инфракрасной области $\Delta\lambda=1-1,5$ нм (ширина измеряемой полосы - 10-15 нм);*
- в УФ, коротковолновой видимой и, если не требуется разрешения тонкой структуры - $\Delta\lambda=3-4$ нм.*

Количественные критерии разрешения спектров

критерий Реллея: две полосы гауссовой формы равной ширины и интенсивности считаются разрешенными, если величина провала на суммарной кривой не менее 20% их максимального значения. Согласно этому критерию установлена связь между шириной индивидуальной линии и расстоянием между максимумами в симметричном дублете при провале 50%

$$\Delta\nu = 1,5\Delta x$$

критерий Сперроу: две полосы гауссовой формы равной ширины и интенсивности считаются разрешенными, если между кривыми лишь обнаруживается «провал». Полосы считаются разрешенными, если вторая производная суммарного спектра в максимуме равна 0. В этом случае

$$\Delta\nu = 0,849\Delta x$$

Δx - полуширина индивидуальной полосы, $\Delta\nu$ - расстояние между максимумами в дублете

Для случая более сложного спектра количественные критерии не разработаны и для анализа спектров может быть использована вычислительная техника.

Способы увеличения разрешающей способности спектрофотометра

Помимо аппаратурных ограничений, существуют ограничения, обусловленные характером самих спектров, состоящих из близко расположенных и сильно перекрывающихся индивидуальных полос с различной интенсивностью и полушириной.

Реальное **увеличение разрешающей способности** спектрофотометра связано

- с **понижением температуры;**
- с **применением производной спектрофотометрии.**

Производная спектрофотометрия

Производная спектрофотометрия – разновидность дифференциального метода.

Сущность метода – непосредственное измерение разницы оптических плотностей D_1 и D_2 для двух монохроматических лучей λ_1 и λ_2 , разделенных спектральным интервалом. Отношение разности оптических плотностей к ширине спектрального интервала – является функцией длины волны при $\Delta\lambda \rightarrow 0$:

$$\frac{dD}{d\lambda} = f(\lambda)$$

Спектр поглощения биологического объекта – суперпозиция спектров индивидуальных компонентов, проявляющихся в виде «плеч», перегибов, асимметрии полос. Все эти элементы структуры могут быть слабо выражены. Использование метода производной спектрофотометрии позволяет отчетливо выявить структуру спектра поглощения и в ряде случаев оценить параметры индивидуальных полос за счет повышения разрешающей способности.

Достоинства метода.

- Отчетливо проявляет элементы структуры.
- Положение максимумов определяется более точно.

Недостатки метода.

- Критерий разрешения такой же, как и для кривых поглощения (для симметричного дублета)
- Для более общего случая анализ не сделан.
- Усложняется форма кривой.

$$\Delta\nu = 0,849\Delta x$$

Вторая производная спектра поглощения.

$$\frac{d^2 D}{d\lambda^2} = f(\lambda)$$

- Достоинства метода.**

1. Спектр второй производной по форме ближе к спектру поглощения.
2. Теоретический предел разрешения значительно увеличивается за счет сужения полос.

- Недостатки метода.**

1. Для более общего случая анализ не сделан.
2. Усложняется форма кривой.
Появляются «сателлиты» (дополнительные провалы) на обоих склонах основных максимумов инвертированной второй производной.

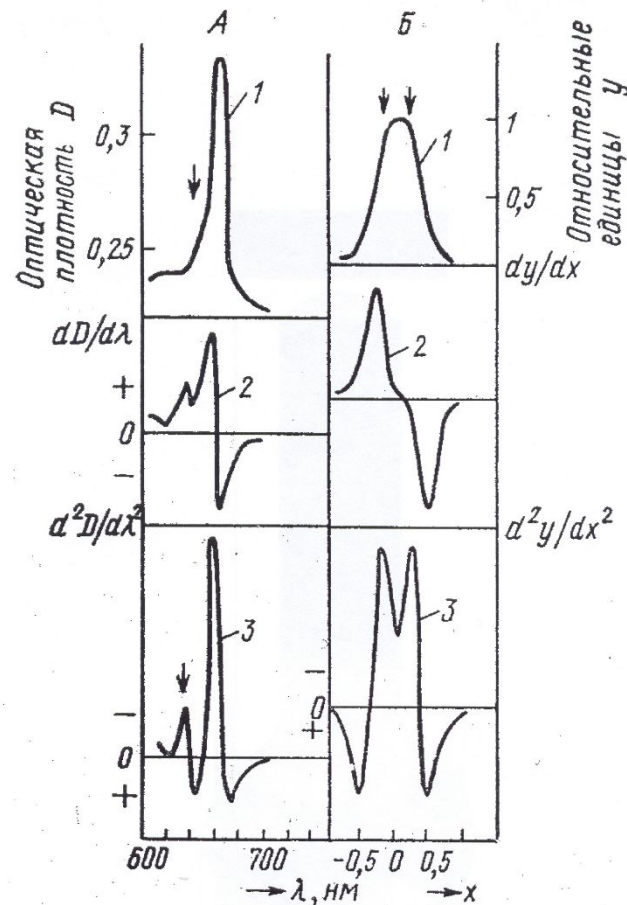
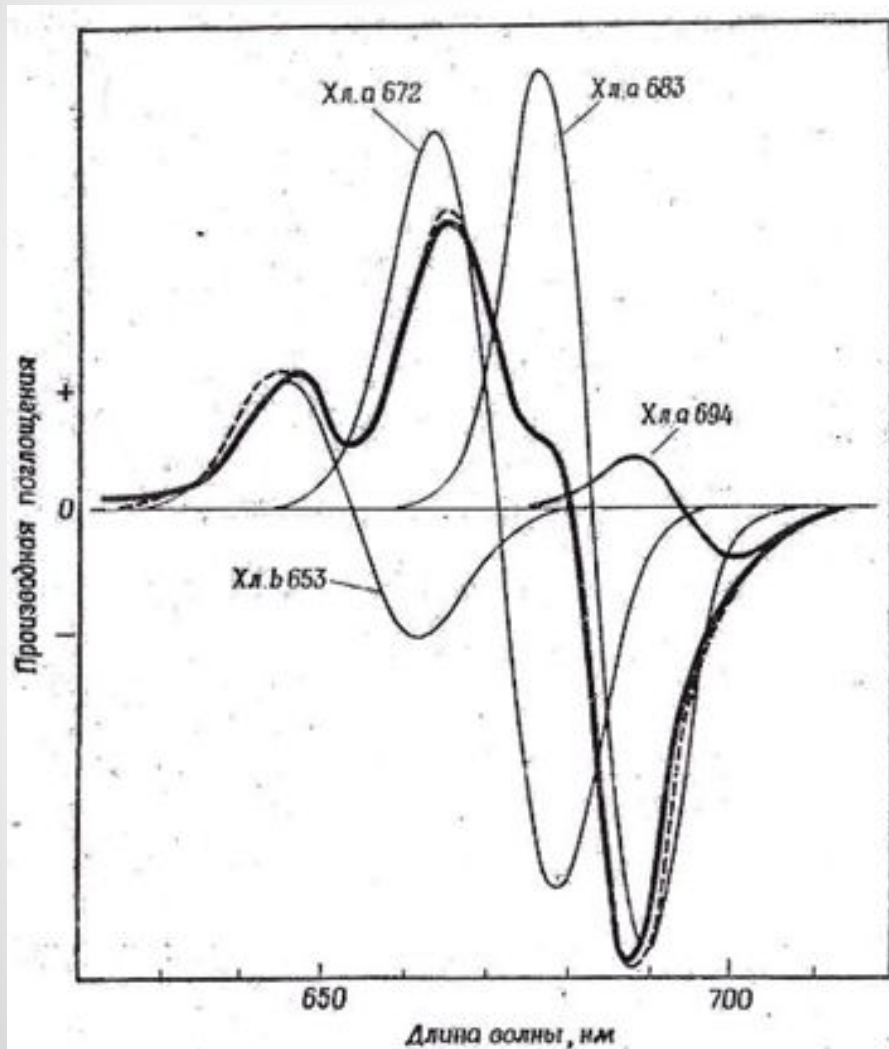


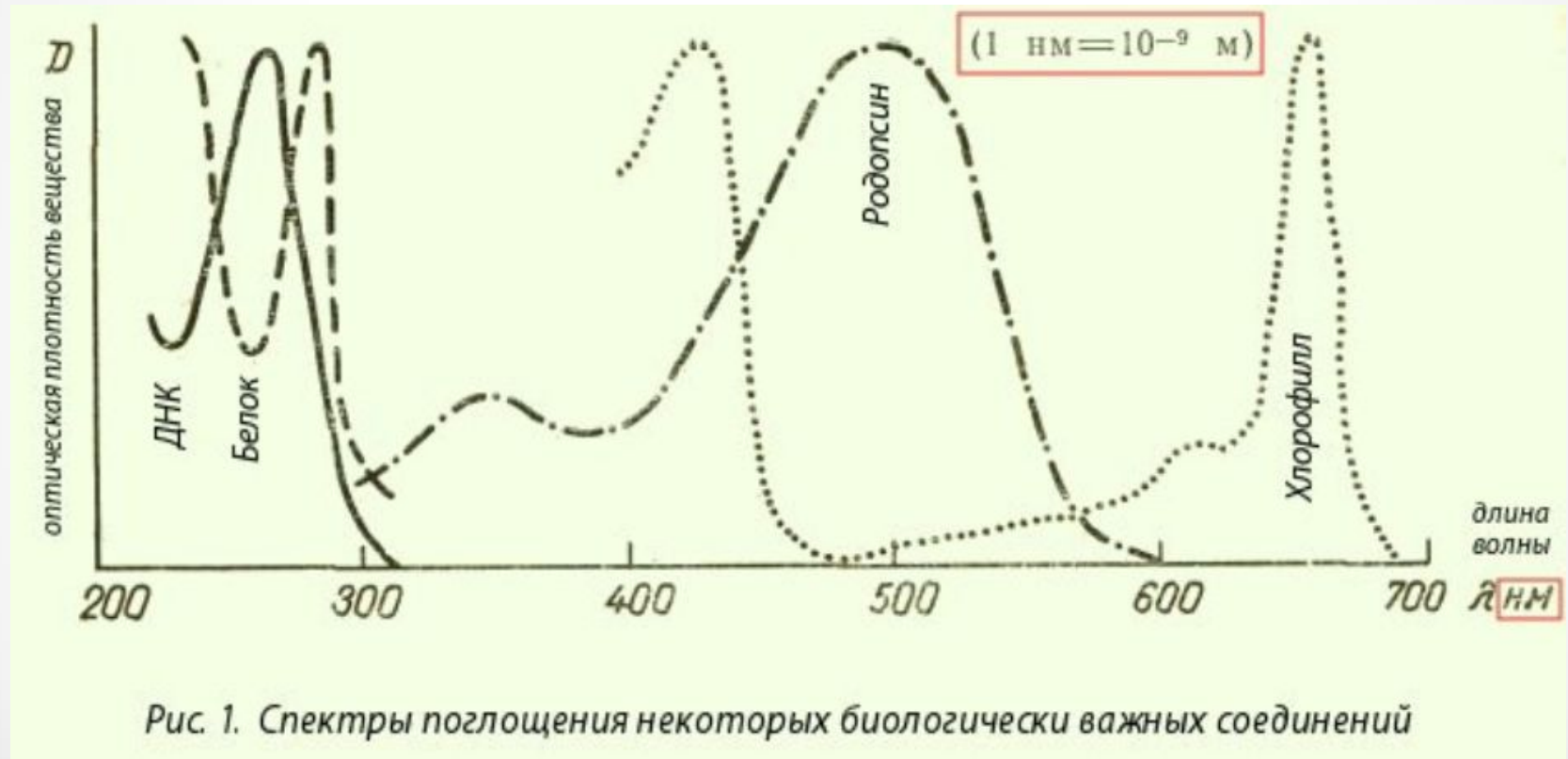
Рис. 3. Исходные спектры (1) и спектры первой (2) и второй (3) производных для смеси хлорофиллов *a* и *b* (взятых в соотношении 1 : 3) в ацетоне (А) и кривые, полученные с помощью ЭВМ, для симметричного дублета (гауссовы полосы с полушириной 0,3 отн. ед., амплитудой 1 отн. ед. и расстоянием между максимумами 0,25 отн. ед.) (Б)

Спектр поглощения суспензии *Clorella*

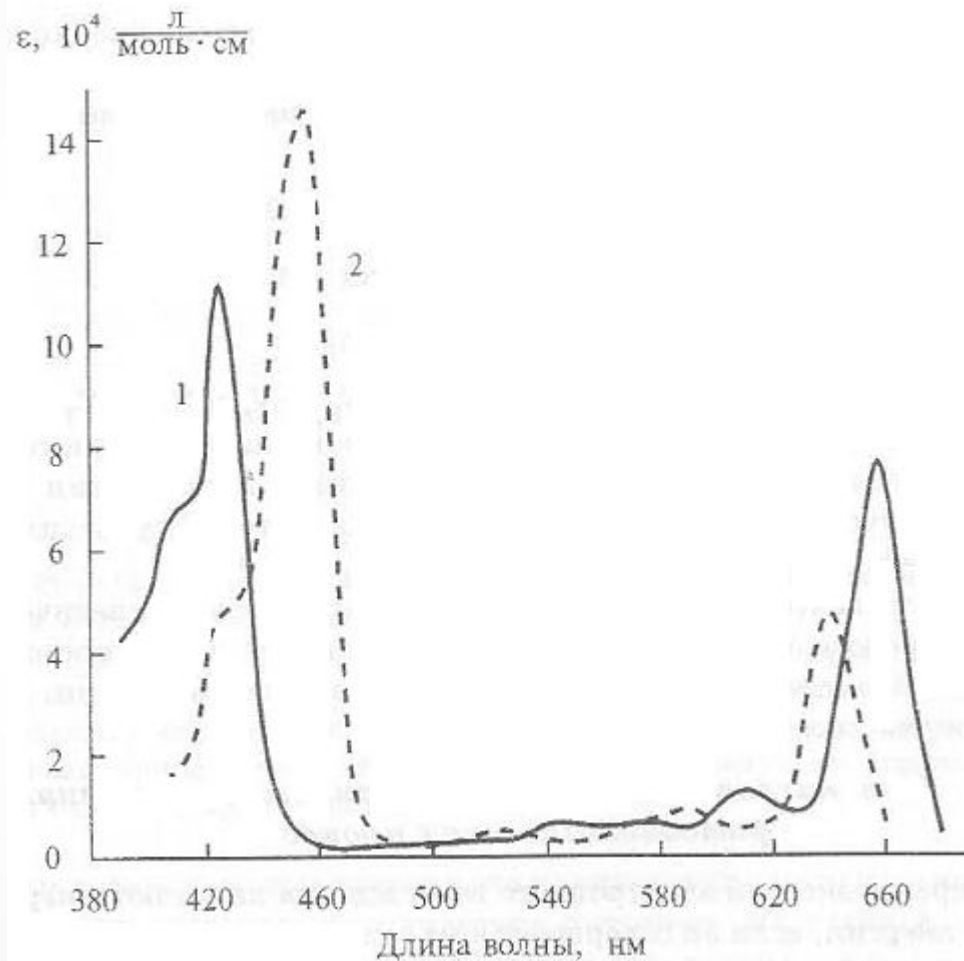


Жирная линия –
экспериментальная кривая,
тонкие сплошные – кривые
рассчитанные для четырех
гипотетических компонентов,
прерывистая линия – сумма
четырех рассчитанных кривых

Спектры поглощения биологически важных соединений

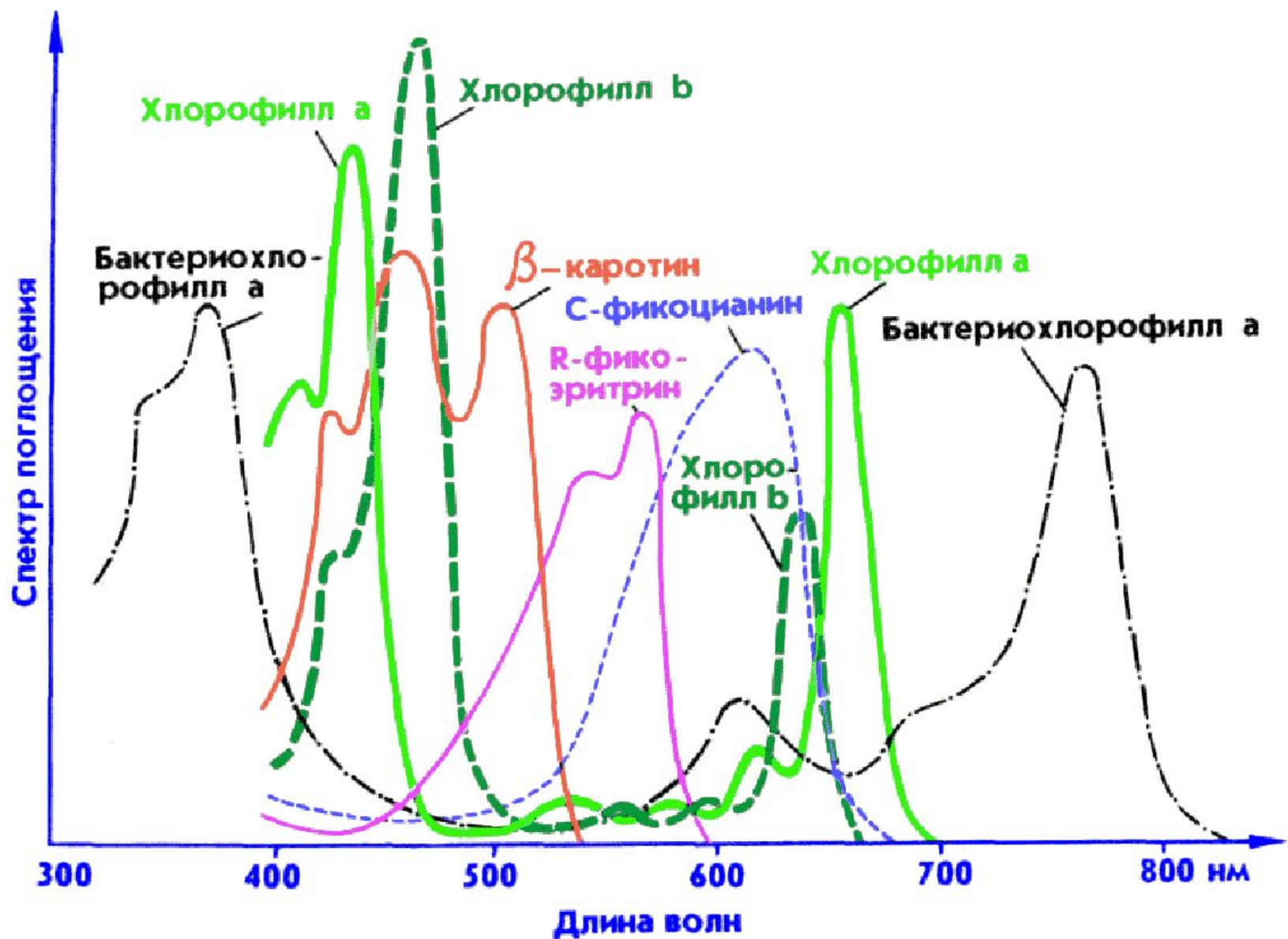


Спектры поглощения биологически важных соединений



- Спектры поглощения хлорофилла а (кривая 1) и хлорофилла b (кривая 2) в органических растворителях

Спектры поглощения биологически важных соединений



Вопросы к зачету

1. Изобразите принципиальную схему однолучевого спектрофотометра и опишите принцип его действия. В чем недостаток спектрометров данной конструкции по сравнению с двухлучевыми спектрофотометрами?
2. Изобразите принципиальную схему двухлучевого спектрофотометра и опишите принцип его действия. В чем преимущество спектрометров данной конструкции по сравнению с однолучевыми спектрофотометрами?
3. Условия поглощения электромагнитного излучения.
4. Приведите вывод закона Бугера-Ламберта-Бера на основе теории мишени.
5. Зависимость оптической плотности, пропускания и поглощения раствора от его концентрации.
6. Уровни энергии в молекуле. Схема энергетических уровней (диаграмма Яблонского)
7. Электронные переходы в молекулах
8. Спектр поглощения. Характеристики спектра поглощения.
9. Попробуйте нарисовать спектры поглощения каких-нибудь известных вам соединений.
10. В спектрах поглощения ряда биологически важных соединений положение полосы поглощения в спектре зависит от размеров системы сопряженных связей. Каким образом проявляется эта зависимость и как ее можно объяснить?
11. Как влияет светорассеяние на измеряемые спектры поглощения? Как уменьшить и как учесть это влияние?
12. Влияние растворителя на спектры поглощения
13. Качественный спектрофотометрический анализ. Количественный спектрофотометрический анализ
14. Трудности при измерении спектров поглощения биологических объектов. Пути преодоления трудностей

Вопросы к зачету

1. Что является предметом спектроскопии? Чем обусловлено появление
2. спектра?
3. Что называется полосой и спектром поглощения?
4. Что представляет собой шкала электромагнитного излучения?
5. Какие спектры называются электронными?
6. Какие типы электронных переходов Вы знаете? Чем они обусловлены?
7. Назовите интервалы поглощения УФ спектра вакуумной, видимой, ближней и дальней областей в шкале электромагнитных излучений.
8. Какой сдвиг называется батохромным? Чем он отличается от гиперхромного эффекта? Какими причинами обусловлены эти оба эффекта?
9. Какой тип электронных переходов имеет наибольшую интенсивность?
10. Объясните причину появления окраски у органических соединений.
11. Для каких соединений УФ спектр не является информативным? Укажите причину.
12. Что представляет собой УФ спектр поглощения?
13. От чего зависит интенсивность полосы поглощения? Почему полосы поглощения в УФ спектре широкие?