

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра радиофизики и электроники

В.Н. СТЕПАНОВ, М.С. СИЗОВА

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ РАСТВОРОВ ОКРАШЕННЫХ БИОМОЛЕКУЛ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом
государственного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2009

УДК 543.3:535(07)
ББК 28.071.я7
С79

Рецензенты:

доктор физико-математических наук, профессор М.Г. Кучеренко
кандидат физико-математических наук, доцент Т.М. Чмерева

С79 **Степанов В.Н.**
Исследование электронных спектров поглощения растворов
окрашенных биомолекул: методические указания к лабора-
торной работе / В.Н. Степанов, М.С. Сизова. - Оренбург: ИПК
ГОУ ОГУ, 2009. - 26 с.

В состав методических указаний включены следующие главы:
«Теоретическая часть. Методические указания по эксплуатации спектро-
фотометра серии GENESYS 10. Практическая часть. Контрольные вопро-
сы. Список использованных источников». Методические указания могут
быть рекомендованы студентам физического факультета специальностям
«радиофизика и электроника» и «медицинская физика».

ББК 28.0710.я7

©Степанов В.Н.
© ГОУ ОГУ, 2009

Содержание

1	Теоретическая часть	4
1.1	Введение	4
1.2	Элементарные процессы взаимодействия	4
1.3	Энергетические состояния молекул	6
1.4	Законы фотометрии. Фотометрические величины	12
1.5	Формирование контура электронных молекулярных полос поглощения. Методы обработки электронных спектров	14
1.6	Методика и техника абсорбционной молекулярной спектроскопии Принципиальная схема спектрометра и его основные узлы	15
1.7	Однолучевые спектрофотометры	16
1.8	Двухлучевые спектрофотометры	17
1.9	Погрешности при измерении спектров поглощения и пропускания	18
2	Методические указания по эксплуатации спектрофотометра серии GENESYS 10	20
2.1	Установка прибора	21
2.2	Основные указания при работе с прибором	21
2.3	Специальные клавиши управления	22
2.4	Введение названия текста	22
2.5	Порядок действий при снятии спектра	23
3	Практическая часть	24
3.1	Определение основных характеристик электронных полос поглощения	24
3.2	Порядок выполнения работы	24
3.3	Определение концентрации вещества в растворе	25
4	Контрольные работы	26
	Список использованных источников	26

Исследование электронных спектров поглощения растворов окрашенных биомолекул

Цель работы:

- 1 Освоение методики экспериментального определения основных характеристик электронных полос поглощения.
- 2 Исследование зависимости интенсивности спектров поглощения от концентрации вещества в растворе (закон Бугера – Ламберта – Бера)

1 Теоретическая часть

1.1 Введение

Задачей молекулярной спектроскопии является получение сведений о строении и свойствах молекул и вещества в целом на основе закономерностей его взаимодействия с электромагнитным излучением. Электромагнитное излучение обладает свойствами, как волнового движения, так и потока частиц (так называемый корпускулярно-волновой дуализм). Для строгого описания взаимодействия излучения с веществом почти всегда привлекается концепция квантов света (фотонов), тогда как для ориентировочной оценки поведения большого числа фотонов полезны волновые представления.

Электромагнитная волна представляется в виде осциллирующих электрического \vec{E} и магнитного \vec{B} полей, расположенных в плоскостях, перпендикулярных друг другу и направлению распространения излучения. Изменяющиеся во времени напряженность электрического поля и индукция магнитного поля в данной точке описываются гармонической функцией с периодом T .

Современная молекулярная спектроскопия базируется на квантовой теории, согласно которой любая молекула может существовать в стационарных состояниях, соответствующих определенным энергетическим уровням. Из одного состояния в другое молекула может переходить, поглощая или испуская квант света, энергия которого определяется разностью энергий исходного и конечного стационарных состояний. При этом спектры молекул, связанные с переходом валентных электронов, с колебаниями ядер и вращением молекулы как целого, располагаются в оптической области частот, подразделяющуюся на инфракрасную, видимую и ультрафиолетовую области.

1.2 Элементарные процессы взаимодействия излучения с веществом

Согласно квантовой теории атомы (молекулы) обладают дискретными уровнями энергии. Вследствие выполнения закона сохранения энергии для каждого элементарного процесса система может поглощать или излучать

только такие фотоны, энергия которых $h\nu$ приблизительно совпадает с разностью энергий её уровней. Для простоты будем полагать, что излучение взаимодействует с атомами, которые имеют всего два уровня энергии: E_1 и E_2 .

Существуют три процесса взаимодействия излучения с веществом.

Поглощение света. В этом случае поглощается фотон с энергией $h\nu_{12}$, а атом совершает квантовый переход (рисунок 1, *а*).

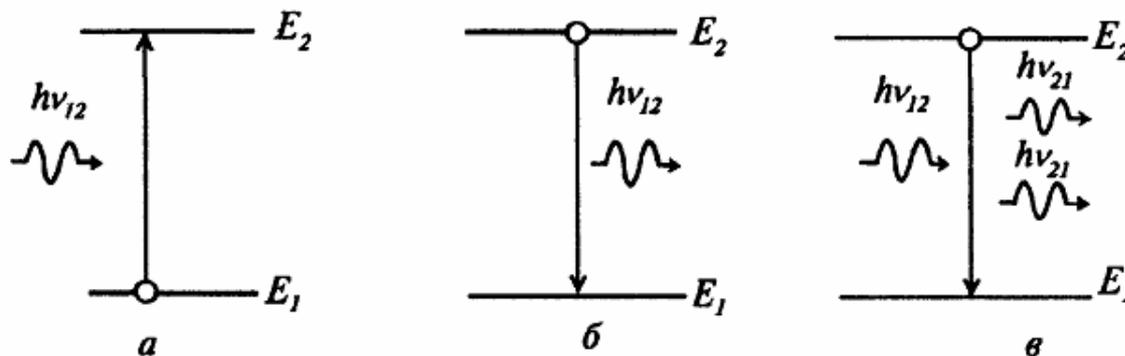


Рисунок 1- Схема переходов между энергетическими уровнями E_1 и E_2 :
а) поглощение; *б*) спонтанное излучение; *в*) вынужденное излучение.

Спонтанное излучение. Этот вид излучения происходит при самопроизвольном переходе атома с более высокого уровня E_2 на более низкий E_1 (рисунок 1, *б*). По квантовым представлениям самопроизвольный переход атома при отсутствии внешнего воздействия происходит мгновенно, причем как момент испускания фотона, так и направление его движения носят случайный характер.

Вынужденное (индуцированное) излучение. В этом случае испускание фотона вызывается уже существующим полем излучения, причем подобно спонтанному излучению атом переходит из состояния E_2 в состояние E_1 (рисунок 1, *в*), при этом его направление и фаза совпадают с полем излучения.

Таблица 1- Оптическая область спектра электромагнитного излучения

Спектральная область	Длина волны λ , нм	Энергия E , эВ	Процессы, протекающие в результате взаимодействия излучения с молекулой
УФ: Вакуумная Близкая	< 200 200 – 400	$10^2 - 10$	Электронные переходы
Видимая	400 – 700	$10 - 1$	Электронные переходы
ИК: Близкая Дальняя	$700 - 7,5 \cdot 10^4$ $7,5 \cdot 10^4 - 10^6$	$1 - 10^{-2}$	Колебания молекул Вращение молекул

1.3 Энергетические состояния молекул

Энергетические молекулярные состояния проще всего рассматривать на примере двухатомных молекул. Молекула представляет систему, состоящую из ядер и электронов, стабильность которой обеспечивается силами электрического взаимодействия между частицами. При образовании молекулы из свободных атомов распределение электронной плотности вокруг ядра изменяется так, что границы между электронными оболочками отдельных атомов исчезают, а их индивидуальность утрачивается. В этом случае можно говорить лишь об «эффективных» атомах в молекуле. Молекулярные орбитали обычно представляют в виде линейной комбинации атомных орбиталей. При этом могут быть реализованы два случая. Первый представляет собой симметричное перекрытие собственных функций состояний атомов. Так, если ψ_A и ψ_B — собственные волновые функции атомов A и B , то плотность вероятности нахождения электронов между атомами можно записать в виде

$$\left(\frac{1}{\sqrt{2}}\psi_A + \frac{1}{\sqrt{2}}\psi_B \right)^2 = \frac{1}{2}\psi_A^2 + \frac{1}{2}\psi_B^2 + \psi_A\psi_B \quad (1)$$

Произведение $\psi_A\psi_B$ называют дифференциальным перекрытием. Оно характеризует степень взаимного проникновения атомных орбиталей при образовании молекулярной орбитали. В случае симметричного перекрытия происходит повышение электронной плотности между атомами. При этом энергия молекулярной орбитали оказывается меньше энергии соответствующих уровней разделенных атомов. Такая орбиталь называется связывающей, а принимающие участие в ее формировании электроны — связывающими электронами.

На рисунке 2 изображены графики изменения энергии связи между атомными орбиталями в зависимости от расстояния между ними. Нижняя кривая характеризует связывающую молекулярную орбиталь. Наличие у нее минимума при расстоянии $R_{AB} = R_0$ обусловлено тем, что при дальнейшем сближении атомов начинают преобладать силы отталкивания ядер; R_0 соответствует минимуму потенциальной энергии. В реальных молекулярных системах низшая точка зависимости $E(R_{AB})$ не достигается. Разность E_d между энергетическим уровнем отдельных атомных орбиталей и нулевым уровнем молекулы (рисунок 2) называется ее энергией связи, или энергией диссоциации.

Во втором случае, при антисимметричном перекрытии волновых функций атомных орбиталей, произведение $\psi_A\psi_B$ становится отрицательным и плотность вероятности ψ_{AB}^2 между атомными ядрами приближается к нулю. Такая орбиталь называется разрыхляющей. Состояния электронов, соответствующие этим орбиталям, обозначают соответствующей буквой со звездочкой

(например: σ^* , π^*). При этом кривая зависимости энергии от расстояния между ядрами монотонно возрастает при их сближении (рисунок 2).

Если энергия молекулярной орбитали равна энергии соответствующей энергии орбитали изолированного атома (рисунок 2), то она носит название несвязывающей и обозначается буквой n . При этом валентные электроны, не принимавшие участия в образовании химических связей, являются неподеленными парами электронов и называются n - электронами.

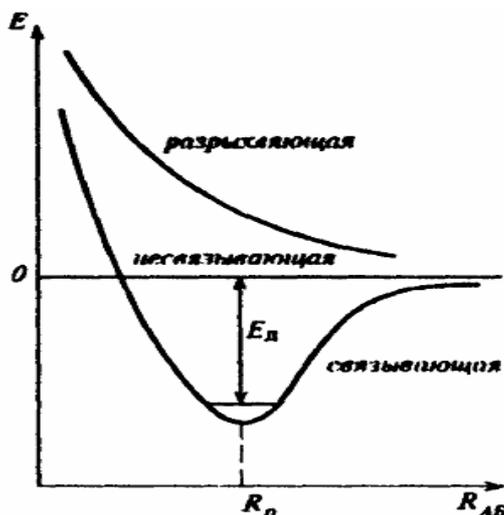


Рисунок 2- Зависимость энергии связи атомов от расстояния между ними.

Простую одиночную связь образуют σ - электроны (σ - связь), в ее формировании участвуют два спаренных электрона. Они формируют единое вытянутое электронное облако, симметричное относительно прямой, соединяющей центры атомов. При этом большая часть заряда сосредоточивается в промежутке между атомами. При возникновении между атомами второй связи (π - связи) в поле двух ядер располагаются еще два электрона (π - электроны). Их электронные облака симметричны относительно прямой, перпендикулярных направлению σ - связи (плоскости молекулы), и имеют в сечении вид восьмерки, расположенной по обе ее стороны (рисунок 3). Плотность образовавшегося облака π - электронов также сосредоточена по обеим сторонам от линии σ - связи. Она максимальна на расстоянии 1 \AA от плоскости молекулы и обращается в нуль на ее поверхности.

Энергия молекулы, находящейся в определенном электронном состоянии, приближенно может быть представлена суммой энергий отдельных электронов, а волновая функция молекулы в каждом состоянии — произведением одноэлектронных волновых функций. Принято считать, что при возбуждении меняется состояние (энергия и волновая функция) только одного электрона. В связи с этим электронные переходы обычно обозначают символами, соответствующими исходному и конечному состояниям электрона (например, $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$).

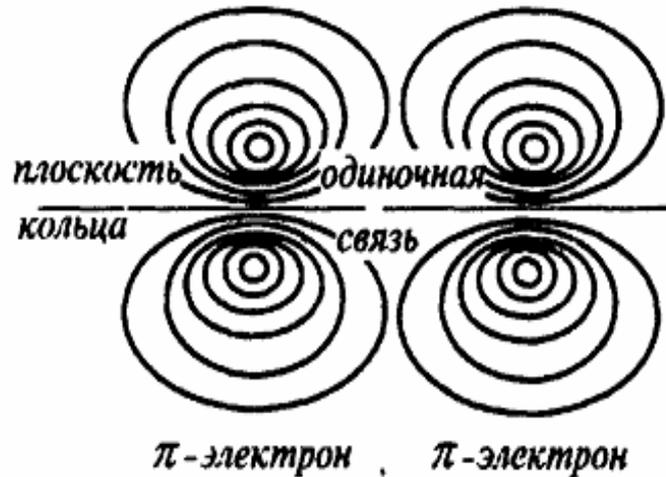


Рисунок 3 - Двойные облака двух отдельных π - электронов.

Так как для молекул с большим числом электронов невозможно получить точное аналитическое решение уравнения Шредингера, для определения их стационарных состояний используют приближенные методы решения. Так, полную молекулярную волновую функцию ψ можно представить с использованием адиабатического приближения Борна-Опенгеймера в виде

$$\psi = \psi_{\text{э}} \psi_{\text{кол}} \psi_{\text{вр}}, \quad (2)$$

где $\psi_{\text{э}}$ — электронная;

$\psi_{\text{кол}}$ — колебательная;

$\psi_{\text{вр}}$ — вращательная волновые функции.

При этом считается, что эти функции не зависят друг от друга, что и позволяет решить уравнение Шредингера отдельно для электронной, колебательной и вращательной волновой функции. В приближении (2) полная энергия молекулы E складывается из энергии электронного возбуждения $E_{\text{э}}$, колебательной энергии $E_{\text{кол}}$ и энергии вращения молекулы как целого $E_{\text{вр}}$:

$$E = E_{\text{э}} + E_{\text{кол}} + E_{\text{вр}}. \quad (3)$$

Слагаемые, входящие в (3), существенно различаются по порядку величины. Из теоретических и экспериментальных оценок известно, что

$$E_{\text{э}} > E_{\text{кол}} > E_{\text{вр}} \quad (4)$$

При этом в первом приближении, энергии $E_{\text{э}}, E_{\text{кол}}, E_{\text{вр}}$ можно считать независимыми друг от друга. Однако, при более строгом рассмотрении энерги-

ческих состояний молекул, необходимо учитывать возможность развития у них электронно-колебательного, электронно-вращательного и колебательно-вращательного взаимодействий.

На рисунке 4 представлена упрощенная схема энергетических уровней двухатомной молекулы. Здесь каждому электронному состоянию S_0 и S_1 соответствует система колебательных уровней, а каждому колебательному подуровню — совокупность близко расположенных вращательных состояний.

В случае большого числа молекул, распределившихся по всевозможным состояниям согласно статистическому закону Больцмана, наблюдается испускание (или поглощение) квантов различной энергии, которые образуют соответственно спектры испускания (эмиссионные спектры) и поглощения (абсорбционные спектры). Помимо этих спектров существуют также спектры рассеяния, которые наблюдаются в том случае, когда энергия кванта света, взаимодействующего с молекулой, меньше энергии электронного возбуждения, т.е. когда электронная оболочка молекулы только «возмущается», а не перестраивается полностью, как при переходе молекулы из невозбужденного в возбужденное состояние. Таким образом, молекулярные спектры можно подразделить по механизму их образования на спектры испускания, спектры поглощения и спектры рассеяния.

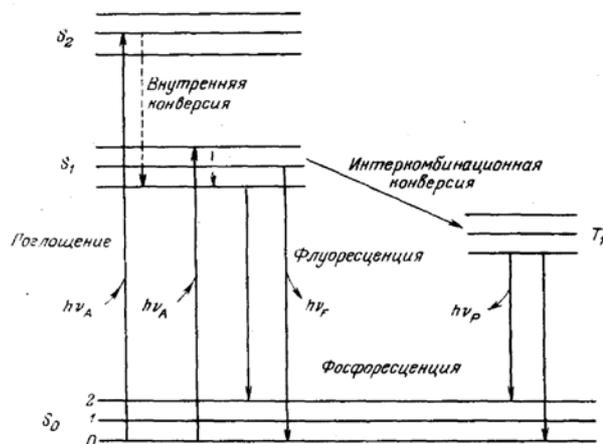


Рисунок 4 - Диаграмма Яблонского.

Положение полосы в спектре (длина волны, частота или волновое число) определяется разностью энергий конечного и исходного электронных уровней и в значительной степени зависит от типа электронного перехода. Электронные полосы, обусловленные $\sigma \rightarrow \sigma^*$ - переходами, находятся в далекой ультрафиолетовой области спектра; $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ - переходам соответствуют полосы в средней УФ-области; при сопряжении кратных связей полосы, обусловленные $n \rightarrow \pi^*$ - и $\pi \rightarrow \pi^*$ - переходами, смещаются в ближнюю ультрафиолетовую и видимую области спектра.

Таким образом, исследуя спектры поглощения в средней, ближней ультрафиолетовой и видимой области спектра, можно получить сведения о свойствах n - и π - электронов.

Каждое электронное состояние молекулы характеризуется некоторым интервалом значений энергии, зависящим главным образом от колебательного движения молекулы и межмолекулярных взаимодействий. Поэтому каждому электронному переходу в спектре соответствует широкий участок поглощения. Распределение интенсивности излучения в пределах этого участка характеризует форму полосы поглощения. Пары простых молекул имеют полосы с выраженной колебательной структурой, состоящие из ряда отдельных узких полос. При переходе к растворам и при усложнении строения молекул колебательная структура постепенно сглаживается, и полосы сложных молекул, являясь сплошными, имеют обычно вид гауссовой или дисперсионной кривой.

Наряду с положением в спектре, важной характеристикой полосы является ее интенсивность, определяющаяся вероятностью соответствующего перехода. В прикладной спектроскопии в качестве меры вероятности перехода используется максимальное значение коэффициента экстинкции в пределах полосы. Однако более строгой мерой является интегральная интенсивность A , выражаемая формулами

$$A = \int_{\nu_1}^{\nu_2} \varepsilon(\nu) d\nu \quad \text{или} \quad A' = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varepsilon(\lambda) d\lambda \quad (5)$$

где ε — коэффициент экстинкции (л/м·см = литр/моль·см);

ν_1 , ν_2 и λ_1 , λ_2 — координаты начала и конца полосы соответственно.

Если в спектре имеется несколько мало перекрывающихся полос, то обычно в качестве пределов интегрирования выбирают длины волн минимального поглощения между полосами. В случае сильного перекрывания применяют специальные методы разделения полос.

Вероятность перехода из одного электронного состояния в другое часто характеризуют силой осциллятора

$$f = \frac{3mc}{\pi e^2 N_A} 10^3 \ln 10 \int_{\nu_1}^{\nu_2} \varepsilon(\nu) \theta(n) d\nu = 1,3 \cdot 10^{-8} \int_{\nu_1}^{\nu_2} \varepsilon(\nu) \theta(n) d\nu \quad (6)$$

где e , — заряд электрона;

m - масса электрона;

c — скорость света;

N_A — число Авогадро;

ν — волновое число;

$\theta(n)$ — поправка на влияние растворителя; для разбавленных растворов

$$\theta(n) = \frac{9n}{(n^2 + 2)^2} \quad , \quad (7)$$

где n — показатель преломления растворителя.

Сила осциллятора представляет собой отношение вероятности перехода

в реальной молекуле к вероятности, соответствующей модели классического затухающего осциллятора данной частоты, и может быть выражена как отношение усредненной величины осциллирующего заряда в молекуле к заряду одного электрона.

Квантовомеханическая теория дает возможность связать силу осциллятора с величиной матричного элемента дипольного момента перехода M_{ij}

$$f = \frac{8\pi^2 cm \nu}{he^2} |M_{ij}|^2, \quad (8)$$

где ν — частота, Гц.

Для разрешенных переходов сила осциллятора обычно лежит в интервале от сотых долей до нескольких единиц, для запрещенных переходов ее значение $f < 10^{-3}$.

Полосы поглощения в близкой и средней ультрафиолетовой области спектра определяются переходами π - и n -электронов. Группы, содержащие такие электроны (кратные связи и атомы с неподеленными электронными парами), обуславливающие поглощение вещества, называются хромофорами. Как правило, соединения, содержащие один и тот же хромофор, имеют полосы с близкими значениями длины волны в максимуме и коэффициента экстинкции. Поэтому, сравнивая характеристики спектра поглощения исследуемого соединения с данными для известных хромофоров, можно получить информацию о присутствии соответствующих функциональных групп в исследуемой молекуле.

Если в молекуле два или несколько хромофоров разделены двумя и более простыми связями, ее спектр представляет собой наложение полос всех имеющихся хромофоров. Но если хромофоры разделены только одной простой связью, π - и n -электроны соседних групп вступают во взаимодействие и спектр сильно меняется. Можно сказать, что в этом случае возникает новая хромофорная группа. Так, при сопряжении кратных связей полоса смещается в длинноволновую сторону (в среднем на 30 нм при добавлении к сопряженной системе одной кратной связи), а ее интенсивность увеличивается.

Если в молекуле присутствуют группы - доноры и акцепторы электрона, то при поглощении света возможен перенос заряда от донора к акцептору. Это так называемые переходы с внутримолекулярным переносом заряда (ВПЗ).

Аналогичным образом акт поглощения может вызывать перенос заряда от одной молекулы к другой - межмолекулярный перенос заряда (МПЗ). Этот процесс наиболее вероятен при образовании слабых комплексов донорно-акцепторного типа. Изучение интенсивности такой полосы позволяет определить состав и оценить константу равновесия комплекса.

Электронные спектры поглощения сильно подвержены влиянию растворителей. При переходе молекулы из парообразного состояния в раствор ее энергетические уровни понижаются за счет межмолекулярных взаимодействий вандерваальсового характера. Поскольку при оптических переходах меня-

ется электронное строение молекулы, понижение основного и возбужденного уровней молекулы за счет взаимодействия с растворителем неодинаково, что приводит к смещению полос поглощения при переходе от паров к растворам. Этот факт дает возможность по смещению полос поглощения молекулы в разных растворителях определять изменения её электронной структуры, происходящие при возбуждении.

Характеристики спектров поглощения молекул с функциональными группами кислотного и основного характера обычно зависят от pH среды. На этом факте основаны спектрофотометрические методы определения констант диссоциации кислот и оснований.

1.4 Законы фотометрии. Фотометрические величины

Абсорбционная спектроскопия имеет дело со спектрами, характеризующими способность вещества поглощать энергию электромагнитного излучения. Интенсивность поглощения света определяется законом Бугера — Ламберта — Бера, который может быть установлен следующим образом. Пусть на слой толщины δX однородной окрашенной среды падает поток монохроматической световой энергии интенсивности I_0 с длиной волны λ . После прохождения слоя, имеющего толщину δX , поток уменьшается в результате поглощения на величину δI , представляющую собой энергию, поглощаемую ежесекундно в этом слое.

Допуская, что ослабление потока определяется только числом поглощающих частиц-молекул, находящихся на его пути, и не зависит от абсолютной величины потока, а также от взаимного влияния молекул, можно получить два основных закона поглощения, подтверждаемых опытом.

1. Каждый тонкий слой постоянной толщины внутри однородной окрашенной среды поглощает определенную долю входящего в него потока монохроматического излучения — закон Бугера—Ламберта.
2. Поглощение данным тонким слоем пропорционально числу окрашенных молекул, в нем содержащихся, и следовательно, их концентрации — закон Бера.

Объединённый закон Бугера — Ламберта — Бера имеет вид.

$$\frac{I_{\text{ПП}}}{I_0} = e^{-KCl} \quad (9)$$

где I_0 — падающий световой поток;

$I_{\text{ПП}}$ - прошедший через образец световой поток;

l — толщина образца.

Величина $T = \frac{I_{\text{пр}}}{I_0} = e^{-KCl}$ носит название пропускания слоя. Логарифм величины, обратной пропусканию, называют оптической плотностью слоя и обычно обозначают буквой D :

$$D = \ln \frac{1}{T} = \ln \left(\frac{I_0}{I_{\text{пр}}} \right) \quad (10)$$

На практике для большего удобства пользуются десятичными логарифмами и закон Бугера — Ламберта — Бера представляют в следующей форме:

$$D = \lg \left(\frac{I_0}{I_{\text{пр}}} \right) = \lg I_0 - \lg I_{\text{пр}} = \alpha Cl \quad , \quad (11)$$

где α — величина, зависящая от частоты монохроматического излучения, называемая десятичным показателем поглощения на единицу концентрации вещества. Если концентрация выражена в молях на литр, а толщина слоя — в сантиметрах, то α называют коэффициентом экстинкции и обозначают буквой ε . Между K и ε выполняется соотношение

$$K = 2300 \frac{\varepsilon}{N} \quad (12)$$

где $N = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ моль}^{-1}$ — число Авогадро.

Таблица 2 - Основные величины, используемые в абсорбционной спектроскопии

Характеристика поглощения	Символ	Формула
Пропускание	T	$T = \frac{I_{\text{пр}}}{I_0}$
Поглощение	A	$A = 1 - T$
Оптическая плотность	D	$D = \ln \left(\frac{1}{T} \right)$
Коэффициент поглощения	α	$\alpha = D/l$
Коэффициент экстинкции	ε	$\varepsilon = \alpha/C$
Молекулярный коэффициент поглощения	K_M	$K_M = \alpha/N$

1.5 Формирование контура электронных молекулярных полос поглощения. Методы обработки электронных спектров

Известно, что интенсивность спектральных полос зависит от вероятностей электронно-колебательных переходов молекул и от их числа на соответствующем исходном электронно-колебательном уровне. Благодаря наложению двух статистических распределений — вероятностей переходов (конфигурационное распределение) и больцмановского распределения молекул по колебательным уровням (тепловое распределение) — молекулярные полосы поглощения расширяются и утрачивают свою колебательную структуру. Образование таких широких полос можно объяснить силами межмолекулярного взаимодействия ядер атомов связанными с вероятностью W перераспределения энергии колебания внутри молекулы по ее степеням свободы. Величина W пропорциональна колебательной энергии $E_{кол}$ молекулы.

Исходя из значений W было предложено все молекулы делить на простые, полусложные и сложные. К простым отнесены те молекулы, у которых вероятность W относительно мала. В группу полусложных выделены молекулы, которые при малой энергии $E_{кол}$ имеют небольшое значение W , следовательно, являются простыми, а при больших значениях $E_{кол}$ вероятность W для них существенно возрастает, и они становятся сложными. Под сложными понимаются те молекулы, у которых при любом значении $E_{кол}$ значение W достаточно велико и существенно превышает обратную величину длительности их пребывания в индивидуальном колебательном состоянии. Так как ширина колебательного уровня пропорциональна значению W , то с ее ростом происходит уширение индивидуальных колебательных уровней, и следовательно, спектров атомов и различных типов молекул.

На рисунке 5 приведена схема образования электронно-колебательных уровней и спектров поглощения многоатомных молекул различной сложности. Из схемы видно, что при переходе от атомных систем (рисунок 5, а) к молекулам с увеличивающимися значениями W происходит размытие электронно-колебательных уровней и соответствующих полос поглощения. По мере возрастания W дискретные электронно-колебательные уровни и соответственно спектры простых молекул (рисунок 5, б) размываются и у полусложных молекул становятся диффузными (рисунок 5, в). Спектры же сложных молекул (рисунок 6, г) имеют вид широких полос, лишенных какой-либо структуры.

Таким образом, контур полос поглощения многоатомных молекул может либо иметь гладкую колоколообразную форму, либо обнаруживать следы колебательной структуры, либо иметь отчетливо проявляющуюся колебательную структуру.

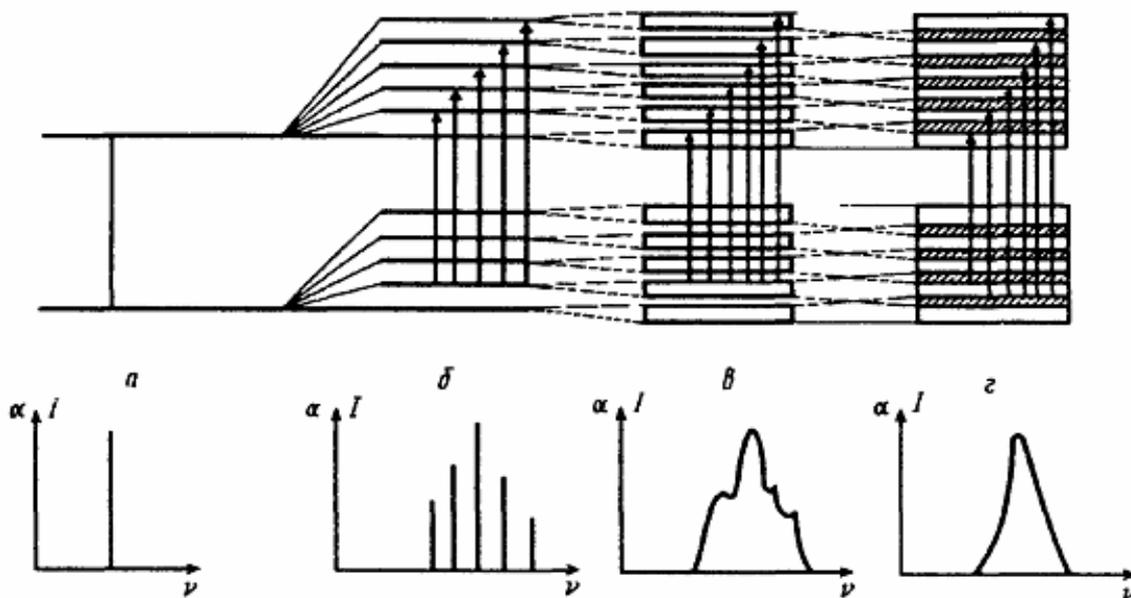


Рисунок 5 - Схема образования электронно-колебательных уровней и спектров поглощения атомов (а), простых (б), полусложных (в) и сложных (г) молекул.

1.6 Методика и техника абсорбционной молекулярной спектроскопии. Принципиальная схема спектрометра и его основные узлы

Фотометрическое измерение заключается в оценке различий в интенсивности двух потоков излучения: падающего на исследуемый объект (I_0) и прошедшего через него ($I_{пр}$) на определенной длине волны. Приборы, на которых производят такие измерения, классифицируют по следующим основным принципам:

- 1) по спектральным областям, в которых они работают;
- 2) по способу монохроматизации потока излучений;
- 3) по способу регистрации интенсивности излучения.

Здесь рассматриваются электронные переходы в сложных молекулах, которые происходят в оптической области электромагнитного спектра, измерения производятся в интервале длин волн от ~ 120 до ~ 1200 нм, т.е. от жесткого УФ-излучения до теплового излучения ближней ИК-области. Возможность использования какого-либо прибора для измерений в той или иной области спектра определяется, прежде всего, оптическими свойствами материала, из которого выполнены элементы разрешающей и фокусирующей систем прибора. Для УФ-области спектра в качестве источников излучения используются водородные или более мощные дейтериевые лампы, дающие сплошной спектр излучения в области 180—400 нм. Обычным источником видимого излучения от 360 нм до ближней ИК-области является лампа накаливания с вольфрамовой нитью. Ее рабочая температура - 2900 К, при этом максимум

интенсивности излучения приходится на длину волны ~ 1000 нм. В настоящее время все чаще используются галогенные лампы.

В спектрофотометрах применяются как призмные, так и дифракционные монохроматоры. Для уменьшения рассеянного излучения используются двойные монохроматоры либо дополнительные светофильтры.

В настоящее время спектрофотометрия позволяет получать надежные спектры веществ, находящихся в любом агрегатном состоянии — газообразном, жидком, твердом.

При работе с растворами необходимо выполнение двух требований:

- 1) растворители не должны взаимодействовать ни с растворенным веществом, ни с материалами кювет;
- 2) растворители должны быть прозрачны в области поглощения исследуемых веществ.

1.7 Однолучевые спектрофотометры

Однолучевым спектрофотометром называется прибор, в котором процесс получения спектра поглощения или пропускания происходит в два этапа: сначала измеряется спектр источника излучения, а затем — спектр излучения, прошедшего через образец. Блок-схема однолучевого прибора представлена на рисунке 6.

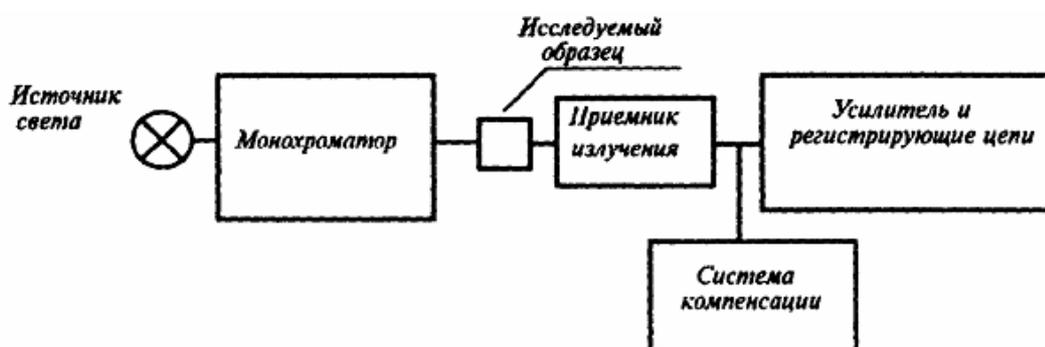


Рисунок 6 - Блок-схема однолучевого спектрофотометра.

Прибор работает по методу электрической компенсации — электрический сигнал с приемника излучения, пропорциональный интенсивности прошедшего через образец света, компенсируется равным и противоположно направленным электрическим сигналом от дополнительного источника ЭДС. Образец и кювета сравнения попеременно вводятся в световой пучок на каждой длине волны λ . При этом процесс измерения пропускания образца заключается в трех операциях. Первоначально проводится компенсация темнового тока фотоприемника (при этом фотоэлемент закрыт шторкой). Затем открывают шторку, в результате чего на выходе усилителя появляется напряжение, которое компенсируется с помощью источника ЭДС. После этого в прибор по-

мещается эталонный образец (пропускание которого принимается за 100 %). Изменяя ширину щели, регулируют световой поток таким образом, чтобы стрелка регистрирующего вольтметра стояла на условном нуле. На третьем этапе эталонный образец заменяют исследуемым и с помощью отсчетного потенциометра источника ЭДС уменьшают напряжение на выходе усилителя до тех пор, пока оно не будет снова компенсировать напряжение, уменьшенное за счет поглощения образца (показание милливольтметра должно соответствовать условному нулю). Шкала отсчетного потенциометра проградуирована в процентах пропускания $\left(T = \frac{I_{\text{пр}}}{I_0} \cdot 100 \%\right)$. Такие операции проводятся для каждой длины волны.

1.8 Двухлучевые спектрофотометры

Основные недостатки однолучевых спектрофотометров устранены в более совершенных двухлучевых схемах, которые предусматривают два равноценных пути прохождения излучения от одного и того же источника света. Один проходит через исследуемый образец, другой — через кювету, содержащую вещество сравнения. Оба потока измеряют по отдельности или с помощью двух приемников излучения, или на одном приемнике с модулятором. Чаще всего используется второй способ регистрации излучения. На рисунке 7 представлена блок-схема такого прибора.

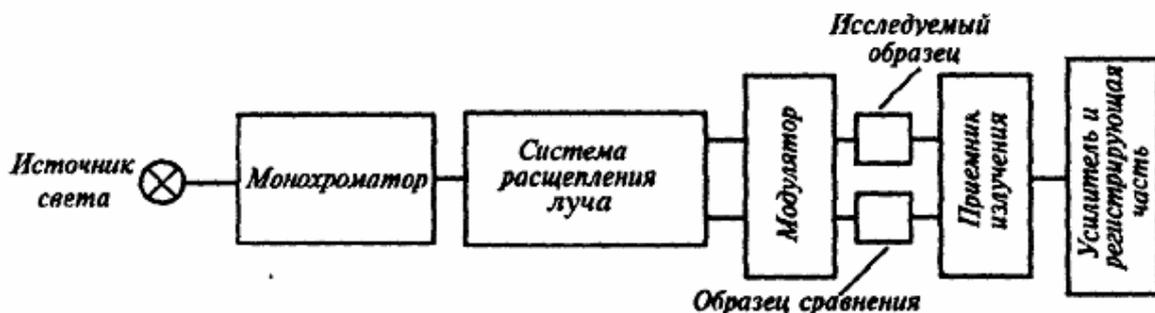


Рисунок 7 - Блок-схема двухлучевого спектрофотометра.

После монохроматора с помощью системы расщепления луч свет делится пополам, а затем через модулятор попадает на образец и эталон. На фотоприемник поочередно направляются лучи, проходящие через образец и эталон. При этом чаще всего используется дифференциальный (разностный) метод регистрации поглощения или пропускания исследуемого образца относительно эталона. Изменяя длину волны света с помощью монохроматора, получают спектр поглощения исследуемого образца.

Системы разделения и прерывания лучей в двухлучевых спектрофотометрах должны обеспечивать минимальные потери интенсивности света и постоянство разницы в интенсивности разделенных лучей при сканировании по спектру. Широкое распространение получил метод разделения лучей с помо-

щью полупрозрачных или непрозрачных неподвижных зеркал (рисунок 8 *а,б*). Для обоих этих случаев интенсивности каждого луча равны половине общей интенсивности источника света. Модуляция пучков света осуществляется с помощью вращающихся дисковых или цилиндрических прерывателей. В последнее время стали применяться комбинированные системы, в которых модулятор света одновременно выполняет функции и делителя пучка. Такие устройства могут быть реализованы на вибрирующих или вращающихся зеркалах (рисунок 8, *в, г*). Комбинированные системы позволяют получать почти 100 - процентную интенсивность света в каждом из лучей.

1.9 Погрешности при измерении спектров поглощения и пропускания

Величины D и T , определяемые с помощью спектрофотометра измеряются с некоторыми погрешностями. Для их оценки используются два понятия: воспроизводимость и точность измерения спектрофотометра.

Под воспроизводимостью прибора подразумевается его способность многократно давать повторяющиеся результаты измерений. При этом спектрофотометр с хорошей воспроизводимостью обеспечивает малые отклонения результатов единичных измерений от среднего значения, т.е.

$$\Delta T = T_{\text{изм}} - T_{\text{ср}} \quad (13)$$

где $T_{\text{изм}}$ и $T_{\text{ср}}$ - единичное и среднее значение коэффициента пропускания образца.

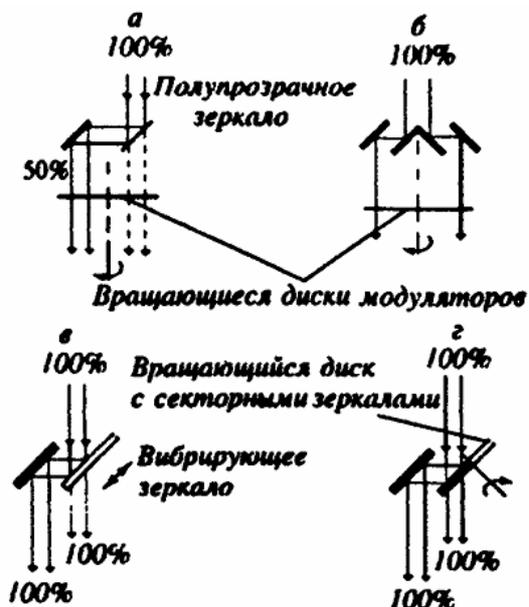


Рисунок 8 - Методы разделения лучей света в дифференциальной абсорбционной спектроскопии: *а, б* – с помощью неподвижных зеркал; *в, г* – на вибрирующих или вращающихся зеркалах.

Точность спектрофотометра есть его способность обеспечивать малое отличие среднего значения измеряемой величины от истинной, т. е. прибор должен характеризоваться малой величиной:

$$\delta T = T_{ист} - T_{ср}, \quad (14)$$

где $T_{ист}$ — истинное значение пропускания образца

Рассмотрим теперь причины, приводящие к погрешностям измерений. Спектрофотометрический анализ основан на законе Бугера—Ламберта—Бера. Этот закон нарушается в следующих случаях.

Во-первых, при невыполнении требования монохроматичности света. Во-вторых, при больших интенсивностях падающих на вещество световых пучков (в этом случае значительная часть молекул исследуемого вещества оказывается в возбужденном состоянии). В-третьих, при изменении числа определенных поглощающих частиц в растворе за счет фотофизических и фотохимических реакций наблюдаются кажущиеся отклонения от закона Бугера—Ламберта—Бера.

В случае отклонений от закона Бугера—Ламберта—Бера приходится строить градуировочные графики, связывающие наблюдаемые значения оптической плотности D , толщины слоя l и показателя поглощения α .

Запишем закон Бугера—Ламберта—Бера в аналитической форме:

$$D = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\lg T = \alpha l C, \quad (15)$$

где T — пропускание образца;

I_0, I — интенсивности падающего и прошедшего света;

C — концентрация.

Дифференцируя выражение (15) и переходя к конечным приращениям, можно получить формулу для относительной ошибки определения оптической плотности $\Delta D/D$, а также концентрации неизвестного раствора:

$$\frac{\Delta D}{D} = \frac{\Delta C}{C} = \frac{0,434 \Delta(I/I_0)}{I/I_0 \lg(I/I_0)} = \frac{0,434 \Delta T}{D \cdot 10^{-D}}. \quad (16)$$

Дифференцирование выражения (16) и приравнивание производной нулю дают точку пропускания 36.8% (оптическая плотность 0.434), соответствующую минимальной относительной ошибке.

В абсорбционной спектроскопии в основном используется дифференциальный метод регистрации поглощения или пропускания исследуемого образца относительно раствора сравнения с оптической плотностью $D_0 \neq 0$. В

этом случае относительная ошибка $\Delta C_x / C_x$ или $\Delta D_x / D_x$ исследуемого раствора с концентрацией C_x будет определяться следующим выражением:

$$\frac{\Delta C_x}{C_x} = \frac{\Delta D_x}{D_x} = \frac{-0,434 \cdot \Delta T_{\text{отн}}}{D_x \cdot 10^{-D_{\text{отн}}}}, \quad (17)$$

где $D_{\text{отн}}$ — разность абсолютных оптических плотностей образца и раствора сравнения, $\Delta T_{\text{отн}}$ — ошибка определения разности пропускания образца и раствора сравнения.

Оптимальная величина оптической плотности $D_{\text{отн}}$, которая соответствует минимальной ошибке измерения, равна

$$D_{\text{отн}} = 0,434 - D_0, \quad (18)$$

где D_0 — оптическая плотность раствора сравнения с концентрацией C_0 .

Следует иметь в виду, что выражение (17) не учитывает зависимость ошибки ΔT от самой величины T . С учетом этого фактора выражение (17) приобретает вид

$$\frac{\Delta C_x}{C_x} = \frac{\Delta D_x}{D_x} = \frac{0,434 \Delta T_{\text{п}} \sqrt{1 + (T / T_{\text{гр}})^2}}{D_x 10^{-D_{\text{отн}}}}, \quad (19)$$

где $T_{\text{гр}} = \Delta T_{\text{п}} / \Delta T_{\text{к}}$ - граничное показание шкалы прибора,

здесь $\Delta T_{\text{п}}$ - инструментальная ошибка,

$\Delta T_{\text{к}}$ - ошибка, вызванная не идентичностью кювет.

В этом случае величина $D_{\text{отн}}$, соответствующая минимальной ошибке измерения, определяется уравнением

$$D_{\text{отн}} = 0,434 \left[1 - \left(-\frac{T}{T_{\text{гр}}} \right)^2 \right] - D_0 \quad (20)$$

2 Методическое указание по эксплуатации спектрофотометра серии GENESYS 10

На данном приборе можно производить измерение следующих показателей: поглощение, пропускание, концентрация растворов вещества.

2.1 Установка прибора

- 1 Подсоедините кабель питания к задней панели прибора и подключите прибор к источнику тока.
- 2 Убедитесь, что внутри прибора, в отделении для проб, нет посторонних предметов и его дверца закрыта.
- 3 Установите держатель с бумагой для принтера.
- 4 Включите прибор.

Прибор начнет проводить самодиагностику в таком порядке:

- логотип GENESYS
 - стабилизация лампы
 - калибровка колеса фильтров
 - поиск нуля
 - поиск энергетического пика
 - калибровка решетки
- 5 В течении первых 30 минут после включения прибора происходит нагрев лампы до рабочей температуры (для точности измерений и корректной работы прибора, в это время измерения не проводятся).

2.2 Основные указания при работе с прибором

После подключения прибора выберите режим измерения, введите длину волны, поместите в прибор бланк (бумага), пробы и прочтите данные, которые показывает дисплей. Кроме того, вы можете выбрать нужный тест. Информация о тестах будет приведена позже.

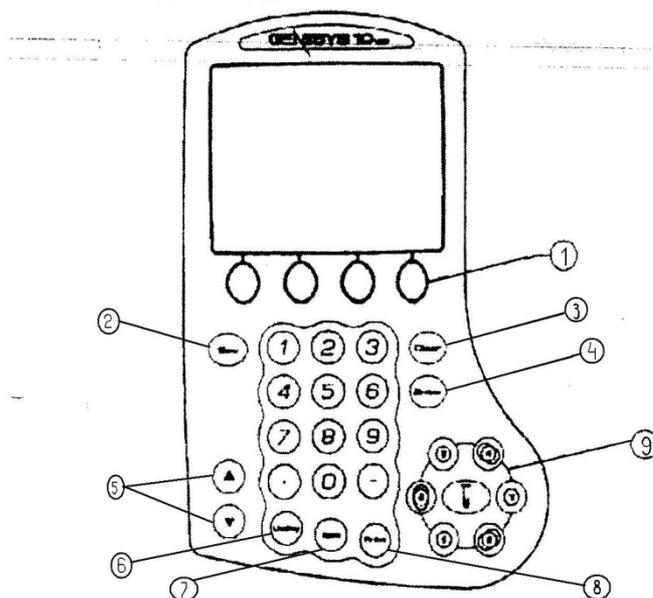


Рисунок 10 - Клавиатура спектрофотометра GENESYS 10

2.3 Специальные клавиши управления

Клавиатура спектрофотометра содержит числовые и специальные клавиши:

- *функциональные клавиши* (1) - С помощью этих четырех клавиш вы можете выбрать задачу, которая появится на экране. В зависимости от задачи (экрана) будут работать все 4 клавиши или только некоторые.
- *Esc* (2) – обычно при нажатии этой клавиши вы возвращаетесь к предыдущим показаниям экрана, а величины при этом не изменяются.
- *Clear* (3) – при нажатии этой клавиши вы стираете введенные данные, но не изменяете величины, которые уже были введены. Вы не возвращаетесь к предыдущим показаниям экрана.
- *Enter* (4) – обычно при нажатии этой клавиши программа вводит набранные вами величины. Кроме того, у этой клавиши есть и специальные функции, которые описаны далее.
- *Стрелки* (5) – эти клавиши осуществляют контроль за позицией курсора.
- *Utility* (6) – при нажатии этой клавиши на дисплее появится экран Utility. В данном окне вы можете установить время, язык, параметры для принтера, поменять контрастность экрана.
- *Test* (7) – при нажатии этой клавиши на дисплее появляются типы тестов.
- *Print* (8) – при нажатии этой клавиши прибор печатает ту информацию, которая выведена на экран.
- Клавиша расположения кювет (9)

2.4 Введение названия теста

При сохранении введенного вами теста, вам необходимо присвоить ему имя. Т.к. у прибора нет специальной клавиатуры, вы должны использовать символы (буквы и цифры), выбирая их из специального меню на экране. Для этого вы должны:

- 1 После введения величин для теста нажать SAVE TEST. На дисплее появиться Create Test Name. Вы можете использовать этот экран для:
 - стирания названия теста;
 - стирания символа в названии;
 - добавления символа;
 - добавления названия теста.
 - 2 С помощью стрелок выберите первый символ названия и нажмите Add Character.
 - 3 Таким же образом введите все символы.
 - 4 Нажмите Accept Name для введения названия в память. Это название будет появляться в нижней части экрана при выведении вашего теста на экран.
- В таблице приведены основные параметры и их краткое описание.

Таблица параметров

Параметр	Описание	Область
% Transmittance	Устанавливает величину пропускания	0.3 – 100.0
Absorbance	Устанавливает величину поглощения	-0.3 – 3.0
Auto Print	Включает и выключает автоматическую печать	ON - OF
Concentration	Устанавливает величину концентрации	-9999 до 9999
Measurement Mode	Тип фотометрических данных, обозначенных для измерения	
Printer	Выбирает режим вывода на принтер	
Scan Speed	Скорость (нм/мин) для сканирования	Slow (50) Medium (100) Fast (150) Turbo (250)
Start Wavelength	Начальная длина волны для сканирования	
Stop Wavelength	Конечная длина волны для сканирования	
Test Name	Название теста	1 – 16 символов
Unit Name	Название единиц измерения концентрации	1 – 16 символов

2.5 Порядок действий при снятии спектра

Для начала проведения теста нажмите клавишу **Test** на клавиатуре. Когда появится экран **Test Types**, подведите выделенную строку к **Survey Scan** и нажмите **Enter**. Далее **Test Name** и дайте имя тесту, как было описано выше. Затем снова **Enter**. В появившемся меню установите начальную (**Start Wavelength**) и конечную (**Stop Wavelength**) длины волн, в пункте **Measurement Mode** выберете **Absorbance** (поглощение) или **Transmittance** (пропускание) в зависимости от нужного теста и далее **Run Test**. Далее нужно провести нормировку на спектр растворителя. Для этого наполните кювету растворителем и установите в прибор, выберете команду **Collect Baseline**. После сигнала о завершении работы наполните кювету исследуемым раствором и выберете команду **Measure Sample**. По окончании сканирования выберете команду **Tabular** и затем **print**.

3 Практическая часть

3.1 Определение основных характеристик электронных полос поглощения

В настоящей работе предлагается определить следующие характеристики электронных полос поглощения:

- а) волновое число в максимуме полосы поглощения ν_{\max} ;
- б) коэффициент экстинкции в максимуме полосы поглощения ε_{\max} ;
- в) полуширина полосы поглощения $\Delta\nu_{1/2}$;
- г) интегральную интенсивность полосы поглощения $A = \int \varepsilon(\nu) d\nu$;
- д) силу осциллятора электронного перехода f и матричный элемент дипольного момента перехода M .

3.2 Порядок выполнения работы

- 1 Приготовить водный раствор эозина следующих концентраций в молях: $3.3 \cdot 10^{-5}$; 10^{-5} ; $3.3 \cdot 10^{-6}$; 10^{-6} ; $3.3 \cdot 10^{-7}$.
- 2 Измерить электронный спектр поглощения раствора на длине волны от 460 до 560 нм.
- 3 Представить полученные спектры поглощения в виде графика в программе Excel.
- 4 Представить измеренный спектр в координатах

$$\varepsilon_i = \frac{D}{Cl} \text{ и } \nu_i,$$

где D_i - оптическая плотность раствора на i -й длине волны;

C - концентрация раствора, моль/л;

l - толщина слоя раствора, см;

ν_i - волновое число, см⁻¹.

Построить график зависимости $\varepsilon_i(\nu_i)$.

- 5 Определить максимальное значение коэффициента экстинкции ε_{\max} .

- 6 Определить полуширину полосы поглощения $\Delta\nu_{1/2} = \nu_1 - \nu_2$,

где ν_1 и ν_2 - волновые числа, соответствующие точкам кривой поглощения с коэффициентом экстинкции $\varepsilon_{\max}/2$.

- 7 Определить интегральную интенсивность полосы поглощения. Для полос с гауссовым контуром, можно использовать соотношение

$$A = \int \varepsilon(\nu) d\nu = 1.07 \varepsilon_{\max} \Delta\nu_{1/2}$$

8 Рассчитать силу осциллятора электронного перехода $f=1.3 \cdot 10^{-8} \theta(n)A$, где

$$\theta(n) = \frac{9n}{(n^2 + 2)^2},$$

n – показатель преломления растворителя.

9 Рассчитать матричный элемент дипольного момента перехода

$$M = 0.83 \cdot 10^{-5} \cdot \sqrt{\frac{f}{\nu_{\max}}}$$

10 Рассчитать погрешности измерений и вычислений проделанных в ходе выполнения работы.

3.3 Определение концентрации вещества в растворе

Концентрация вещества в растворе может быть найдена из значения оптической плотности раствора по формуле

$$C = \frac{D_{\nu}}{\epsilon_{\nu} l},$$

если для данного раствора соблюдается закон Бугера - Ламберта -Бера. В случае однокомпонентных растворов рекомендуется использовать значения D_{ν} , и ϵ_{ν} , соответствующие частоте максимума наиболее интенсивной полосы в спектре поглощения растворенного вещества. Тем самым сводятся к минимуму ошибки, возникающие при измерении D за счет погрешности в определении ν . Кроме того, при расчете C по часто приходится использовать значения ϵ , заимствованные из литературных источников. Большинство из них также измерено в максимуме полосы поглощения.

Порядок работы

- 1 Измерить спектр поглощения раствора известной концентрации.
- 2 Исходя из закона Бугера – Ламберта – Бера определить коэффициент экстинкции ϵ_{\max} в максимуме наиболее широкой полосы поглощения.
- 3 Измерить оптическую плотность D_{\max} раствора того же вещества неизвестной концентрации при частоте максимума полосы поглощения.

- 4 Исходя из закона Бугера – Ламберта – Бера и найденных значений ε_{\max} и D_{\max} определить искомую концентрацию вещества.
- 5 Рассчитать погрешности измерений и вычислений проделанных в ходе выполнения работы

4 Контрольные вопросы

- 1 Расскажите о процессах взаимодействия излучения с веществом.
- 2 Что характеризует дифференциальное перекрытие атомных орбиталей.
- 3 Как выглядят электронные оболочки разрыхляющих и связывающих орбиталей σ и π – связи.
- 4 Нарисуйте диаграмму Яблонского и объясните различные переходы между уровнями.
- 5 Дайте определение величины «сила осциллятора».
- 6 Допущения, используемые при выводе закона Бугера-Ламберта-Бера.
- 7 Условия снятия спектров поглощения жидких растворов на спектрофотометрах.
- 8 Виды спектрофотометров, их достоинства и недостатки.
- 9 Причины не выполнения закона Бугера-Ламберта-Бера.
- 10 Порядок работы и техника безопасности при работе на спектрофотометре GENESYS 10.

Список использованных источников

- 1 Инструкция по эксплуатации спектрофотометра GESYS 10S. –М.: Стэнфорд ЛабМед, 2008. – 73 с.
- 2 Левшин, Л.В. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1: Молекулярная спектроскопия / Л.В., Левшин, А.М. Салецкий. -М.: Изд-во МГУ, 1994. – 320 с.
- 3 Лакович, Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии./ Дж. Лакович. - М.: Мир, 1986. – 483 с.
- 4 Архипкин, А.Г. Лекции по оптике / А.Г. Архипкин, Г.С. Патрин. - Красноярск, 2004. -164с.