

Р А Н

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт фундаментальных проблем биологии

Российской академии наук

(ИФПБ РАН)

Методическое руководство для школы молодых ученых

Международная конференция Photosynthesis research for sustainability Пущино 2016

ПРАКТИКУМ

"Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием"

Составил: к.б.н., с.н.с. Забелин Алексей Александрович

2016

ИК-Фурье-спектроскопия – метод молекулярной спектроскопии, который применяется для исследования колебательных свойств молекул. Поглощение инфракрасного излучения возбуждает колебательные переходы молекул.

Положения инфракрасных полос поглощения определяются массами колеблющихся атомов и типом связи (одинарная, двойная, тройная), а также внутри- и межмолекулярными взаимодействиями и сопряжением с другими колебаниями.

Инфракрасная спектроскопия предоставляет возможность исследовать колебания пигментов, хинонов и белковой матрицы реакционных центров фотосинтеза. В частности, фотоиндуцированная дифференциальная ИК-Фурье-спектроскопия обладает чрезвычайно высокой чувствительностью к молекулярным взаимодействиям, позволяя выявлять изменения отдельных химических связей в хромофорах и белковых субъединицах реакционных центров фотосинтеза в ответ на процессы переноса электрона и разделения зарядов.

В фотосинтезе ИК-Фурье-спектроскопия активно используется для исследования:

- вторичной структуры белков;
- структуры и превращений активных центров ферментов;
- взаимодействий кофакторов переноса электрона с белковым окружением в фотосинтетических реакционных центрах;
- молекулярного механизма функционирования кислород выделяющего комплекса фотосистемы 2;
- переноса протона, связанного с переносом электрона;
- свойств лигандов ионов металлов;
- свойств и роли молекул воды в структуре фотосинтетических комплексов.

1. Основные понятия

Совокупность всевозможных энергетических переходов в молекуле, сопровождаемых поглощением (излучением) электромагнитного излучения образует спектр.

Электромагнитное излучение может быть охарактеризовано либо волновыми, либо энергетическими параметрами. Волновой параметр выражается длиной волны или частотой колебания, которые связаны между собой уравнением:

$$\nu(\text{с}^{-1}) = \frac{c(\text{см}/\text{с})}{\lambda(\text{см})} \quad (1)$$

где c - скорость света, λ - длина волны.

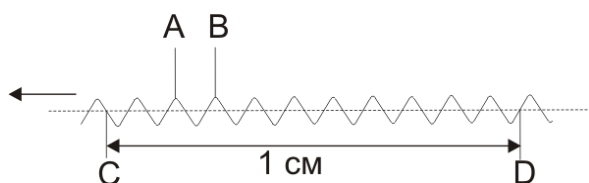


Рис. 1. Длина волны соответствует расстоянию АВ; волновое число – число волн, приходящееся на 1 см, CD; частота – число волн, проходящих через фиксированную точку С в единицу времени.

Часто употребляют волновое число (называемое также частотой), измеряемое в обратных сантиметрах (см^{-1}):

$$\omega(\text{см}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{см})} \quad (2)$$

Наглядно связь используемых в ИК-спектроскопии величин представлена на рис. 1.

Инфракрасная область спектра подразделяется на несколько диапазонов согласно применяемым оптическим материалам, которые должны быть прозрачны в данной области спектра: область

- 1) 12500-5000 см^{-1} - ближняя инфракрасная область;
- 2) область 5000-250 $\mu\text{м}$ - средняя (фундаментальная) инфракрасная область;
- 3) область до 50 см^{-1} - далекая инфракрасная область, область имеет значение при исследовании неорганических соединений.

При исследовании белков обычно используют поглощение инфракрасного излучения в области 5000-1000 см^{-1} .

2. ИК-Фурье-спектроскопия фотосинтетических реакционных центров

Инфракрасная спектроскопия предоставляет возможность исследовать колебания пигментов, хинонов и белковой матрицы реакционных центров (РЦ) фотосинтеза. Для примера на рис. 2 представлен ИК-Фурье-спектр поглощения типичной гидратированной пленки РЦ *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* R-26. В спектре доминируют интенсивные полосы поглощения белковой матрицы, а также полосы воды, компонентов буфера и детергента (для соотнесения смотри таблицу 1 ниже).

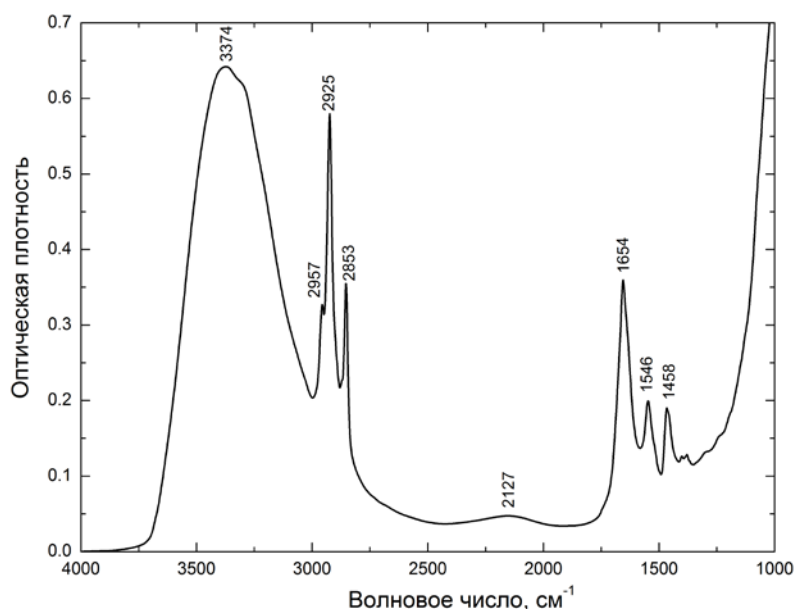


Рис. 2. ИК-спектр поглощения гидратированной пленки РЦ *Rb. sphaeroides* R-26 в 10 мМ Трис-НСI (рН 8.0), содержащем 0.015% *n*-додецил- β -D-мальтозида.

ИК-Фурье-спектр поглощения (рис. 2) несет информацию о вторичной структуре белка РЦ. В частности, положение полосы амид I при 1654 см^{-1} , принадлежащей валентным колебаниям связей $\text{C}=\text{O}$ пептидных групп (см. таблицу 1), указывает на то, что основным структурным компонентом белка РЦ являются α -спирали.

Таблица 1. Колебательные частоты компонентов реакционного центра в области 4000-1000 см⁻¹

Волновое число, см ⁻¹	Связи и колебательные моды
Вода	
3490 и 3280 2130 1645	Асимметричные и симметричные валентные колебания Н-О-Н «Ассоциированная полоса» воды, обусловленная межмолекулярными модами молекул воды Деформационные колебания Н-О-Н
Белок	
3300-3250 3080 2957 2920 2872 2851 1738 1700-1600 1575-1480 1395 1330-1230 1170	Амид А (валентные колебания N-H в резонансе с обертоном полосы амид II) Амид В (валентные колебания N-H) Асимметричные валентные колебания C-H в CH ₃ Асимметричные валентные колебания C-H в CH ₂ Симметричные валентные колебания C-H в CH ₃ Симметричные валентные колебания C-H в CH ₂ Валентные колебания C=O групп COOH Амид I (главным образом, валентные колебания связей C=O пептидных групп) Амид II (деформационные колебания N-H+ валентные колебания C-N) Валентные колебания C=O групп COO ⁻ Амид III (деформационные колебания N-H+ валентные колебания C-N) Асимметричные валентные колебания C-O эфирных групп
Бактериохлорофилл и бактериофеофитин	
1750-1720 1710-1670 1650-1620 ~1600, ~1560 1375, 1340	Валентные колебания C=O 13 ³ , 17 ⁴ эфирных групп (см. рис. 3 для нумерации атомов молекулы бактериохлорофилла <i>a</i>) Валентные колебания 13 ¹ -кето-C=O группы Валентные колебания 3 ¹ -ацетильной C=O группы Скелетные колебания C-C и C-N хлоринового макроцикла Деформационные колебания C-H в CH ₃
Хиноны	
1660-1650 1610-1600 1490-1470 1490-1460	C=O хинона C=C хинона C-O семихинона C-C семихинона

Появление техники «реакционно-индуцированной» дифференциальной ИК-спектроскопии на одном образце позволило решить проблему фонового поглощения. Дифференциальные спектры, полученные с применением этой техники, сильно структурированы и содержат информацию о всех молекулярных изменениях, связанных с индуцированной реакцией.

Техника фотоиндуцированной дифференциальной ИК-спектроскопии была развита в начале 1980-х годов и в настоящее время широко применяется при исследовании белков, осуществляющих фотореакции, например, фотосинтетических реакционных центров бактерий и растений. Фотоиндуцированная ИК-Фурье спектроскопия РЦ позволяет получать дифференциальные спектры, содержащие информацию о структурных изменениях в РЦ, сопровождающих процесс первичного разделения зарядов с

образованием, например, состояния $P^+Q_A^-$, где P^+ - это катион-радикал димера P, состоящий из молекул бактериохлорофилла P_A и P_B (рис. 3), а Q_A^- - анион-радикал первичного хинонного акцептора электрона.

На рис. 3 представлен фотоиндуцированный дифференциальный (свет-минус-темнота) ИК-Фурье спектр образования состояния $P^+Q_A^-$ в реакционных центрах *Rb. sphaeroides* R-26, полученный при стационарном освещении при комнатной температуре.

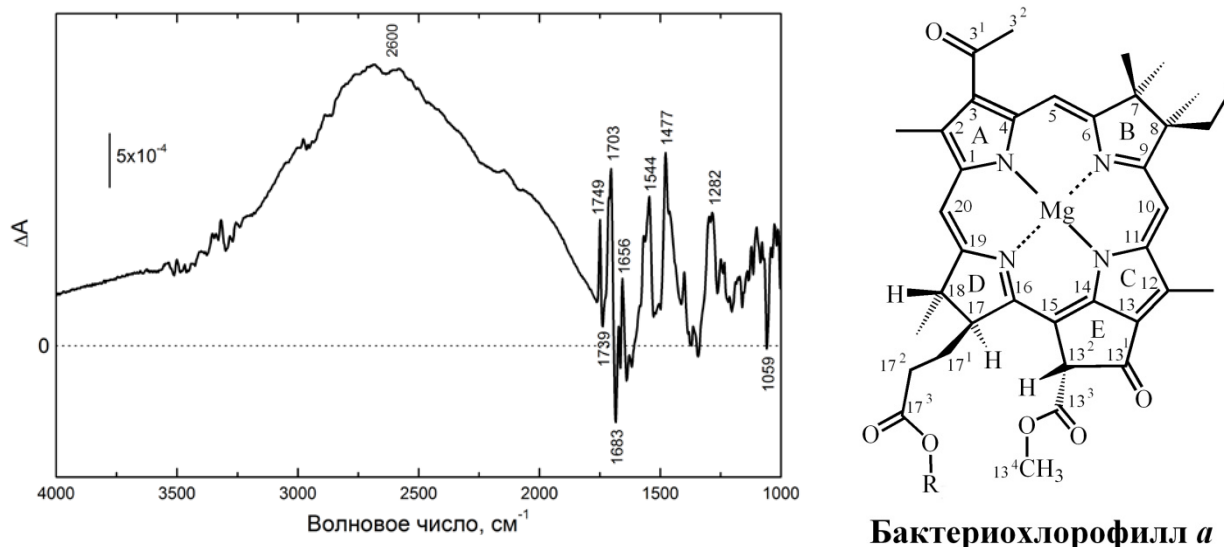


Рис. 3. Фотоиндуцированный (свет-минус-темнота) дифференциальный ИК-Фурье спектр $P^+Q_A^-/PQ_A$ РЦ *Rb. sphaeroides* R-26 при комнатной температуре. Структурная формула молекулы бактериохлорофилла a. Нумерация дана в соответствии с правилами IUPAC. R – остаток спирта фитола.

В этом спектре положительные полосы принадлежат состоянию $P^+Q_A^-$, в то время как отрицательные связаны с состоянием PQ_A .

Таблица 2. Соотнесение основных колебательных полос фотоиндуцированного (свет-минус-темнота) дифференциального ИК-Фурье спектр $P^+Q_A^-/PQ_A$ РЦ *Rb. sphaeroides* R-26

Волновое число, cm^{-1}		Соотнесение полос
PQ_A	$P^+Q_A^-$	
	2600(+)	Полоса электронного перехода, связанного с переносом «дырки» («электронной вакансии») с одной половины окисленного первичного донора P^+ на другую
1739(-)	1749(+)	Валентные колебания 13^3 -эфирных C=O групп молекул бактериохлорофилла P_A и P_B димера P
1683(-)	1703(+)	Валентные колебания 13^1 -кето C=O групп молекул бактериохлорофилла P_A и P_B димера P
	1656(+)	Сдвиг полосы амид I
	1544(+)	Фазово-фононные полосы, отражающие деформацию порфириновых макроциклов при перескоке дырки с одной половины катион-радикала димера P^+ на другую
	1477(+)	
	1282(+)	
	1477(+)	
	1059(-)	Содержит вклад валентных колебаний C-O семихинона Q_A^-
		Колебания C-N-связей

3. Принципы устройства и действия ИК-Фурье-спектрометров.

Термин "ИК-Фурье-спектроскопия" возник с появлением нового поколения приборов, в основе оптической схемы которых используются различного типа интерферометры. ИК-Фурье-спектроскопия представляет собой один из вариантов метода ИК-спектроскопии и по существу не является отдельным спектральным методом. Спектры веществ, полученные на ИК-Фурье-спектрометрах, не отличаются от спектров, полученных на диспергирующих ИК-спектрометрах.

Спектры с помощью Фурье-спектрометров получают в два этапа. Сначала регистрируется интерферограмма, т.е. выходной световой поток в зависимости от разности хода разделенной на когерентные пучки входной волны от источника. Затем путём обратного преобразования Фурье (по разности хода) вычисляется спектр. Вторая часть требует относительно большого объема вычислений, поэтому метод получил широкое распространение только с появлением современных компьютеров. Однако сложность получения спектров с помощью Фурье-спектрометров значительно перекрывается преимуществами над другими спектральными приборами:

- 1) с помощью Фурье-спектрометров можно регистрировать одновременно весь спектр;
- 2) благодаря тому, что в интерферометре входное отверстие больших размеров, чем щель спектральных приборов с диспергирующим элементом такого же разрешения, то Фурье-спектрометры по сравнению с ними имеют выигрыш в светосиле. Это позволяет:
 - а) уменьшить время регистрации спектров;
 - б) уменьшить отношение сигнал – шум;
 - в) повысить разрешение;
 - г) уменьшить габариты прибора;
- 3) Фурье-спектрометры выигрывают также в точности отсчета длины волны. В дифракционных приборах длину волны можно определить только косвенно, а в Фурье-спектрометрах она определяется непосредственно.

Рассмотрим основные принципы работы ИК-Фурье-спектрометров и технику ИК-спектроскопии. Оптическая схема ИК-Фурье-спектрометра представлена на рис. 4.

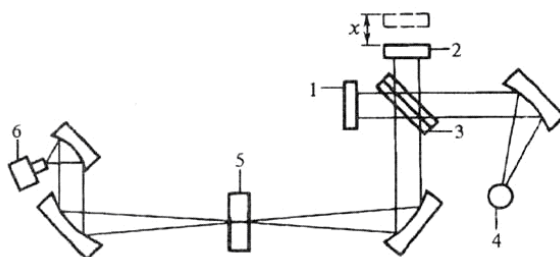


Рис. 4. Оптическая схема Фурье-спектрометра: 1 - неподвижное зеркало интерферометра; 2 - подвижное зеркало; 3 - светоделительная пластина (светоделитель); 4 - источник излучения; 5 - исследуемый образец; 6 - детектор излучения

Интерферометр содержит два взаимно перпендикулярных зеркала - неподвижное 1 и подвижное 2 и полупрозрачную светоделительную пластину 3, расположенную в месте пересечения падающих пучков излучения и пучков, отраженных от обоих зеркал. Пучок излучения от источника 4, попадая на пластину 3, разделяется на два пучка. Один из них направляется на неподвижное зеркало 1, второй - на подвижное зеркало 2; затем оба пучка, отразившись от зеркал, выходят через светоделитель из интерферометра в одном и том же направлении. Далее излучение фокусируется на образце 5 и поступает на детектор излучения 6. Два пучка отличаются друг от друга оптической разностью хода, величина которой меняется в зависимости от положения подвижного зеркала. В результате интерференции пучков интенсивность результирующего потока $I(x)$ периодически меняется (модулируется). Частота модуляции зависит от частоты падающего излучения ν и смещения подвижного зеркала x . В результирующей интерферограмме выделяется так

называемая точка нулевой разности хода, или точка белого света. В этой точке для всех частот наблюдается максимум; от нее ведут отсчет смещения подвижного зеркала.

ИК-Фурье-спектрометр Bruker IFS 66v/S состоит из следующих основных частей:

1. Источник излучения (глобар).
2. Кюветное отделение.
3. Оптическая система, включающая систему зеркал и делителей.
4. Интерферометр Майкельсона.
5. Детектор ИК – излучения. Имеется два детектора: DTGS/КВг (в области 9000 см^{-1} – 350 см^{-1}) и МСТ/ВаF₂ (13000 см^{-1} – 830 см^{-1}), охлаждаемый жидким азотом.
6. Прибор подключен к персональному компьютеру и управляется программой OPUS, которая работает в среде Windows.

ХОД РАБОТЫ

«Идентификация колебательных полос в ИК-Фурье-спектре поглощения и фотоиндуцированном дифференциальном ИК-Фурье-спектре РЦ *Rb. sphaeroides* R-26»

Цель работы. Получение ИК-Фурье-спектра поглощения и фотоиндуцированного дифференциального $P^+Q_A^-/PQ_A$ ИК-Фурье-спектрах РЦ *Rb. sphaeroides* R-26 и соотнесение основных колебательных полос с функциональными группами молекул на основе литературных данных. Ознакомление с техникой ИК-спектроскопии. Освоение методики работы на ИК-Фурье-спектрометре.

Порядок выполнения работы

1. Подготовьте образцы к работе: несколько микролитров концентрированной суспензии РЦ *Rb. sphaeroides* R-26 нанесите на подложку из CaF₂ с тонким слоем вакуумной смазки по ее краю, частично подсушите РЦ в токе газообразного аргона и накройте второй подложкой из CaF₂. При сжатии подложек относительно друг друга в держателе криостата получается вакуум-плотная оптическая ячейка, содержащая частично дегидратированный слой РЦ.

2. Включите спектрометр, загрузите компьютер и активируйте программу *OPUS*. В основном меню выберите опцию *Measurement* и нажмите вкладку *Advanced*. На экране появится окно, в котором задаются параметры ИК спектра. Вместе с преподавателем установите область спектра, формат спектра, разрешение спектра и количество сканирований.

3. Измерение ИК-Фурье-спектра поглощения РЦ *Rb. sphaeroides* R-26 проводят следующим образом. Сначала снимают спектр сравнения *Background* (пустое кюветное отделение). Затем держатель с образцом помещают в кюветное отделение и измеряют *Sample* с образцом.

4. Измерение фотоиндуцированного (свет-минус-темнота) дифференциального ИК-Фурье-спектра $P^+Q_A^-/PQ_A$ РЦ *Rb. sphaeroides* R-26 проводят следующим образом. Сначала снимают спектр сравнения *Background* с образцом в темноте, затем включают актиничный свет и измеряют *Sample* под освещением. По окончании сканирования свет выключают. Измерения по пункту 4 повторяют до достижения необходимого соотношения сигнала к шуму.

5. Пользуясь таблицами 1 и 2, найдите характеристичные частоты для функциональных групп в полученных ИК-Фурье-спектрах.

Рекомендуемая литература

- Handbook of Vibrational Spectroscopy*, (Chalmers J.M. and Griffiths P.R., eds.), Vol. 1-6, 2001, Wiley.
- Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика: учебное пособие в 2 тт., Т. 2/ И. Сердюк, Н. Заккаи, Дж. Заккаи. – КДУ, 2010. – 736 с.
- Siebert F., and Hildebrandt P. (2008) *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Lutz M. and Mäntele W. (1991) Vibrational spectroscopy of chlorophylls, in *Chlorophylls* (Scheer H., ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 855-902.
- Mäntele W. (1993) Infrared vibrational spectroscopy of the photosynthetic reaction centers in *The photosynthetic bacterial reaction center*, (Diesenhofer J., and Norris J., eds.), Vol. II, Academic press, San Diego, pp. 239-283.
- Mäntele W. (1995) Infrared vibrational spectroscopy of reaction centers in *Anoxygenic photosynthetic bacteria*, (Blankenship R. E., Madigan M. T., and Bauer C. E., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 627-647.
- Mäntele W. (1996) Infrared and Fourier transform-infrared spectroscopy in *Biophysical techniques in photosynthesis*, (Amesz J., and Hoff A. J., eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 137-160.
- Berthomieu C. and Hienerwadel R. (2009) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynth. Res.*, 101, 157-170.