

# UV-VIS absorpční metody

*Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)*

Jan Novotný  
novotnyjan@mail.muni.cz

21. října 2015

# Spektroskopické metody - kontext

*Doplňte údaje v přiložené tabulce:*

Spektrální oblast	Pozorovaný děj	Příklad metody
X-rays		
UV-VIS		
IR		
MW		
RW		

# Spektroskopické metody - kontext

Doplňte údaje v přiložené tabulce:

Spektrální oblast	Pozorovaný děj	Příklad metody
X-rays	přechody vnitřních $e^-$	absorpce, difrakce, SAXS
UV-VIS	valenční $e^-$	absorpce, CD, luminiscence
IR	molekulární vibrace	IČ spektroskopie, Ramanův rozptyl
MW	přechody $e^-$ spinu, molekulární rotace	EPR, rotační spektroskopie
RW	přechody jaderného spinu	NMR

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Franck-Condonův faktor odpovídá překryvovému integrálu vibrační funkce v základním a excitovaném stavu.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Franck-Condonův faktor odpovídá překryvovému integrálu vibrační funkce v základním a excitovaném stavu.
- 4 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou zakázané

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Franck-Condonův faktor odpovídá překryvovému integrálu vibrační funkce v základním a excitovaném stavu.
- 4 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou zakázané
- 5 Počet normálních vibračních módů N-methylacetamidu je 12.



# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Franck-Condonův faktor odpovídá překryvovému integrálu vibrační funkce v základním a excitovaném stavu.
- 4 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou zakázané
- 5 Počet normálních vibračních módů N-methylacetamidu je 12.
- 6 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

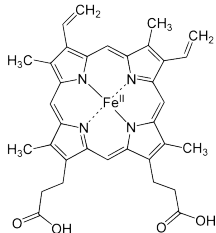
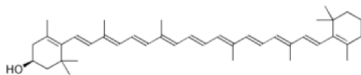
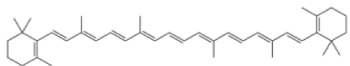
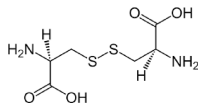
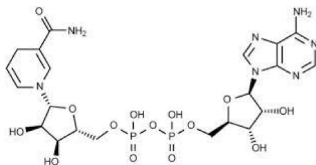
- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Franck-Condonův faktor odpovídá překryvovému integrálu vibrační funkce v základním a excitovaném stavu.
- 4 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou zakázané
- 5 Počet normálních vibračních módů N-methylacetamidu je 12.
- 6 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 7 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Stabilizace excitovaného stavu vede k posunu absorpčního maxima k vyšší frekvenci.
- 2 Extinkční koeficient je úměrný přechodovému integrálu, ploše chromoforu a koncentraci detekované molekuly.
- 3 Franck-Condonův faktor odpovídá překryvovému integrálu vibrační funkce v základním a excitovaném stavu.
- 4 Elektronové přechody zachovávající paritu jsou zakázané
- 5 Počet normálních vibračních módů N-methylacetamidu je 12.
- 6 Hypochromní posun znamená přechod k nižší hodnotě vlnové délky.
- 7 Ve spektru chlorofylu nalezneme dvě maxima: 450nm a 700nm.
- 8 Měření elektronových přechodů v plynné fázi umožňuje sledovat rozlišení absorpčních pásů na jednotlivé vibrační přechody.

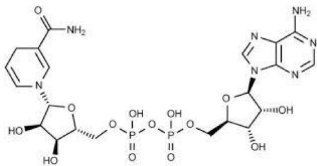
# Úloha 1

Ke strukturám uvedených látek přiřadte název, biochemickou úlohu a typ elektronového přechodu:

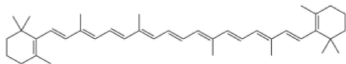


# Úloha 1

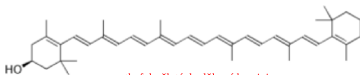
Ke strukturám uvedených látek přiřaďte název, biochemickou úlohu a typ elektronového přechodu:



NADH - redoxní kofaktor, absorpce při 340 nm  
 $\pi - \pi^*$

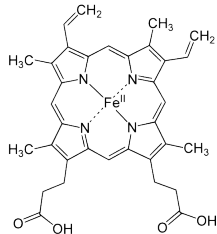
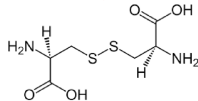


karoten - oranžové doplňkové barvivo  
 $\pi - \pi^*$



xanthofyl - žluté doplňkové barvivo  
 $\pi - \pi^*$

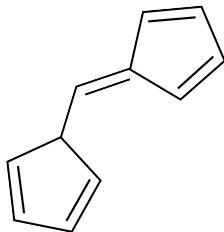
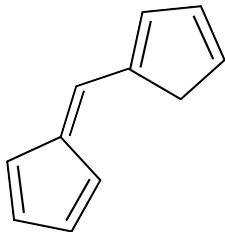
cystin - stabilizace terciárních struktur proteinů  
 $n - \sigma^*$



hem - hemoglobin, myoglobin  
 $d-d^*$

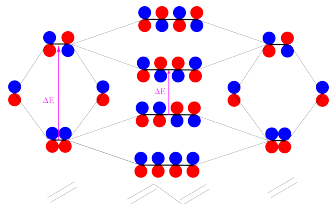
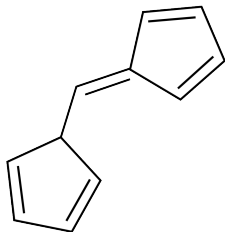
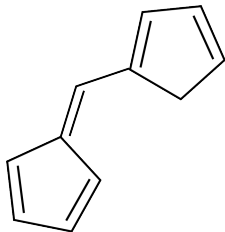
## Úloha 2: Konjugace

*Která z uvedených sloučenin bude absorbovat při vyšší vlnové délce a proč?*



## Úloha 2: Konjugace

Která z uvedených sloučenin bude absorbovat při vyšší vlnové délce a proč?



S délkou konjugovaného systému klesá HOMO-LUMO gap a narůstá  $\lambda_{max}$ .

## Úloha 3: Vliv pH na absorpční spektrum

*Pokuste se přiřadit velikost extinkčního koeficientu a absorpčního maxima pro tyrosin při  $pH < pK_a$  a  $pH > pK_a$ . Své tvrzení zdůvodněte.*

$$A_1, \varepsilon_1 = 270nm, 1450$$

$$A_2, \varepsilon_2 = 287nm, 2600$$



## Úloha 3: Vliv pH na absorpční spektrum

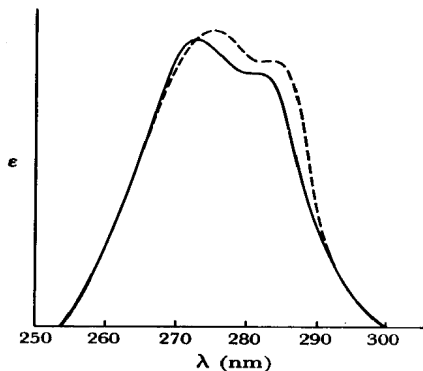
*Pokuste se přiřadit velikost extinkčního koeficientu a absorpčního maxima pro tyrosin při  $pH < pK_a$  a  $pH > pK_a$ . Své tvrzení zdůvodněte.*

$$A_1, \varepsilon_1 = 270\text{nm}, 1450 \text{ -OH} \Rightarrow pH < pK_a$$

$$A_2, \varepsilon_2 = 287\text{nm}, 2600 \text{ -O}^- \Rightarrow pH > pK_a$$

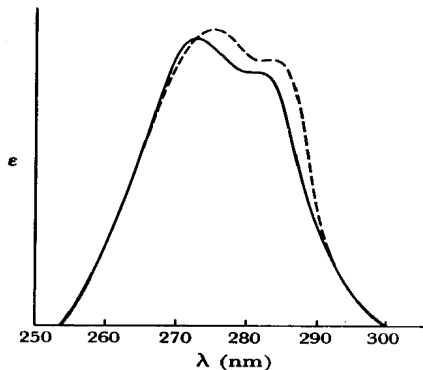
## Úloha 4: Vliv solvatace na absorpční spektrum

Přiložené absorpční spektrum tyrosinu ukazuje vliv přidavku ethylen glykolu o koncentraci 15%. Interpretujte pomocí hladinového modelu pozorování.



## Úloha 4: Vliv solvatace na absorpční spektrum

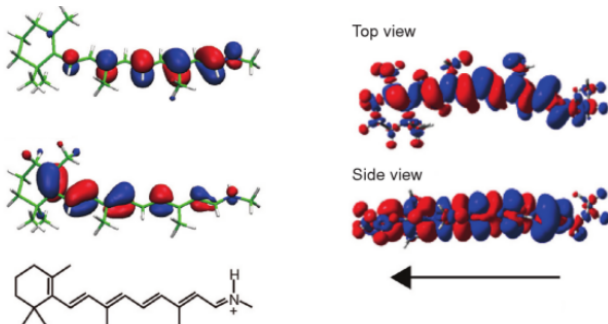
Přiložené absorpční spektrum tyrosinu ukazuje vliv přidavku ethylen glykolu o koncentraci 15%. Interpretujte pomocí hladinového modelu pozorování.



Bathochromní, Hyperchromní posun. Obecně pokles polaroty prostředí destabilizuje  $\pi^*$  (blueshift  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) a destabilizuje  $n$  (redshift  $n \rightarrow \pi^*$ )

# Úloha 5: Retinal

Na obrázku je znázorněna struktura zrakového pigmentu retinalu. Identifikujte HOMO a LUMO orbitály (levý sloupec). Pokuste se odhadnout jaký efekt má vazba kvartérního dusíku na hodnotu  $\lambda_{max}$ . Na základě analýzy diferenční elektronové hustoty (pravý sloupec) ukažte orientaci tranzitního dipólového momentu.



M. Mohseni, Y. Omar, G. S. Engel, M. B. Plenio: Quantum effects in biology

# Úloha 6: Cirkulární dichroismus

V CD spektroskopii se užívá několik veličin charakterizujících interakci polarizovaného záření s chirálním médiem. Doplňte fyzikální vztah a rozměr.

---

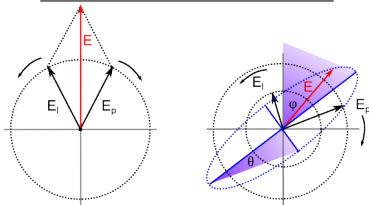
Optická rotační disperze

Cirkulární dichroismus

---

Elipticita

---



# Úloha 6: Cirkulární dichroismus

V CD spektroskopii se užívá několik veličin charakterizujících interakci polarizovaného záření s chirálním médiem. Doplňte fyzikální vztah a rozměr.

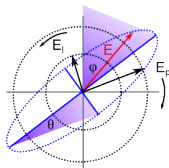
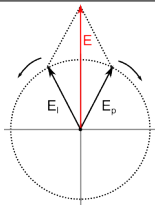
---

Optická rotační disperze  $\varphi = \frac{2\pi \cdot x}{\lambda} (n_l - n_p)$  [rad]

Cirkulární dichroismus  $\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_p$  [M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>]

Elipticita  $\text{tg}\theta = \frac{E_l - E_p}{E_l + E_p}$

---



## Úloha 7: Lambert-Beerův zákon

Molární extinkční koeficient roztoku při 540 nm je  $268 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Při průchodu světla o uvedené vlnové délce roztokem o optické délce 7.5 mm došlo k absorpci 52.3% intenzity. Jaká byla koncentrace rozpuštěné látky?

## Úloha 7: Lambert-Beerův zákon

Molární extinkční koeficient roztoku při 540 nm je  $268 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Při průchodu světla o uvedené vlnové délce roztokem o optické délce 7.5 mm došlo k absorpci 52.3% intenzity. Jaká byla koncentrace rozpuštěné látky?

### Řešení

$$A = \log \frac{I_{in}}{I_{out}}, \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

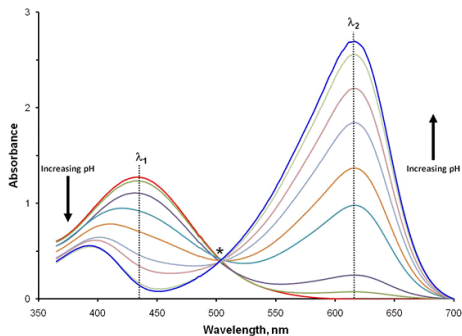
$$c = \frac{\log \frac{1}{0.477}}{\varepsilon \cdot l} = \frac{0.321}{298,0.75} = \mathbf{1.6 \text{ mM}}$$



## Úloha 8: Monitorování konverze pomocí UV-VIS spektra

Na obrázku je záznam VIS-spektra bromthymolové modři v závislosti na měnícím se pH.

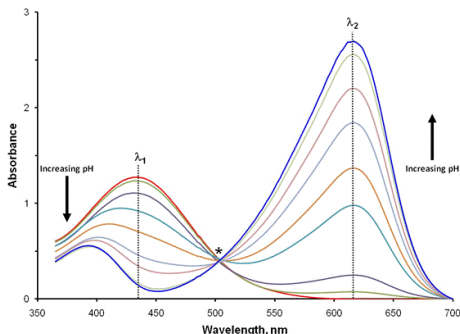
- Jak se nazývá bod ve spektru označený hvězdičkou a jakou vlastností se vyznačuje?
- K absorpčním maximům přiřaďte entity  $HInd$  a  $Ind^-$ .
- Vyjádřete poměr konjugované kyseliny a báze pomocí aktuálních hodnot absorbancí  $A(\lambda_1)$ ,  $A(\lambda_2)$  a jejich limitních hodnot  $A(\lambda_1)_{max}$  a  $A(\lambda_2)_{max}$ .



## Úloha 8: Monitorování konverze pomocí UV-VIS spektra

Na obrázku je záznam VIS-spektra bromthymolové modři v závislosti na měnícím se pH.

- Jak se nazývá bod ve spektru označený hvězdičkou a jakou vlastností se vyznačuje?
- K absorpčním maximům přiřaďte entity  $HInd$  a  $Ind^-$ .
- Vyjádřete poměr konjugované kyseliny a báze pomocí aktuálních hodnot absorbancí  $A(\lambda_1)$ ,  $A(\lambda_2)$  a jejich limitních hodnot  $A(\lambda_1)_{max}$  a  $A(\lambda_2)_{max}$ .



### Řešení

- isosbestický bod:  $\varepsilon(HInd)_{\lambda^*} = \varepsilon(Ind^-)_{\lambda^*}$
- $HInd$   $\lambda_1 = 430\text{nm}$ ,  $Ind^-$   $\lambda_2 = 620\text{nm}$
- $$\frac{[HInd]}{[Ind^-]} = \frac{A(\lambda_1) \cdot A(\lambda_2)_{max}}{A(\lambda_2) \cdot A(\lambda_1)_{max}}$$

## Úloha 9: Výpočet tranzitního momentu

Uvažme konjugovaný systém  $\pi$ -elektronů popsaný vlnovou funkcí částice v jednorozměrné potenciálové jámě. **A) Ukažte, jak se energie excitace mění s délkou jámy. B) Odvoďte analyticky i graficky, že pravděpodobnost přechodu  $n = 1 \rightarrow 2$  je nenulová na rozdíl od  $n = 1 \rightarrow 3$ . Nápověda: Vlastní stacionární funkce elektronu v potenciálové jámě o délce  $L$  má tvar  $\psi_n = A \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x$**

## Úloha 9: Výpočet tranzitního momentu

Uvažme konjugovaný systém  $\pi$ -elektronů popsaný vlnovou funkcí částice v jednorozměrné potenciálové jámě. **A)** Ukažte, jak se energie excitace mění s délkou jámy. **B)** Odvoďte analyticky i graficky, že pravděpodobnost přechodu  $n = 1 \rightarrow 2$  je nenulová na rozdíl od  $n = 1 \rightarrow 3$ . *Nápověda: Vlastní stacionární funkce elektronu v potenciálové jámě o délce  $L$  má tvar  $\psi_n = A \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x$*

### Řešení

$$A = \sqrt{1 / \int_0^L \sin^2 \frac{\pi \cdot n}{L} x dx} = \sqrt{\frac{2}{L}}$$

$$E_n = A^2 \int_0^L \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x \left( -\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} \right) \sin \frac{\pi \cdot n}{L} x dx =$$

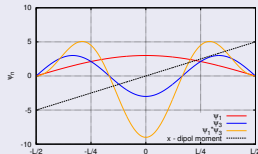
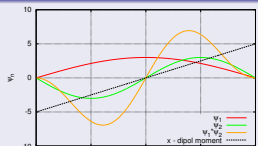
$$\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\pi^2 n^2}{L^2} \int_0^L A^2 \sin^2 \frac{\pi \cdot n}{L} x dx = \frac{\hbar^2}{2m} \frac{\pi^2 n^2}{L^2}$$

$$\mu_{1 \rightarrow 2} = eA^2 \int_0^L \sin \frac{\pi \cdot 1}{L} x \cdot x \cdot \sin \frac{\pi \cdot 2}{L} x dx = 1 \text{ g}^* u^* u = g$$

$$\mu_{1 \rightarrow 3} = eA^2 \int_0^L \sin \frac{\pi \cdot 1}{L} x \cdot x \cdot \sin \frac{\pi \cdot 3}{L} x dx = 0 \text{ g}^* u^* u = 0$$

$$\sin \alpha \cdot \sin \beta = \frac{1}{2} [\cos(\alpha - \beta) - \cos(\alpha + \beta)]$$

$$\int x \cdot \cos ax = \frac{x}{a} \sin ax + \frac{1}{a^2} \cos ax$$



## Úloha 10: Frank-Condonův faktor

**Základní stav** hypotetické molekuly je popsán vibrační vlnovou funkcí  $N_0 \cdot e^{-a(x-x_0)^2}$ . **Vypočítejte Franck-Condonův faktor** pro přechod do stavu  $N_1 \cdot e^{-a(x-x_1)^2}$ .

Franz-Xaver Schmid: **Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry**

M. Mohseni, Y. Omar, G. S. Engel, M. B. Plenio: **Quantum effects in biology**

P. Atkins, J. de Paula: **Physical Chemistry**

<http://www.cyut.edu.tw/~wjchien/BiopolymerSpect/text/absorption.pdf>

# Příště: Molekulová dynamika biomolekul