

Einführung in die Spektroskopie für Studenten der Biologie

Jörg H. Kleinschmidt

<http://www.biologie.uni-konstanz.de/folding/home.html>

Literatur

Banwell, C. N. , Elaine M. McCash, Molekülspektroskopie. Ein Grundkurs.
Taschenbuch - Oldenbourg Verlag, 1999. ISBN: 3486245074

Werner Schmidt, Optische Spektroskopie. Eine Einführung. 2.Auflage
Taschenbuch - 372 Seiten - Wiley/VCH, Weinh. 2000

Friebolin, H., Ein- und zweidimensionale NMR- Spektroskopie. Eine Einführung. von Horst Friebolin
Taschenbuch - Wiley/VCH, Weinh. 1999, 3., veränd. Aufl. ISBN: 3527295143

Atkins/de Paula, Physikalische Chemie, Wiley/VCH, 2006 (Spektroskopie-Kapitel)

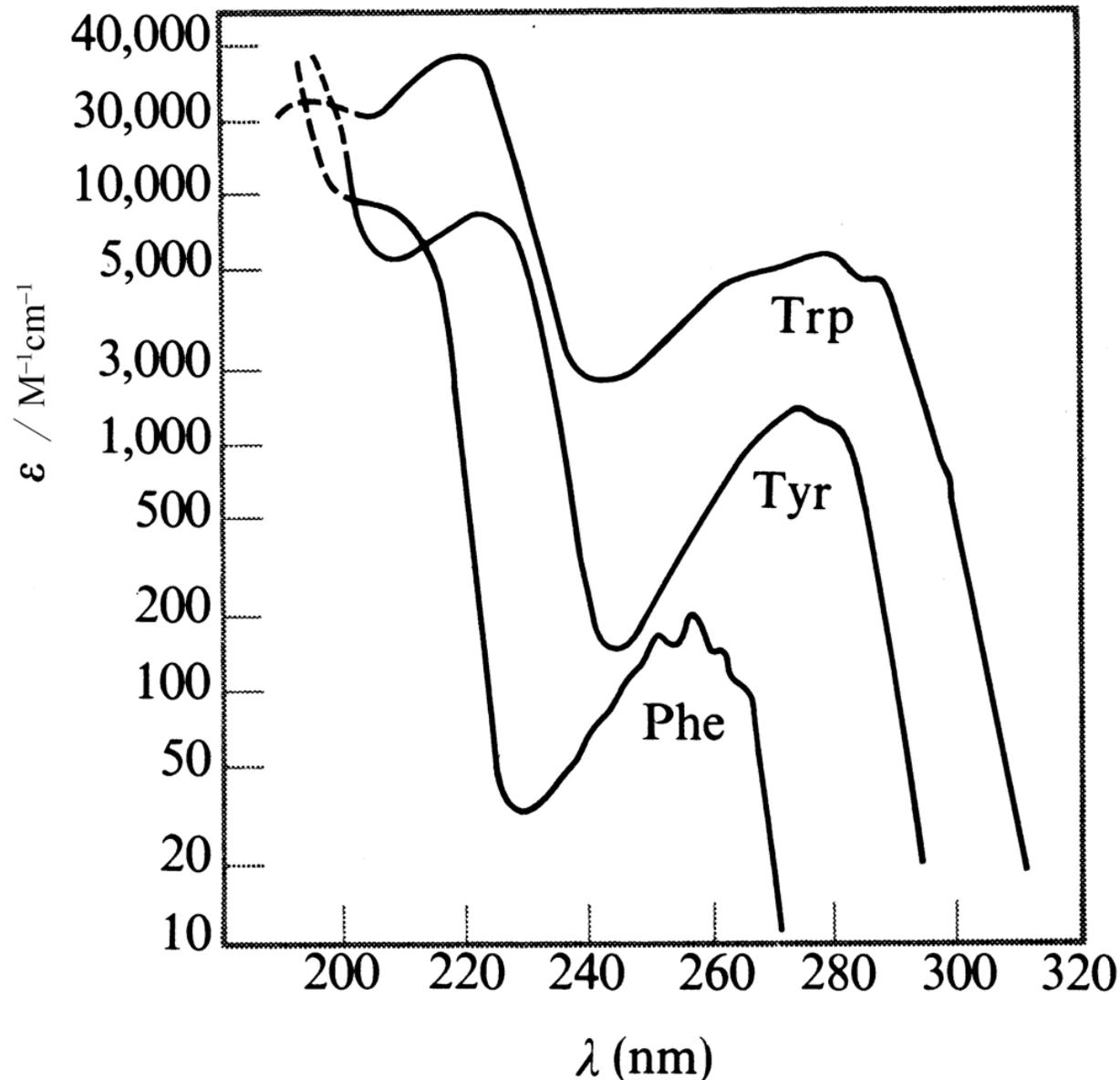
Galla, H.J., Spektroskopische Methoden in Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Übungsaufgaben

<http://www.biologie.uni-konstanz.de/folding/Teaching-2009.html>

UV-Absorptionsspektren aromatischer Aminosäuren

Absorption $A(\lambda)$ bzw. Absorptionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$ sind Wellenlängen-abhängig



Aufgetragen ist hier der Absorptionskoeffizient ε , als Funktion der Wellenlänge.

Die Aminosäuren absorbieren im ultravioletten Bereich und die Absorption als Funktion der Wellenlänge ist charakteristisch für die absorbierende Substanz.

Wie kommt es zu dieser Wellenlängenabhängigkeit der Absorption (bzw. des Absorptionskoeffizienten) ?

Um die Wellenlängenabhängigkeit der Absorption von Strahlung zu erklären, ist es wichtig, die möglichen Energiezustände eines Moleküls oder zunächst erstmal eines Atoms zu betrachten.

Die Ursache für die Wellenlängenabhängigkeit eines Absorptionsspektrums liegt in der atomaren bzw. molekularen Struktur einer Substanz

Eine der einfachsten Strukturen ist die des Wasserstoffs. Atomarer Wasserstoff kann durch eine Gasentladung angeregt werden und sendet dann Strahlung aus (Emission, der umgekehrte Prozess der Absorption). Diese Strahlung ist nicht weiß sondern ergibt nach Durchgang durch den Monochromator ein Linienspektrum:



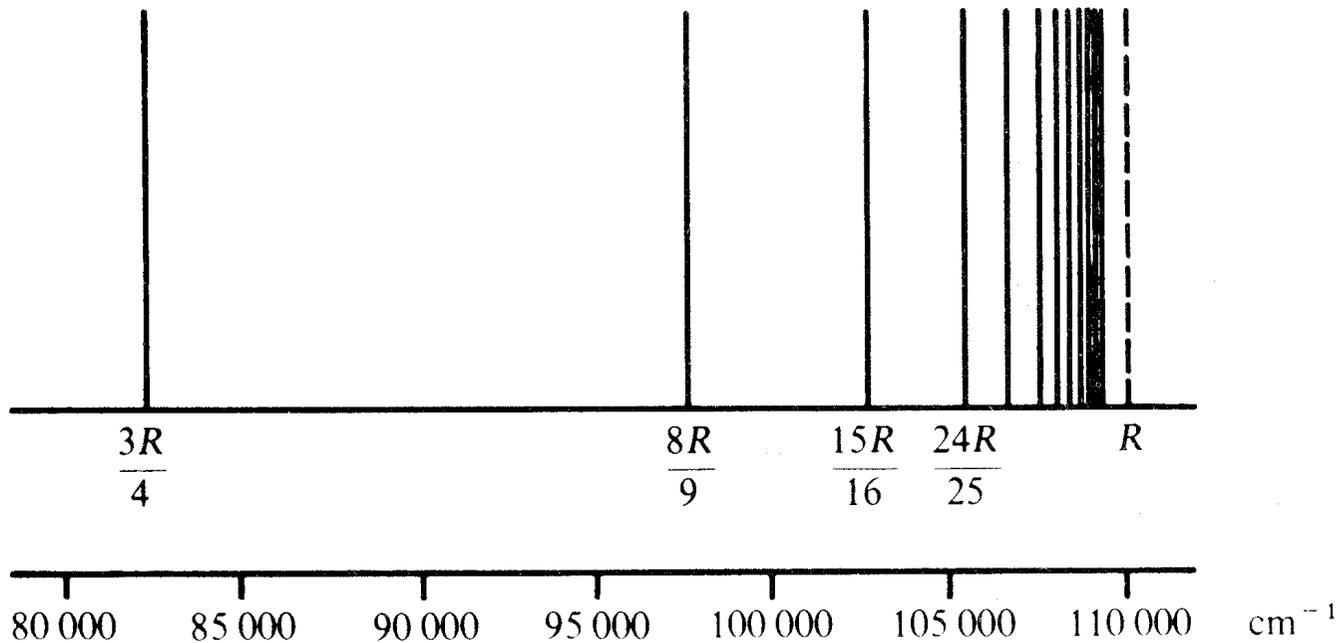
Offensichtlich werden durch die Gasentladung ganz bestimmte (diskrete) Übergänge zwischen Energiezuständen im Wasserstoffatom angeregt, die Energie durch Aussenden von Strahlung ganz bestimmter Wellenlängen abgeben. Die Energiedifferenzen zwischen diesen Zuständen entsprechen der Frequenz bzw. Wellenlänge der beobachteten Emissionslinien, $\Delta E = h \cdot \nu$. Empirisch wurde gefunden:

$$\frac{\Delta E}{h} = \frac{c}{\lambda} = \frac{4c}{B} \left[\frac{1}{2^2} - \frac{1}{n^2} \right]$$

Die beobachteten Frequenzen der Emissionslinien stehen über einfache ganze Zahlen n miteinander in Beziehung

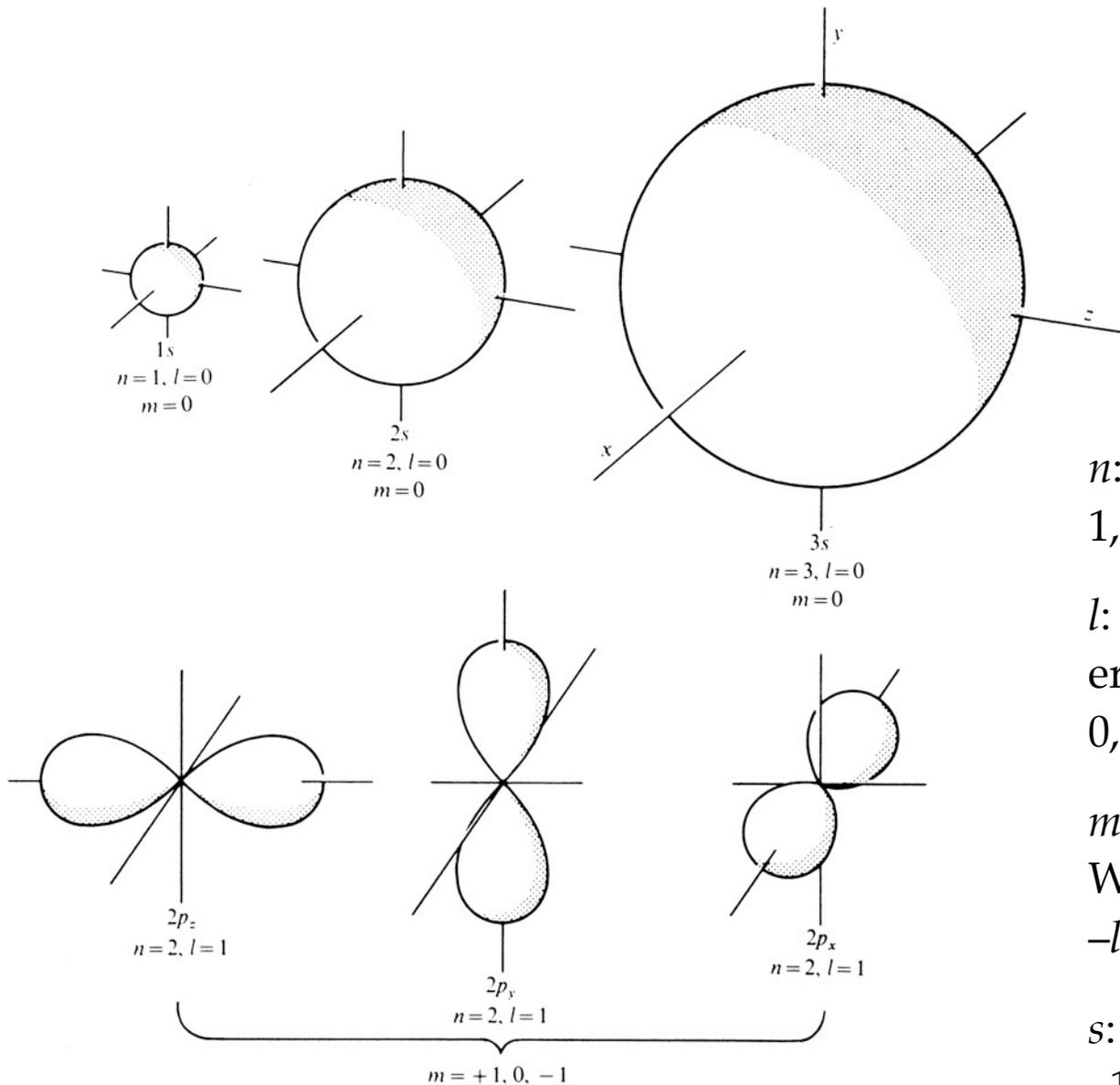
Die Spektrallinien des Wasserstoffatoms zu stehen über Naturkonstanten und einfache ganze Zahlen zu einander in Beziehung

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{4}{B} \left[\frac{1}{n_2^2} - \frac{1}{n_1^2} \right] = R_H \left[\frac{1}{n_2^2} - \frac{1}{n_1^2} \right] \quad R_H = \frac{m_e e^4}{8h^3 c \epsilon_0^2} = 1.0973731568 \cdot 10^{-7} \text{ m}^{-1}$$



Lyman Serie von Spektrallinien des Wasserstoffatoms, die gegen einen Grenzwert konvergiert, den Ionisationspunkt.

In Atomen werden die Aufenthaltsräume von Elektronen durch Wahrscheinlichkeitsfunktionen beschrieben und die Energien der Elektronen durch Quantenzahlen



$$\psi_n = f\left(\frac{r}{a_0}\right) \exp\left(-\frac{r}{na_0}\right);$$

$$\text{wobei } a_0 = \frac{h^2}{4\pi^2 m_e e^2}$$

$$E_n = \frac{m_e e^4}{8h^2 \epsilon_0^2} \frac{1}{n^2} = R_H hc \frac{1}{n^2}$$

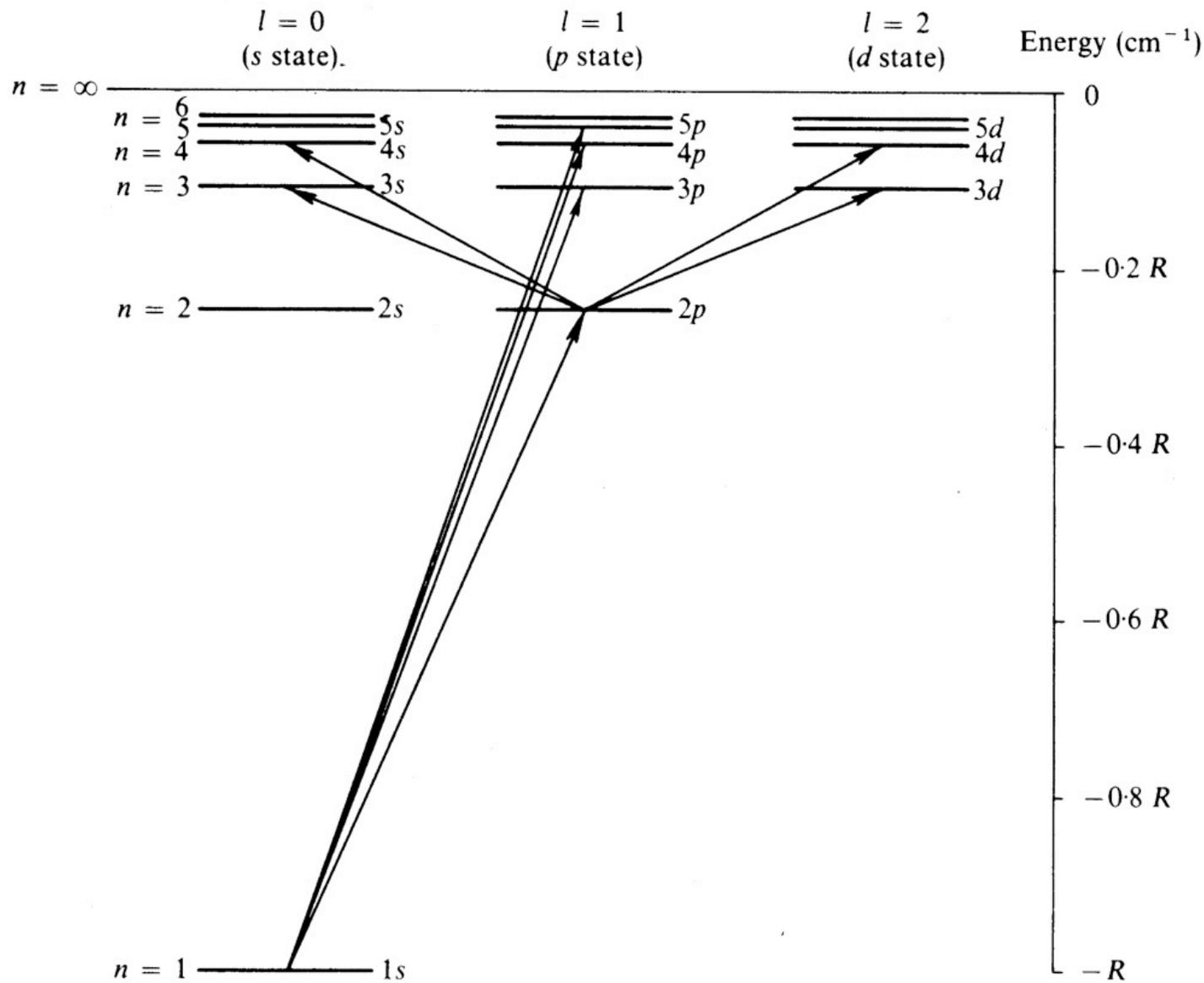
n : Hauptquantenzahl, erlaubte Werte:
1, 2, 3, ...

l : Bahndrehimpulsquantenzahl,
erlaubte Werte:
0, 1, 2, 3, ..., $n-1$

m : Magnetquantenzahl, erlaubte
Werte:
 $-l, \dots, 0, 1, 2, 3, \dots, +l$

s : Spinquantenzahl, erlaubte Werte:
 $-1/2, +1/2$

Bei elektronischen Übergängen in Atomen muss sich neben der Hauptquantenzahl n des Elektrons auch die Bahndrehimpulsquantenzahl l ändern



Für elektronische Übergänge kann die Änderung der Hauptquantenzahl beliebig sein, die Bahndrehimpulsquantenzahl muss sich um 1 ändern:

$$\Delta n = \text{beliebig}$$

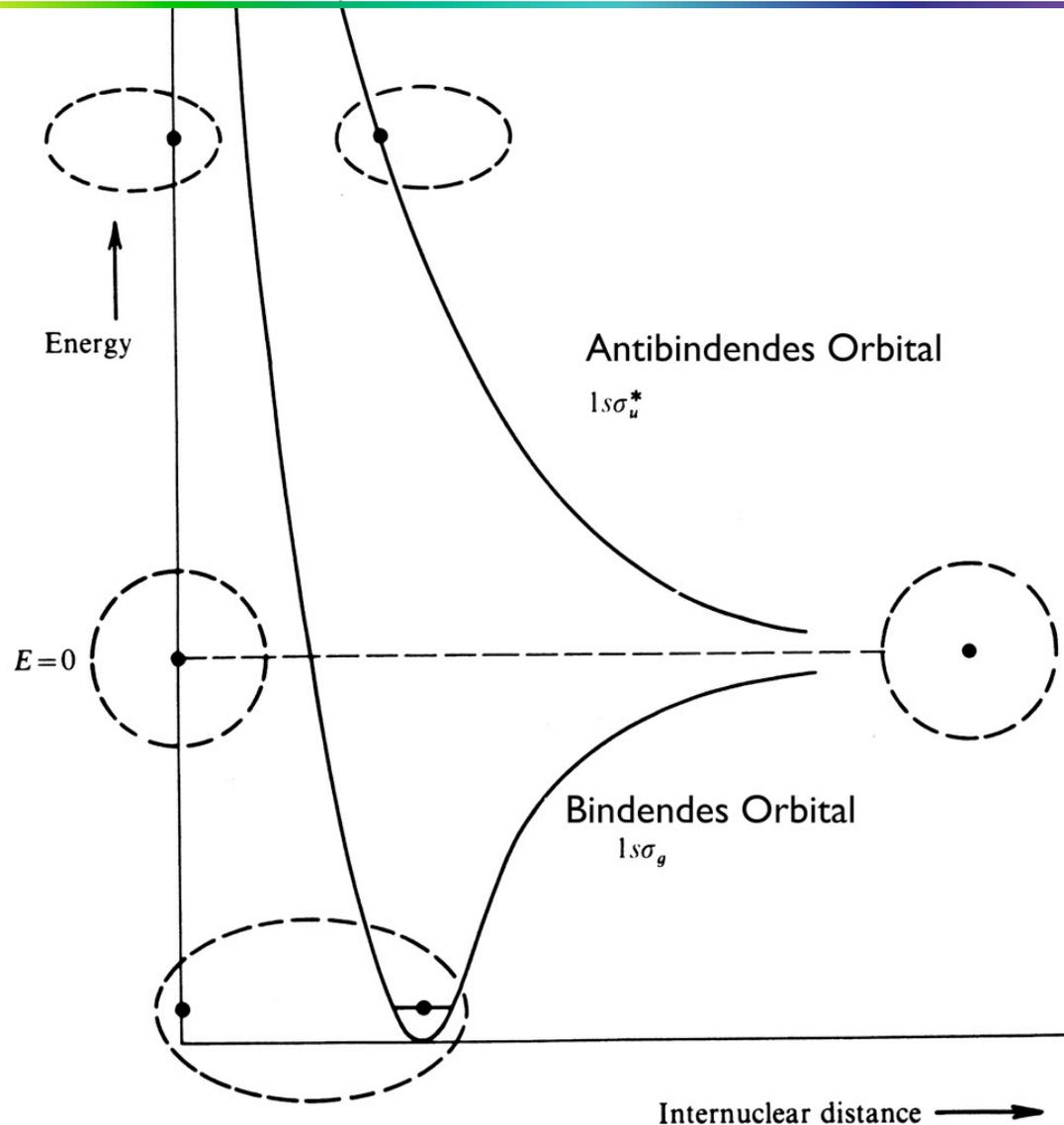
$$\Delta l = \pm 1$$

Auch in Molekülen gibt es diskrete Energiezustände der Elektronen

Die Molekülorbitale ergeben sich aus der Linearkombination der Wellenfunktionen der Atomorbitale

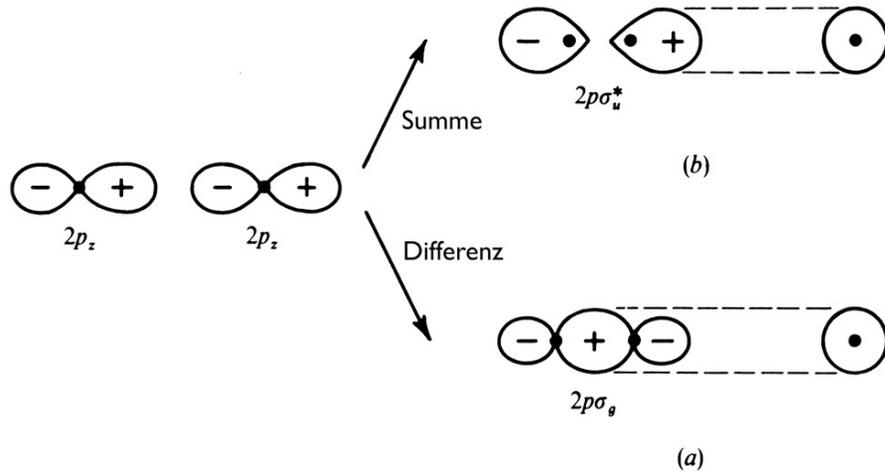
Addition der Atomorbitale führt zu bindenden, Subtraktion zu antibindenden Orbitalen

Nebenstehendes Beispiel zeigt die Kombination der 1s Orbitale des H-Atoms zu einem bindenden σ bzw. zu einem antibindenden σ^* Orbital.



Die Veränderung der Energie des Kernabstandes bezüglich bindender und antibindender Orbitale $1s\sigma_g$ und $1s\sigma_u^*$.

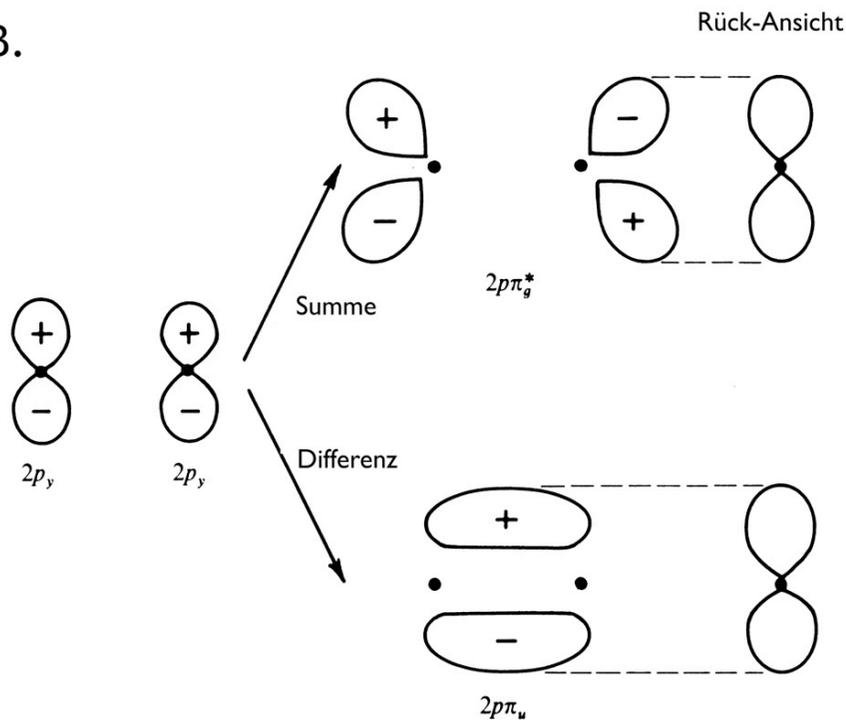
A.



Bei der Linearkombination von p_x -Atomorbitalen unterscheidet man zwei Fälle.

Die Kombination der axialsymmetrischen p_x -Orbitale zu einer σ -Bindung (A)

B.



Die Kombination der p_y bzw. p_z -Orbitale zu sogenannten π -Bindungen (B)

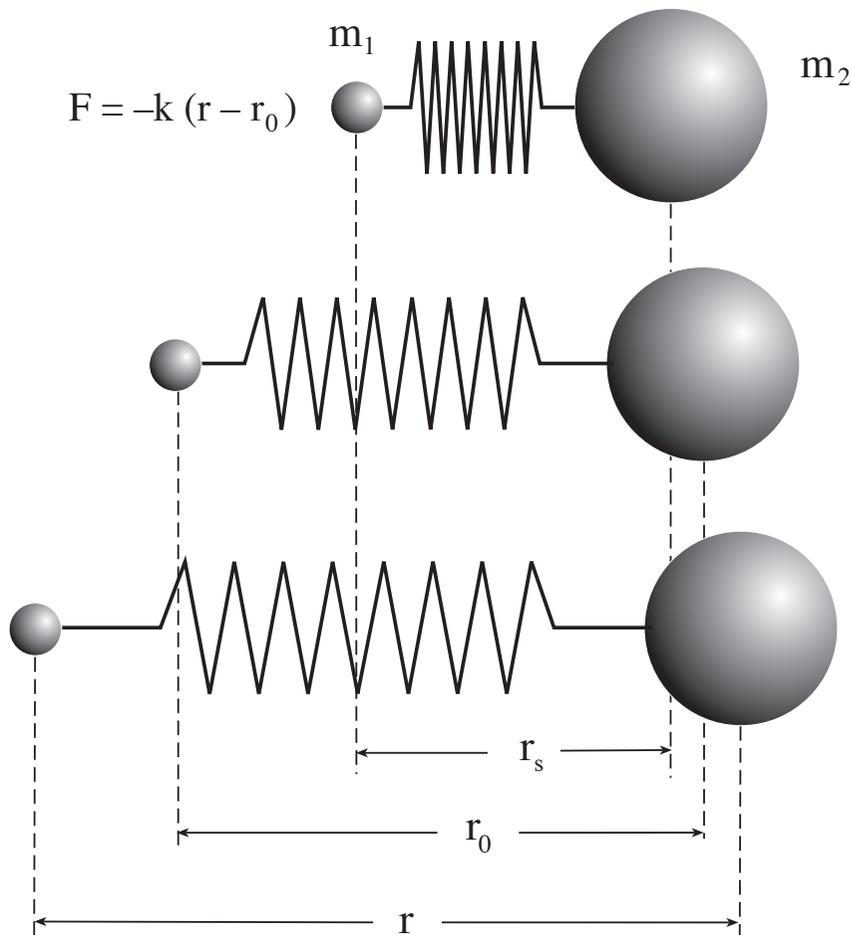
In beiden Fällen liefert die Linearkombination sowohl bindende als auch antibindende Aufenthaltsräume der Elektronen.

A. Linear-Kombination von 2 p_x orbitalen zu bindenden und antibindenden 2 p_σ Molekülorbitalen

B. Linear-Kombination von 2 p_y -Orbitalen zu bindenden und antibindenden 2 p_π -Molekülorbitalen

In Molekülen ist zusätzlich Energie in Form von Schwingungs- und Rotationsenergie speicherbar

Modell eines oszillierenden zweiatomigen Moleküls bei einem Gleichgewichtsabstand r_0



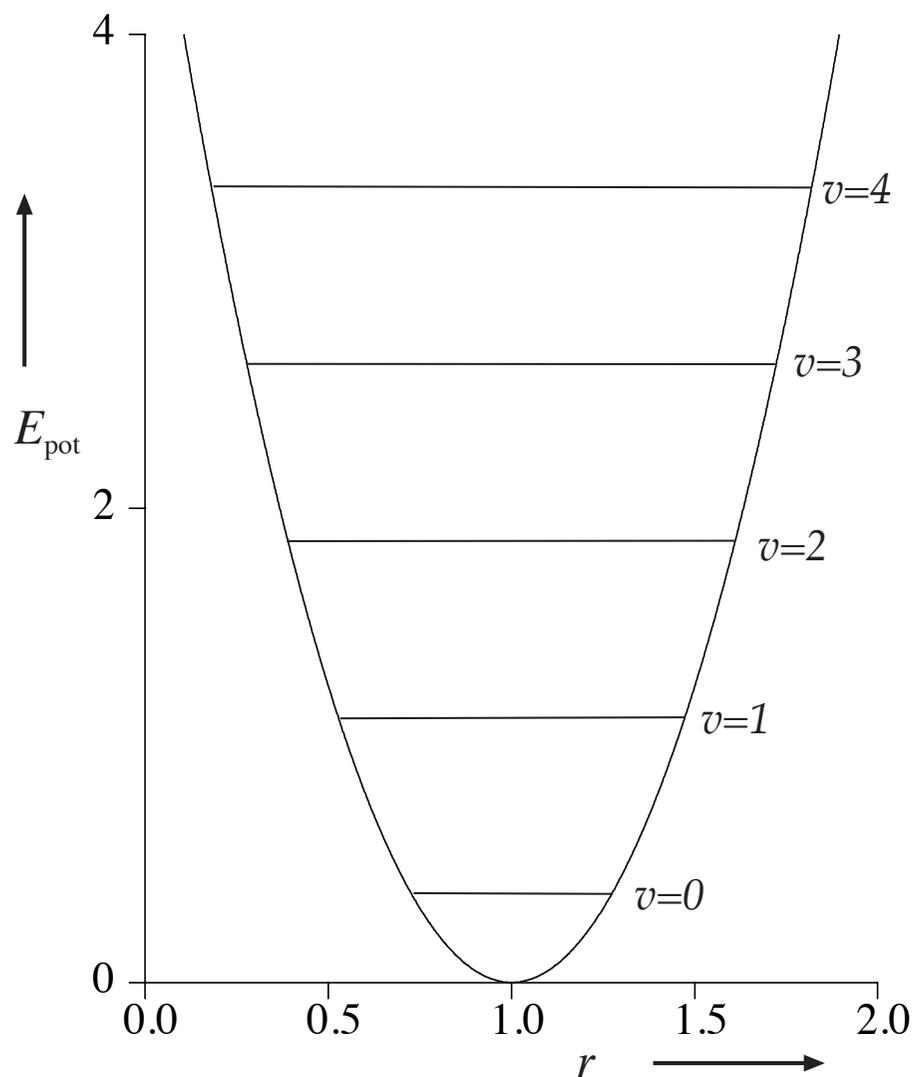
$$E = \frac{1}{2} k [r - r_0]^2$$

$$v_{vib} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$$

In Molekülen sind nicht nur elektronische Energie sondern auch andere Energieformen, beispielsweise Schwingungsenergie, gequantelt.

The Harmonic Oscillator



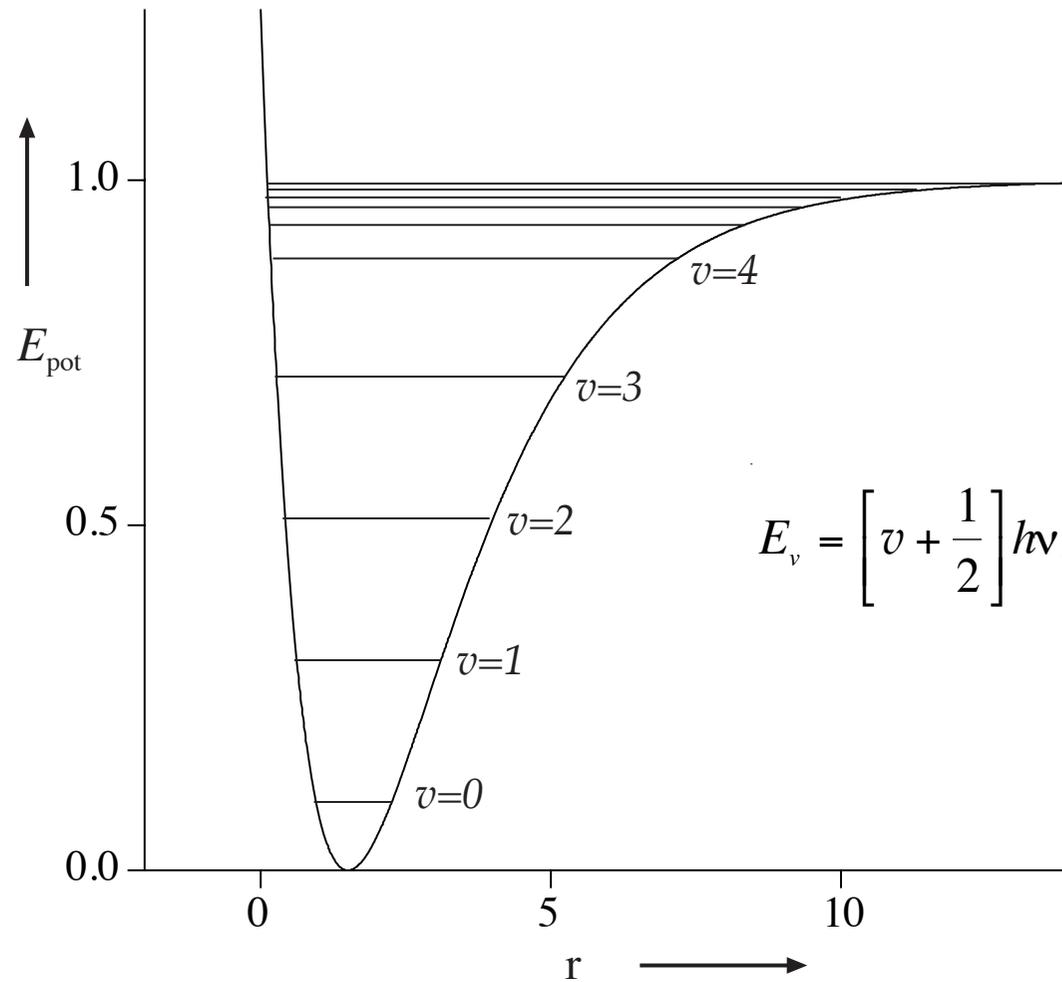
$$E = \frac{1}{2}k(r - r_0)^2$$

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu_{\text{vib}}$$

Die Schwingungsquantenzahl v gibt den Energiezustand der Schwingung an.

Auswahlregel für einen Schwingungsübergang ist $\Delta v = \pm 1$

Der anharmonische Oszillator



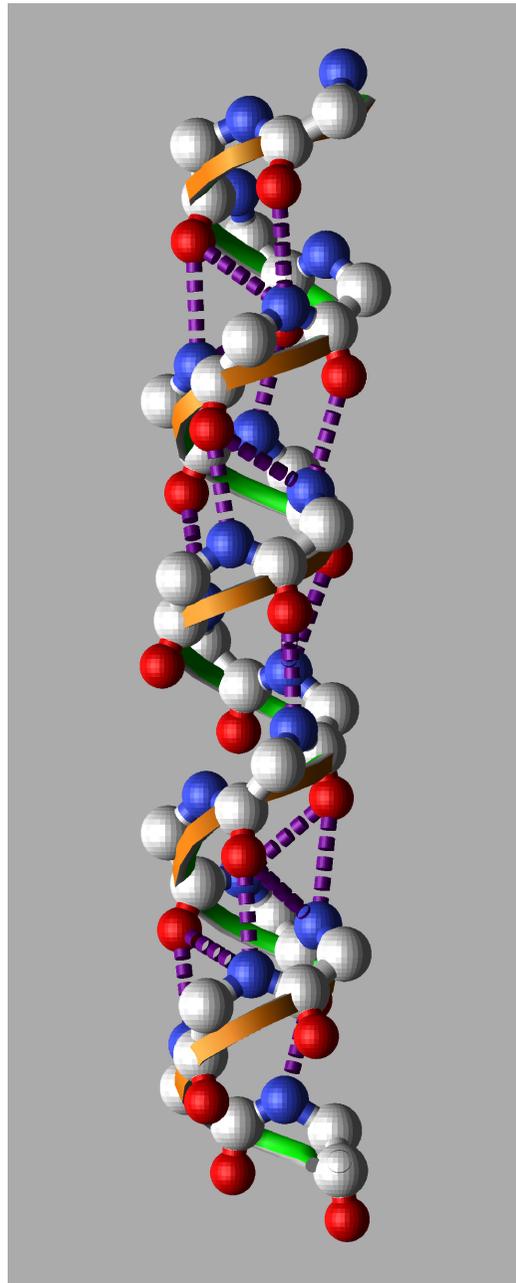
$$E_v = \left[v + \frac{1}{2} \right] h\nu_{\text{vib}} + \left[v + \frac{1}{2} \right]^2 h\nu_{\text{vib}} x$$

$$E = D_{\text{Min}} [1 - \exp\{-a (r - r_0)\}]^2$$

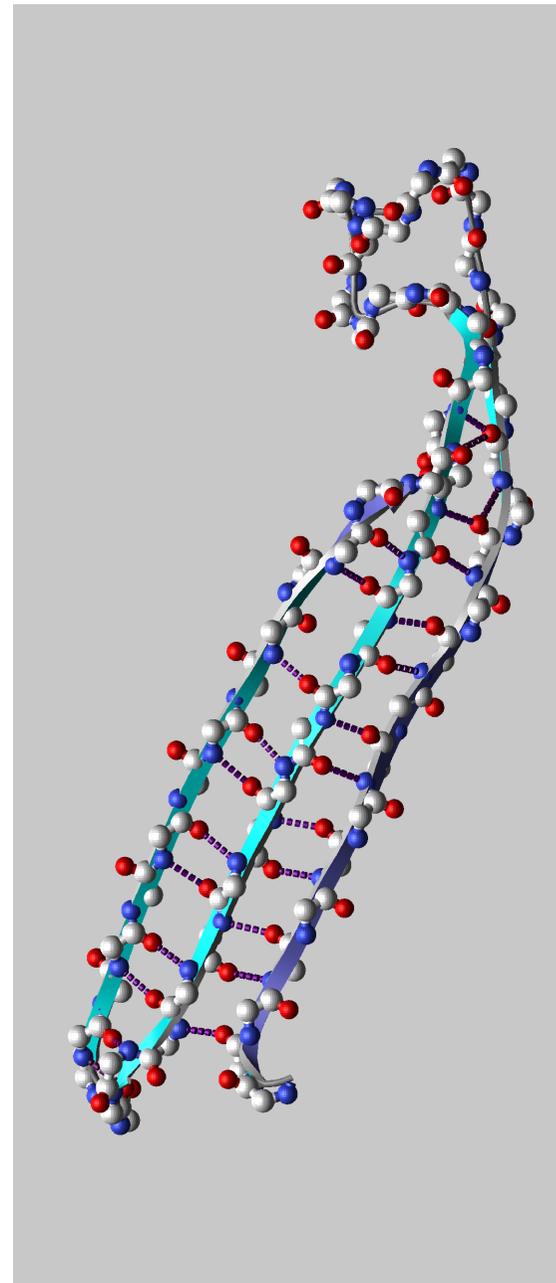
Morse Funktion, nach P. M. Morse

Vergleich

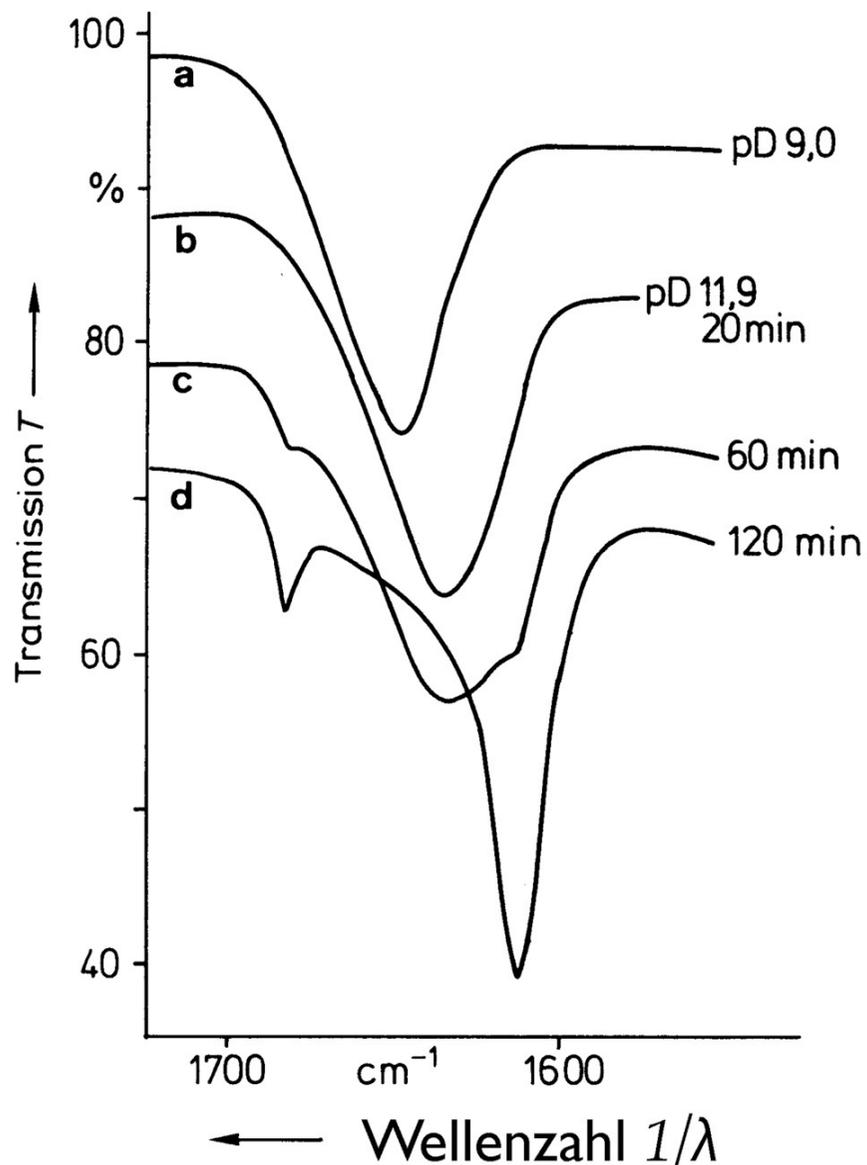
α -Helix



β -Strang



Identifikation der Sekundärstruktur von Proteinen mit Schwingungsspektroskopie (Infrarot-Spektroskopie)

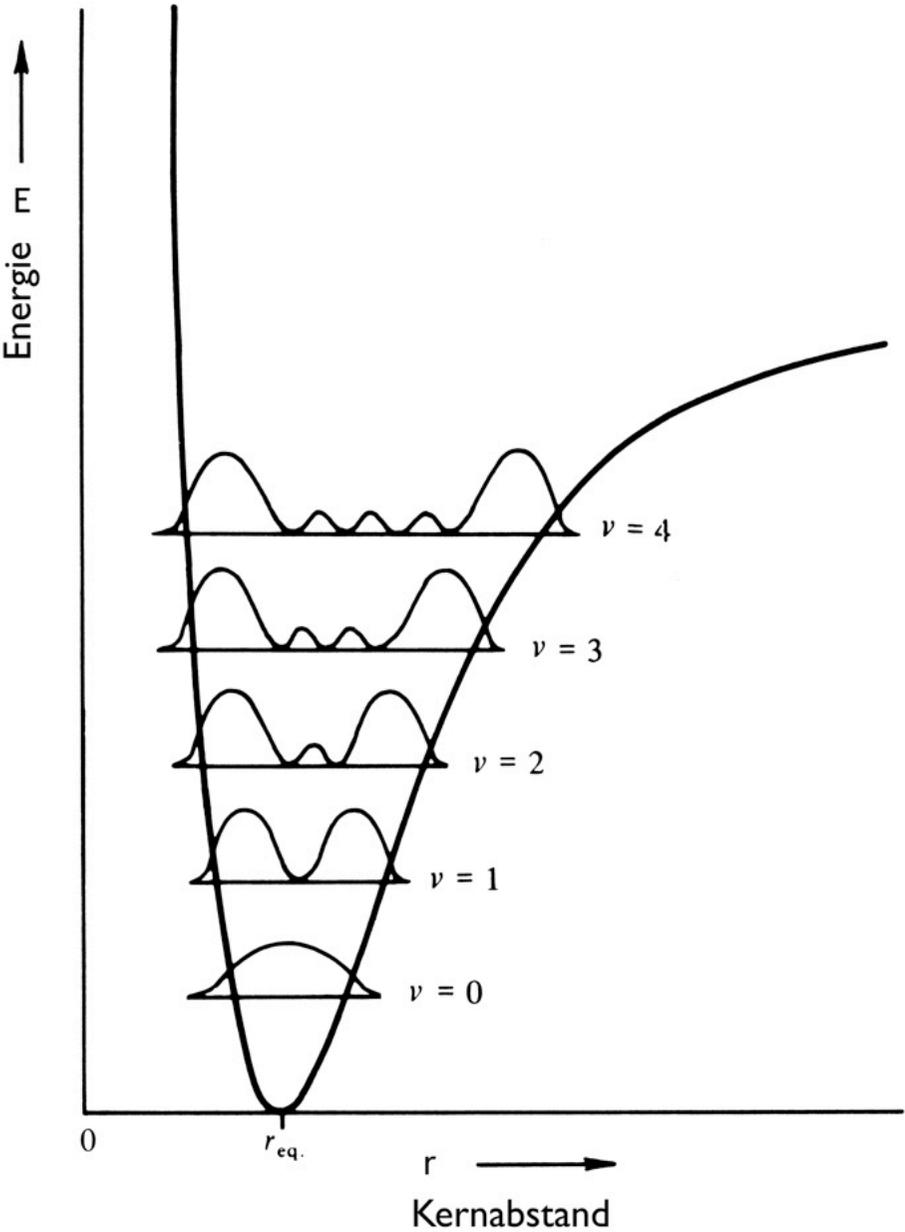


Die Position (Wellenzahl) der Amid Absorptionsbande hängt von der Sekundärstruktur des Proteins oder Peptids ab:

Konformation	Schwingungsfrequenz ν (cm^{-1})		
	Amid A (N-H Streck)	Amid I (C=O Streck)	Amid II (N-H Deformation)
α -helix	3290-3300	1648-1660	1540-1550
β -sheet	3280-3300	1625-1640 (stark) 1690 (schwach)	1520-1530
β -turns		1660-1685	
Zufallsknäuel (ungeordnet, keine Wasserstoff- brückenbindungen)	3250	1652-1660 (deutert) 1640-1648)	1520-1545
3_{10} -Helix		1660-1670	
Aggreg. Stränge		1610-1628	

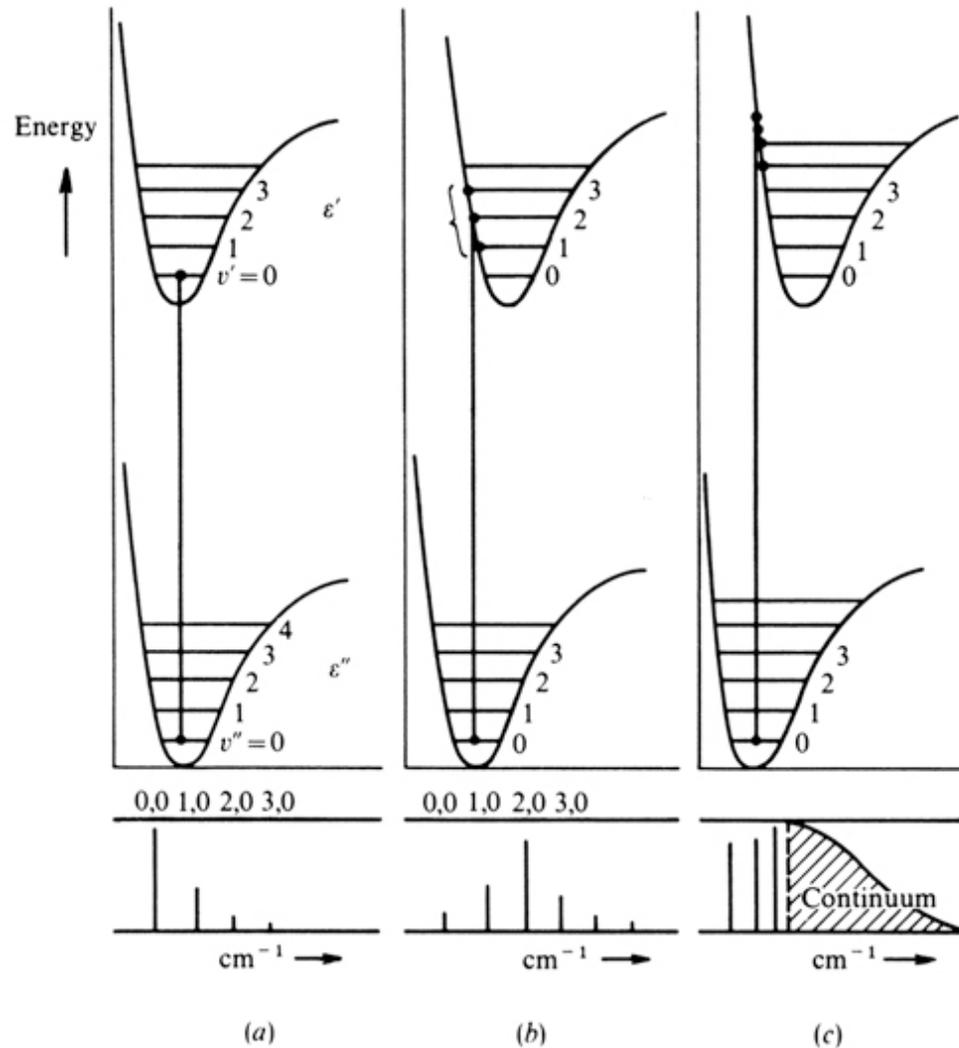
Quelle: Tamm, L.K. and Tatulian, S. A., Infrared Spectroscopy of Proteins and Peptides in Lipid Bilayers, Quarterly Reviews of Biophysics, Nov. 1997
Cantor and Schimmel: Biophysical Chemistry, Part II, Freeman and Company, 1980

Kernabstände und Schwingungszustände



Die Wahrscheinlichkeitsverteilung für ein zweiatomiges Molekül wie durch die Quantentheorie vorhergesagt. Die Kerne werden am wahrscheinlichsten bei einem Abstand gefunden, der durch die Maxima der Abstands-Verteilungen bei jedem Schwingungszustand gegeben ist.

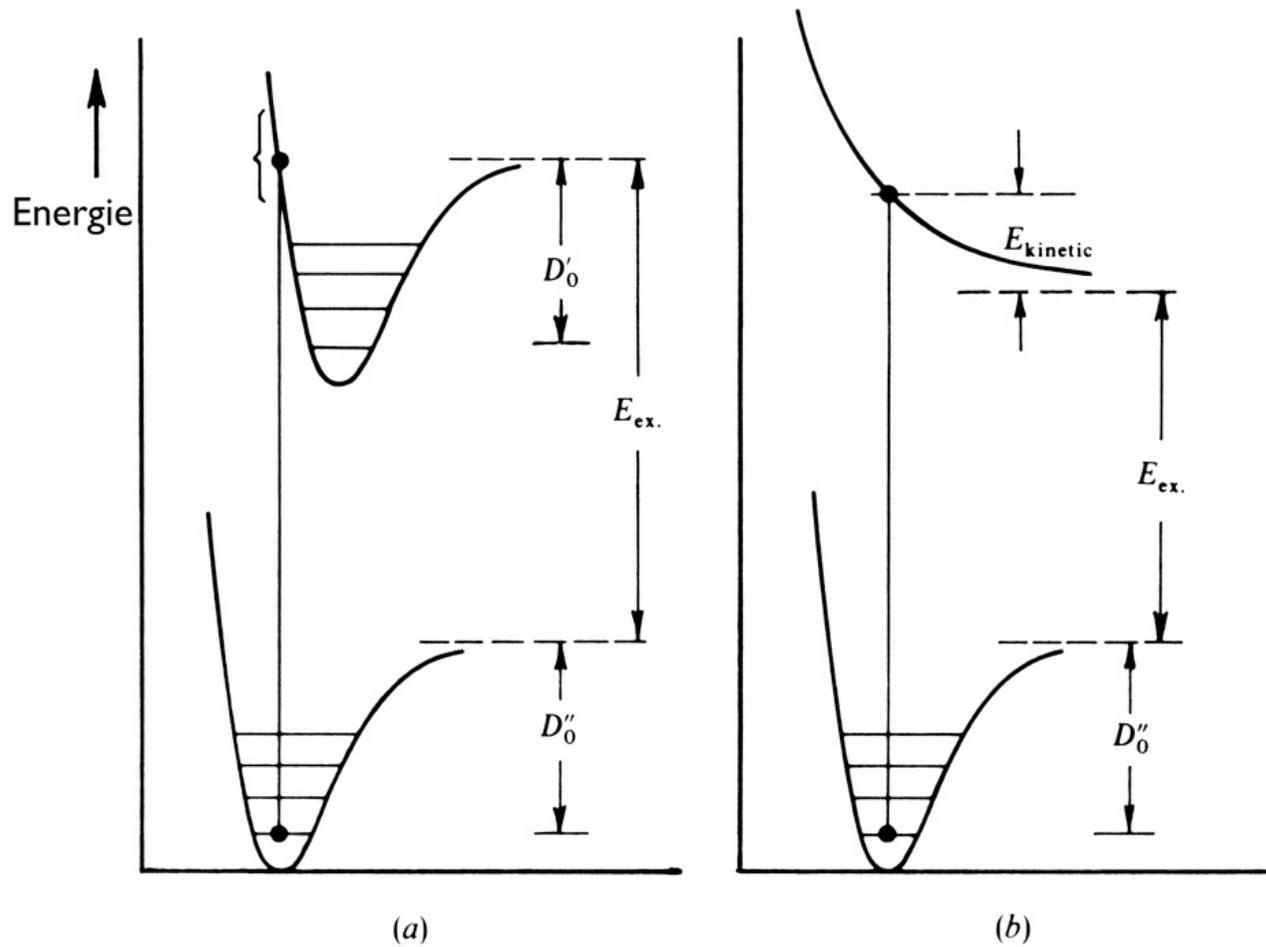
Elektronische Übergänge und Schwingungszustände



Franck-Condon Prinzip, elektronische Übergänge erfolgen ohne Änderung des *momentanen* Kernabstandes:

- Gleichgewichts-Kernabstände sind im elektronisch angeregten und im elektronischen Grundzustand etwa gleich
- der Gleichgewichts-Kernabstand des angeregten Zustandes ist etwas größer als der Kernabstand des elektronischen Grundzustandes
- der Gleichgewichts-Kernabstand des angeregten Zustandes ist etwas kleiner als im Grundzustand.

Elektronische Anregung kann zur Dissoziation führen

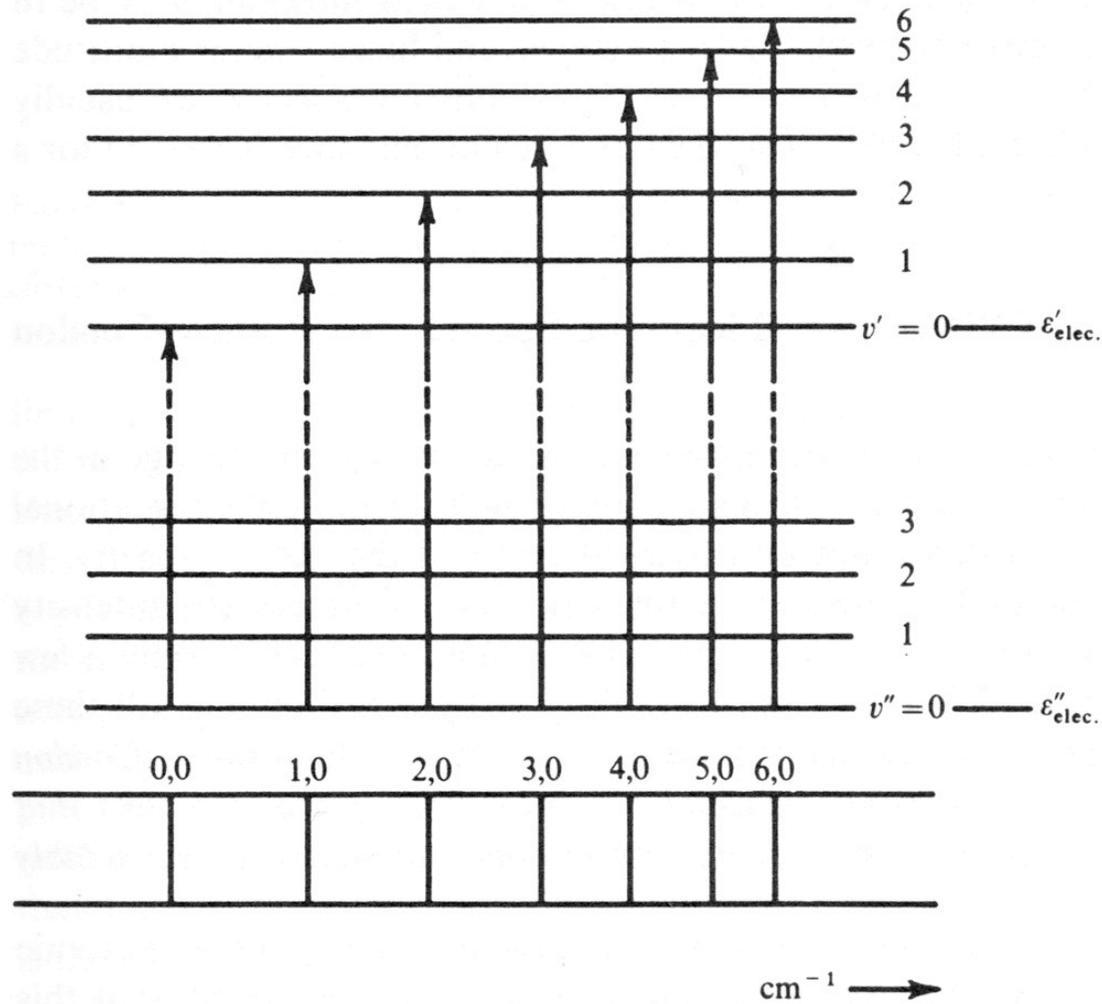


Dissoziation:

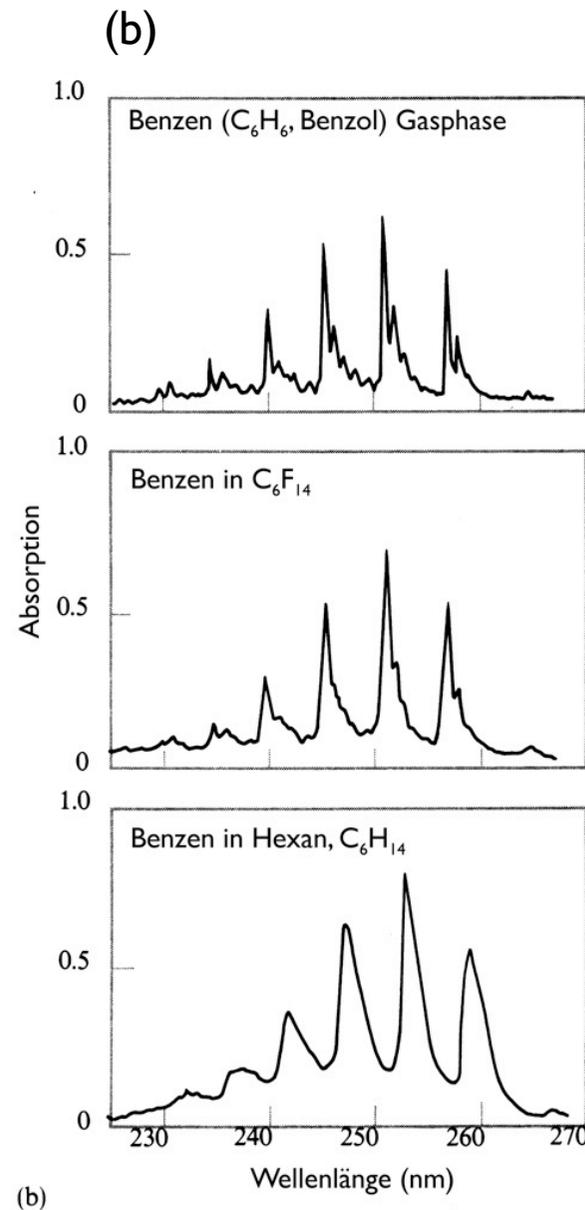
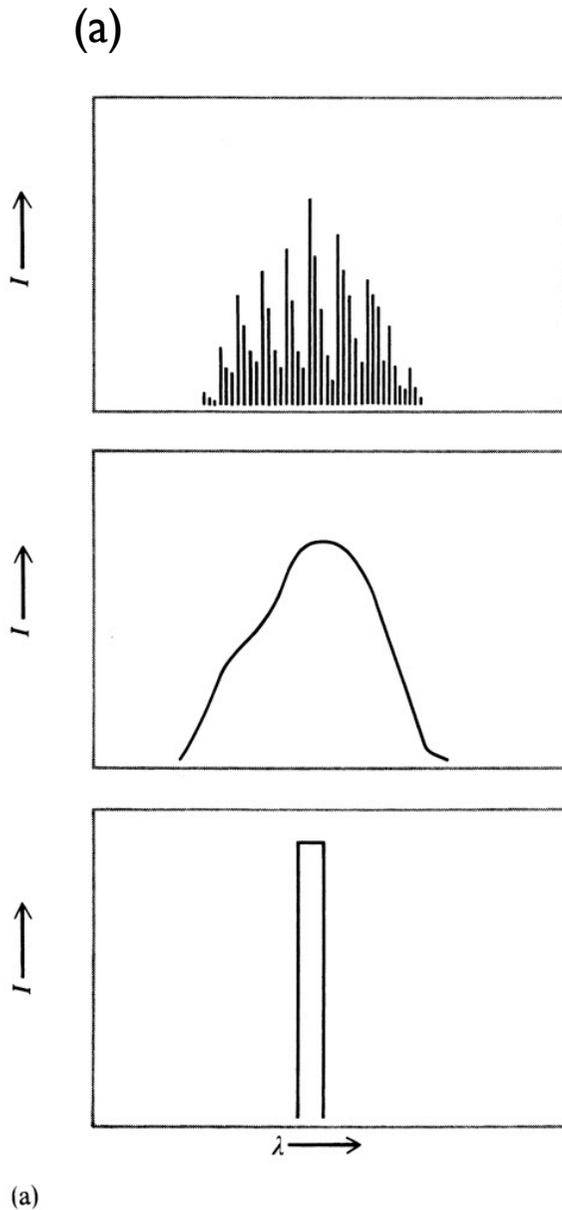
A:Anregung in einen stabilen oberen Zustand

B:Anregung in einen kontinuierlichen oberen Zustand

Die Schwingungsenergieniveaus führen zu einer Grobstruktur elektronischer Absorptionsbanden in Molekülspektren



Molekülspektren zeigen insbesondere in der Gasphase sowohl die Schwingungsgrobstruktur als auch die Feinstruktur durch das Vorliegen von gequantelten Rotationszuständen



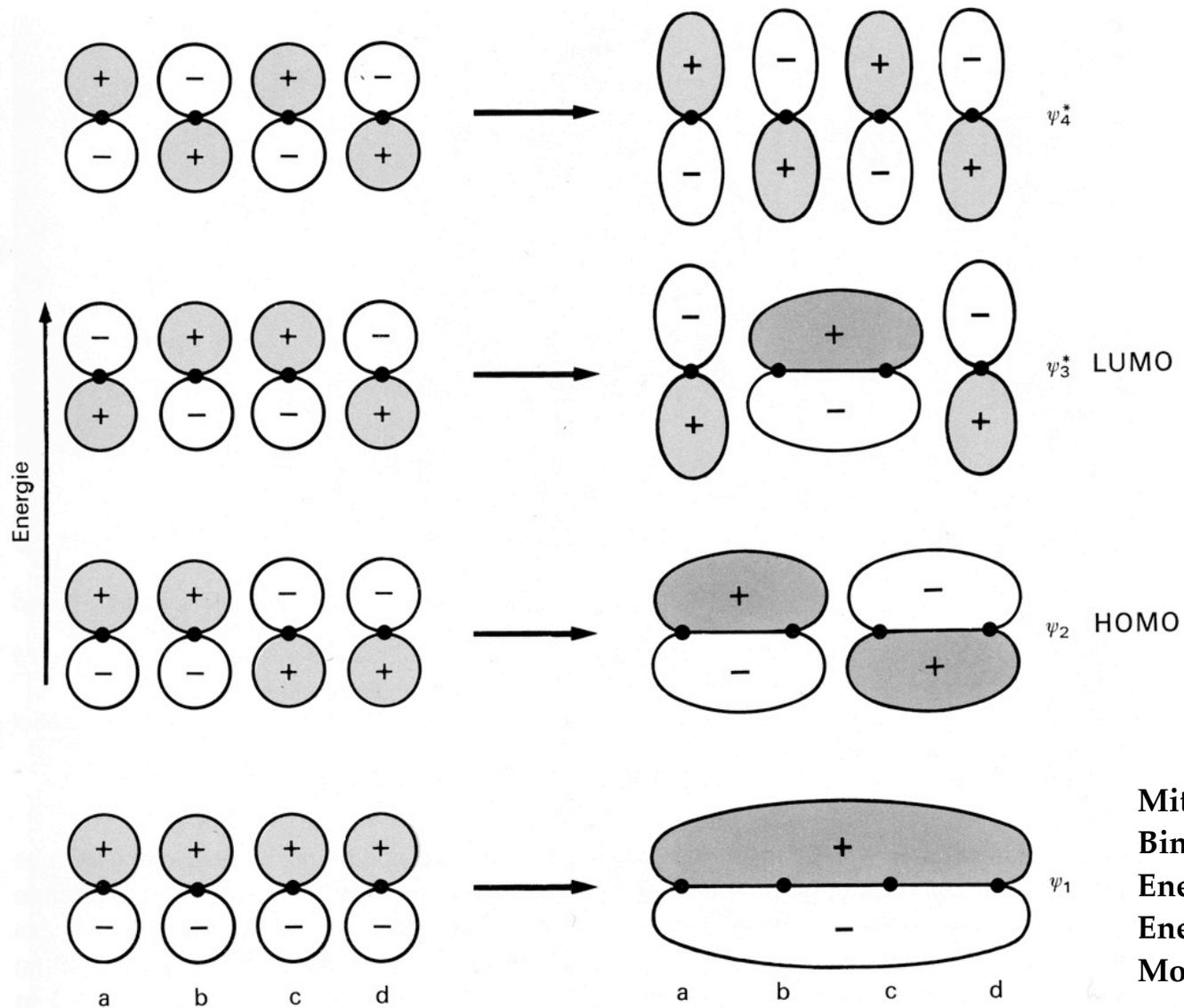
Elektronische
Absorptionsspektren kleiner
Moleküle.

(a) Spektrum eines typischen
kleinen Moleküls in der
Gasphase (oben), in Lösung
(Mitte) und theoretisches
Spektrum

(b) Absorptionsspektrum von
Benzen. Lösungsmittel
induzieren eine Verbreiterung
der Absorptionslinien.

Nach J.B. Birks, Photophysics of
Aromatic Molecules, New York, Wiley,
1970, S. 117

Das Vorliegen konjugierter Doppelbindungen führt zu einer größeren Zahl von möglichen Linearkombinationen der Elektronen-Wellenfunktionen



Mit zunehmender Zahl konjugierter Bindungen werden die Energieunterschiede zwischen den Energieniveaus der Elektronen im Molekül kleiner.

Elektronische Übergänge in verschiedenen Verbindungen und Lage der Absorptionsbanden im UV bzw. sichtbaren Spektrum

	$\pi \rightarrow \pi^*$ stark (nm)	$n \rightarrow \pi^*$ schwach (nm)
$>C=C<$	170	—
$-C\equiv C-$	170	—
$>C=O$	166	280
$>C=N<$	190	300
$>N=N<$?	350
$>C=S$?	500

Isolierte Mehrfachbindungen in einem Molekül: $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge sind relativ unsensitiv bezüglich der an der Bindung beteiligten Atome. Im Gegensatz dazu ist die Lage der $n \rightarrow \pi^*$ Absorptionsbande von der Art des Atoms abhängig.

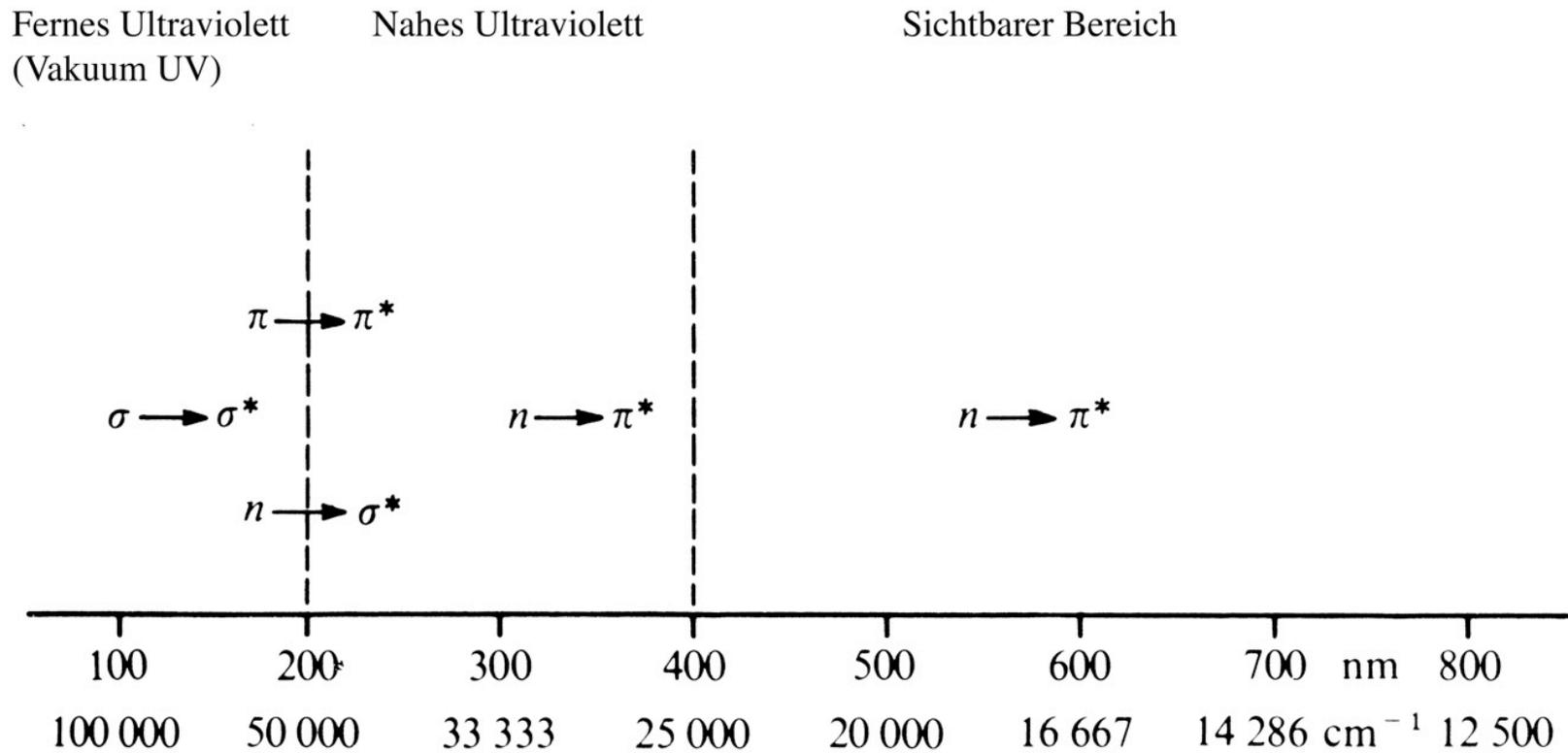
	$\lambda_{\max.}$ (nm)	ϵ
$-C=C-$	170	16 000
$-C=C-C=C-$	220	21 000
$-C=C-C=C-C=C-$	260	35 000

Effekt der Konjugation von Bindungen auf die Position des Absorptionsmaximums ($\pi \rightarrow \pi^*$). Die Position des Wellenlängenmaximums hängt von der Zahl der konjugierten Doppelbindungen ab.

	$\pi \rightarrow \pi^*$ stark (nm)	$n \rightarrow \pi^*$ schwach (nm)
$-C=O$	166	280
$-C=C-C=O$	240	320
$-C=C=C-C=O$	270	350
	245	435

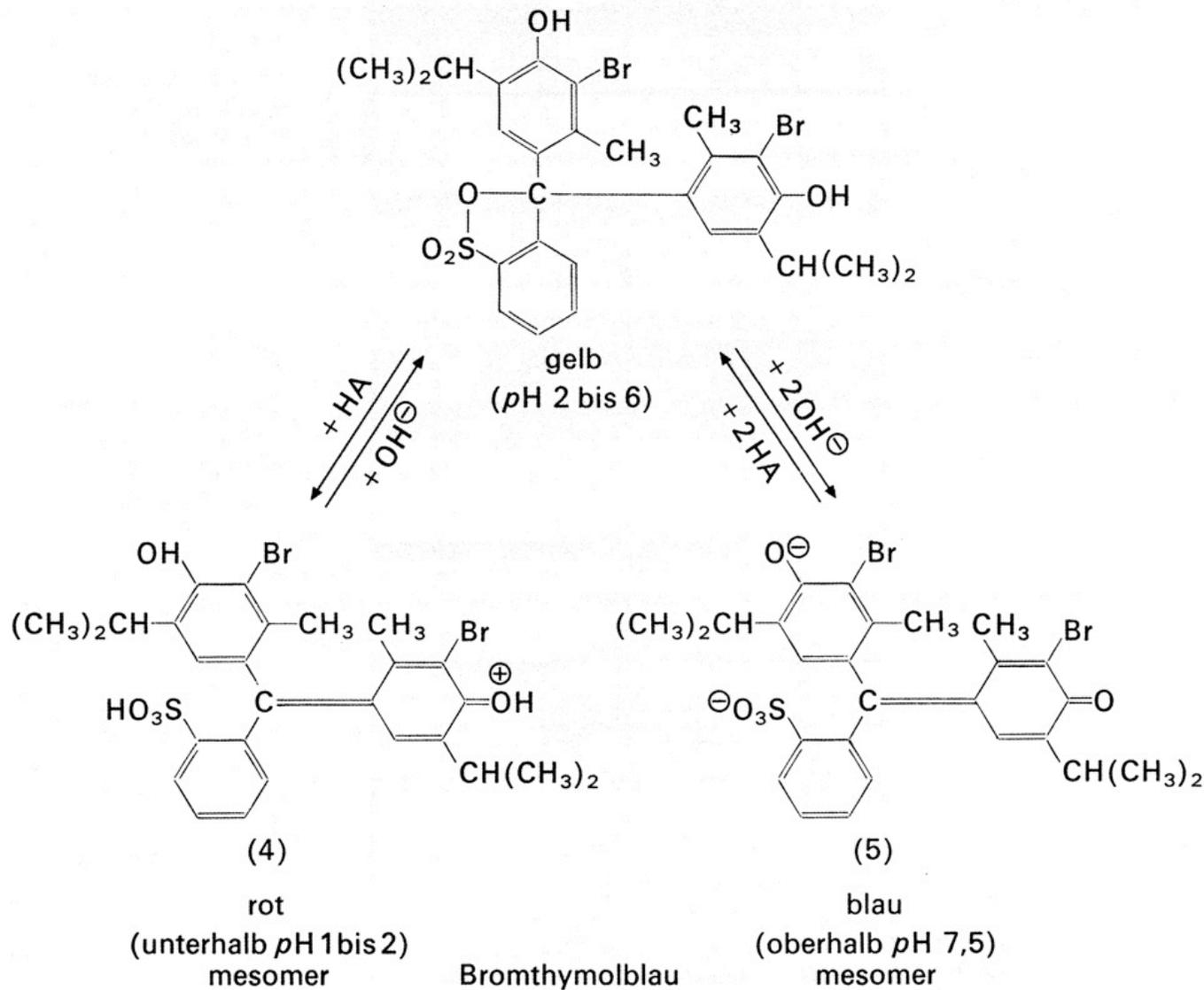
Effekt konjugierter Bindungen auf die $n \rightarrow \pi^*$ Übergänge nicht-bindender Elektronen des Keto-Sauerstoffs.

Elektronische Übergänge und Lage der Absorptionsbanden



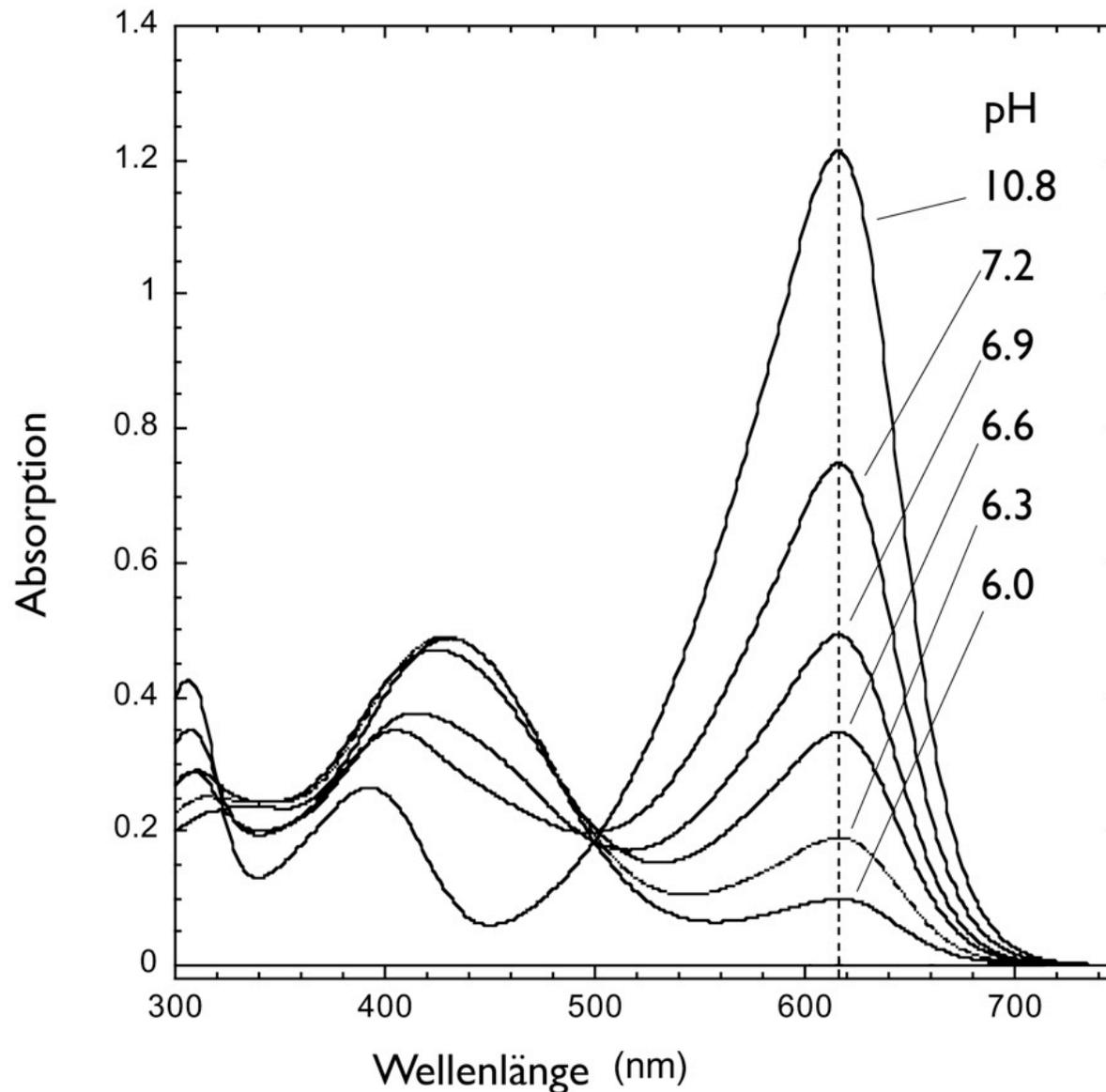
Regionen elektronischer Spektren und die Arten der auftretenden Übergänge

Die Verschiebungen der Absorptionsbanden infolge unterschiedlicher Ausdehnung von π -Elektronensystemen in protonierten und deprotonierten Farbstoffen nutzt man z.B. in pH-Indikatoren.



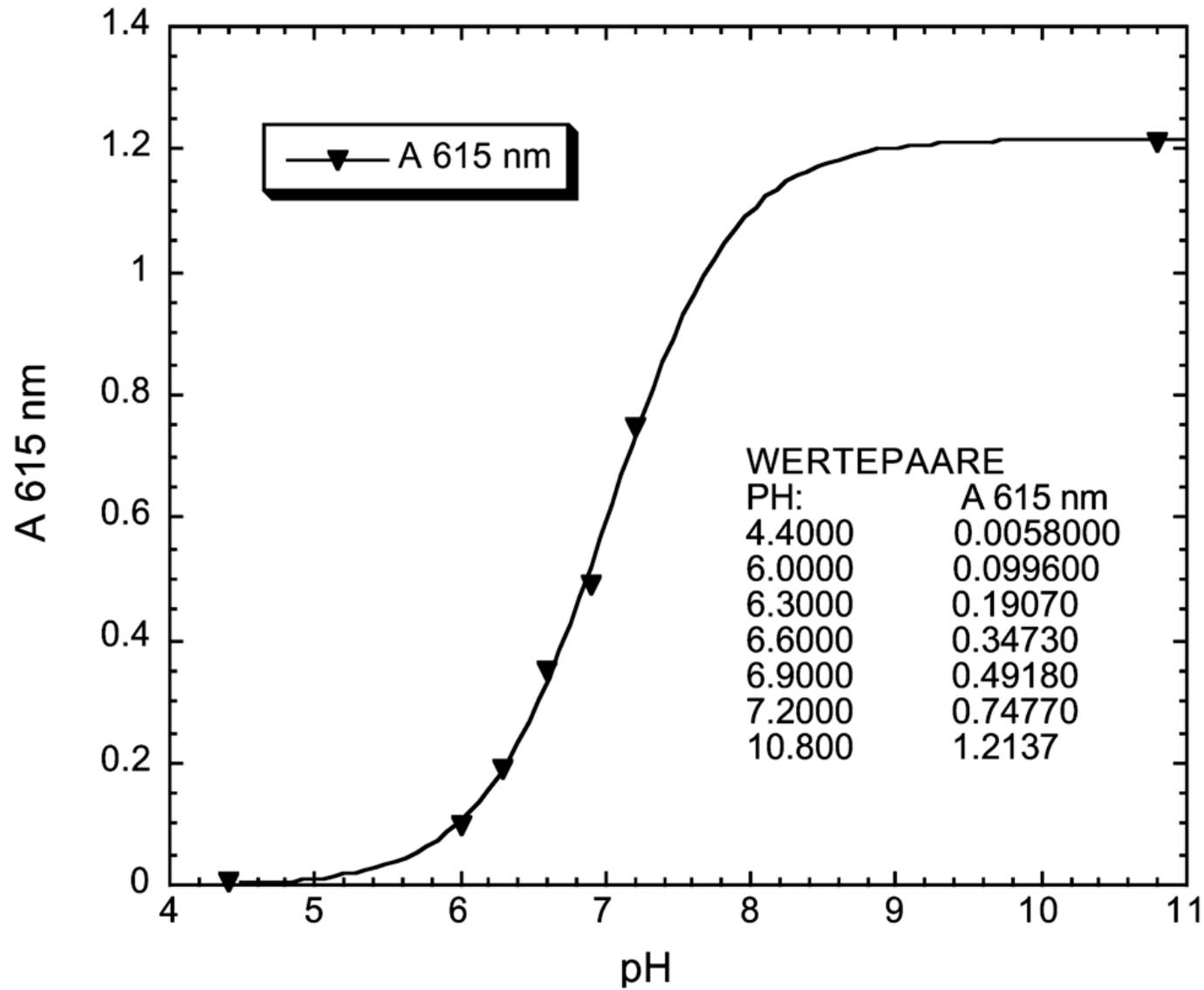
“Plot” der Absorptionsspektren von Bromthymolblau in Abhängigkeit vom pH

Bromthymolblau / pH

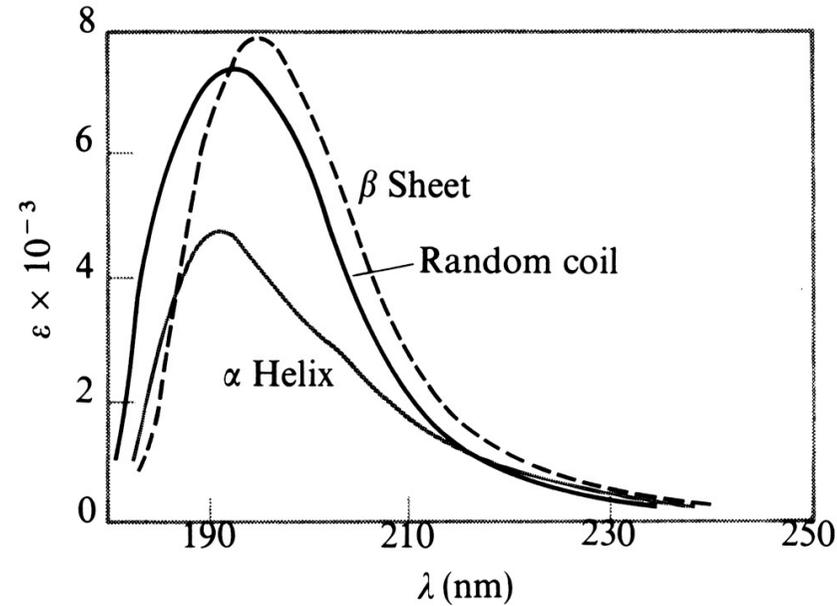


Die Absorption von BTB im gelben Bereich (615 nm) lässt den Farbstoff oberhalb von pH 7.5 blau erscheinen. Unterhalb von pH 7 absorbiert BTB im blauen Bereich. Der Farbstoff erscheint in der Komplementärfarbe gelb.

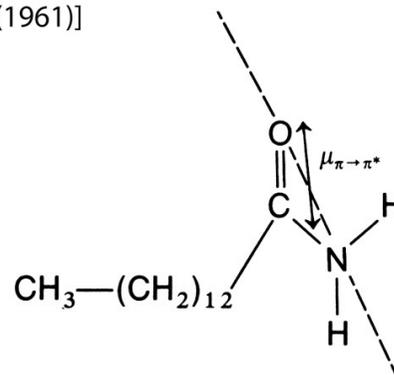
Plot Bromthymolblau, A615/pH



Die Form der Absorptionsbanden von Amidgruppen in Polypeptiden hängt von der Sekundärstruktur ab.

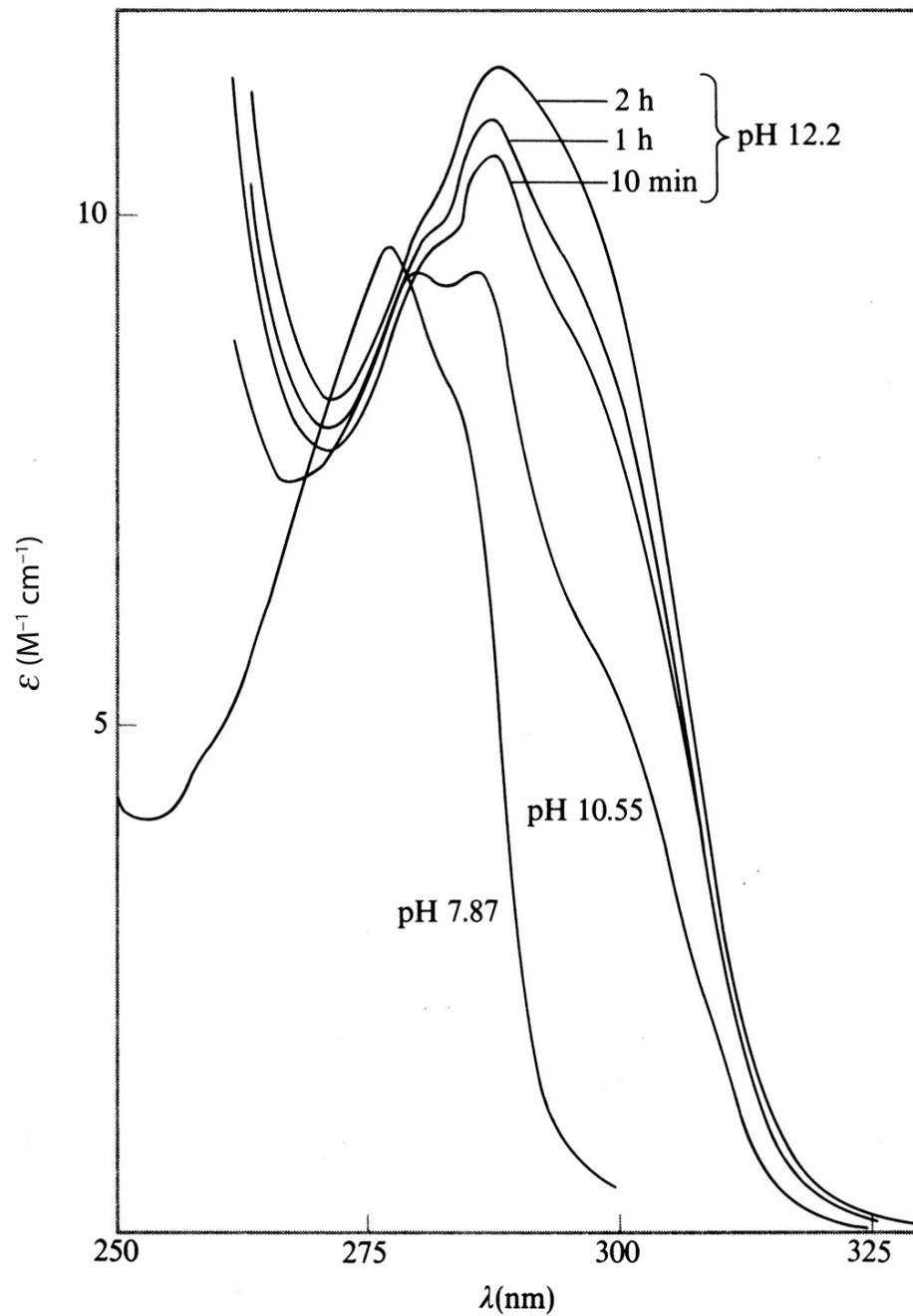


Ultraviolett Absorptionsspektrum von Poly-L-lysin in wässriger Lösung: Zufalls-Knäuel (random coil), pH 6.0, 25 °C; α -Helix, pH 10.8, 25 °C, β -Faltblatt, pH 10.8, 52 °C. [Nach Rosenbeck, K. and Doty, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47:1775 (1961)]



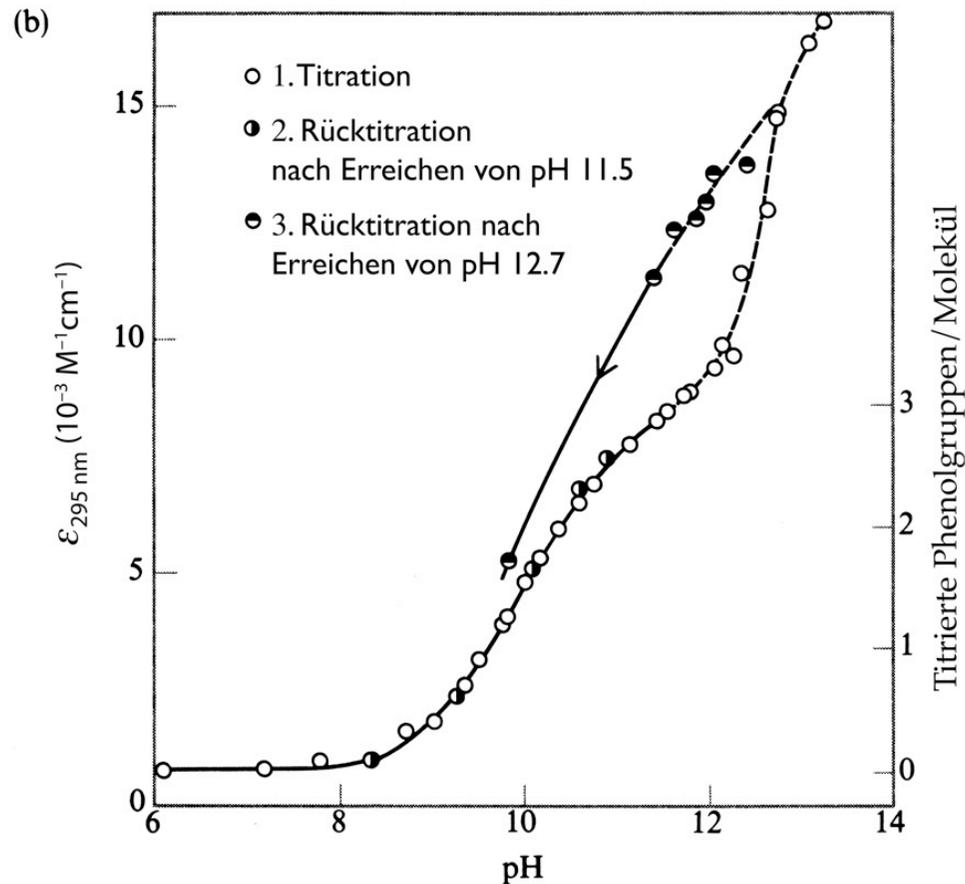
Richtung des Übergangsdipolmoments für den $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang in einem Amid.

Absorptionsbanden von Aminosäureresten in Proteinen reagieren sensitiv auf Veränderungen in der Umgebung dieser Reste

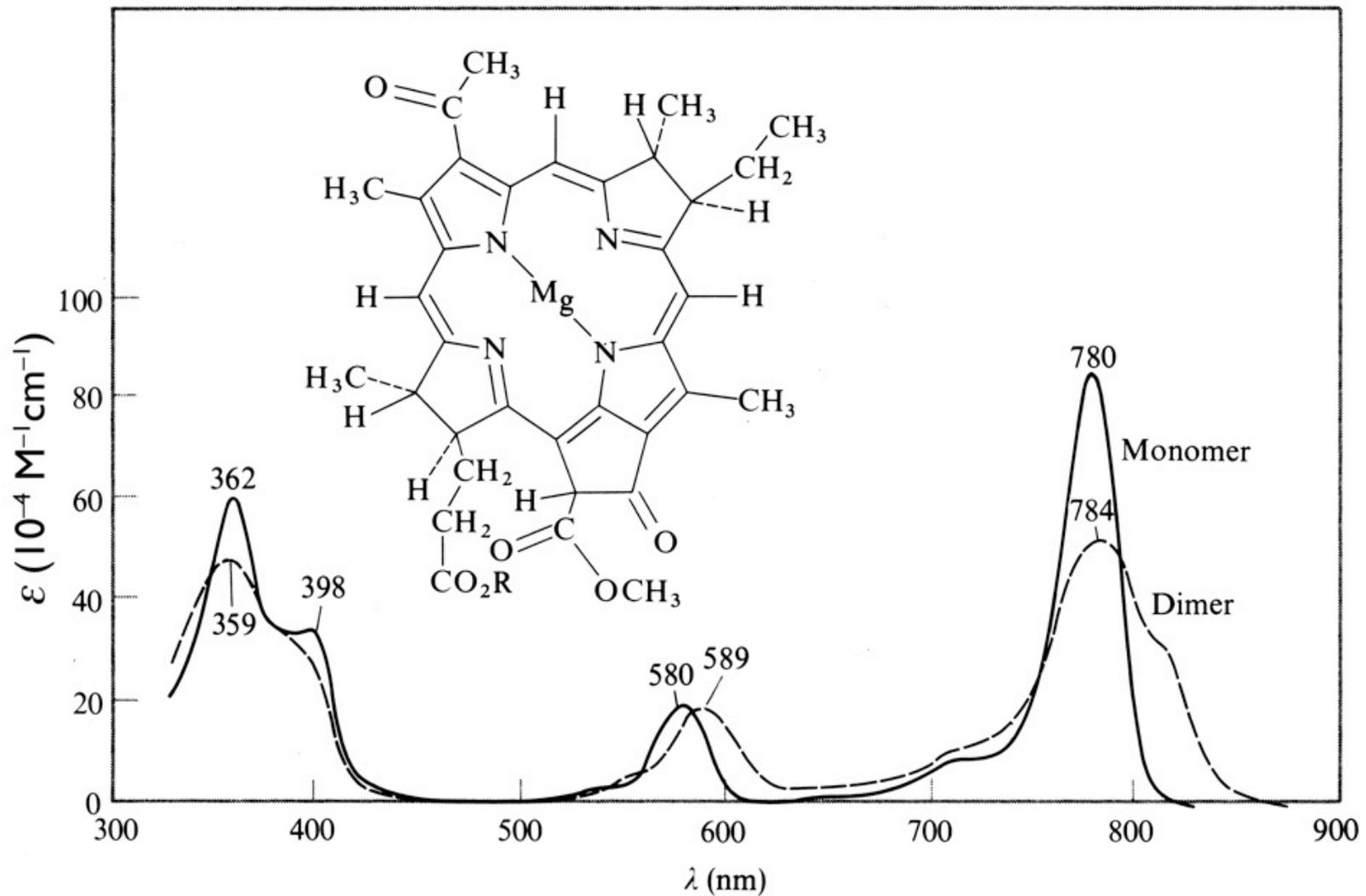


Spektrophotometrische Titration des Enzyms RNase aus Rinderpankreas. Das UV-Spektrum als Funktion des pH und bei pH 12 als Funktion der Zeit. Für die niedrigeren pH -Werte gibt es keine Zeitabhängigkeit.

pH-Titration von RNase: UV-Absorption ermöglicht es die Stabilität von Proteinen zu untersuchen.



Absorptionskoeffizient des Enzyms RNase bei 295 nm als eine Funktion des *pH*-Wertes. RNase enthält 6 Tyrosinreste. Drei dieser Tyrosinreste lassen sich bis zu ihrem pK_a nahe *pH* 10.2 reversibel titrieren (normal für isolierte Tyrosin-Reste). Die anderen drei Tyrosin-Reste titrieren nicht, bis höhere *pH*-Werte erreicht werden. Diese weitere Titration ist mit einer Denaturierung des Proteins verbunden. Man beobachtet Hysterese des Absorptionskoeffizienten bei der Rücktitration. (Nach Tanford, C., Hauenstein, J.D., and Rands, D.G., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 6409)



Spektren von Monomer- und Dimer-Lösungen des Bakteriochlorophyll. Eine ausgeprägte Aufspaltung der Bande größter Wellenlänge zeigt sich für das Dimer.
 Nach Sauer, K., Smith, J. R. L., and Schultz, A. J., *J. Am. Chem. Soc.* 88: 2681 (1966).

Absorptionsbanden von organischen Basen von DNA.

