

課題5 光吸収・発光と光化学反応

紫外・可視の光の持つエネルギーは電子状態変化に相当するエネルギー領域にあり、そのスペクトルはしばしば電子スペクトルと呼ばれる。本課題では種々の有機分子を対象として、紫外・可視領域の光を用いた光吸収・発光（蛍光）及び光化学反応に関わって、幅広く定性的なレベルでの実験を行う。

蛍光の実験はまず典型的な蛍光物質であるフルオレセインについて、蛍光スペクトルの特性を確認し、標準スペクトルと比較することで検出装置の感度の波長依存性を調べる。次いでアントラセンを用いて吸収・発光スペクトルの振動構造等について検討する。また生体関連物質に関わって、光合成色素における光吸収・発光現象に触れ、蛍光を用いたリボフラビン（ビラミン B₂）の定性試験にも挑戦する。

光化学反応としてはアントラセンの光二量化反応を取り上げ、アントラセンの反応性について、簡単なヒュッケル法による電子状態計算から考察を加える。

安全上の注意

* アントラセンの光二量化反応に使用する光源装置はジェルネイル用のもので、日焼けサロン等で用いられているものと同様、紫外部の 370 nm 付近に大きな強度を持つ。可視部にも発光強度を持つが、目に見えない強い光を発していることに注意し、裸眼で直視しないようにすること。

* 使用する LED は高輝度タイプなので、直接のぞき込んだりしないこと。紫外 LED については一見暗く見えても、強い紫外光を出している場合があるので特に注意すること。

予習課題

(1) 蛍光スペクトルの強度の表記において、式(2)の関係式が成立することを確認すること。仮に蛍光スペクトル強度が $F_e(\lambda)$ で表示され、次式で与えられていたとすると

$$F_e(\lambda) = \frac{1}{(\lambda - 500 \text{ nm})^2 + 1600 \text{ nm}^2} \text{ J nm}$$

$F_q(\tilde{\nu})$ 表示ではどのような式で表されることになるか？またスペクトル強度の最大値は何 cm^{-1} に現れることになるか？

(2) 発光ダイオード (LED, Light Emitting Diode) は、伝導帯の電子と価電子帯の正孔 (ホール) が結合する際に発生するエネルギーを光に変換する素子と言える。LED にかける電圧 (伝導帯と価電子帯のエネルギー差 (バンドギャップ) に相当する) が 2 V の場合、何 nm 程度の光が発生することになるか？また紫外部 350 nm 付近の光を出す LED には少なくとも何 V の電圧をかける必要があるか？

(3) 【余裕があれば】付録のアントラセンの電子状態に対する単純ヒュッケル (Hückel) 分子軌道法の問題を解いておこう。

1. 蛍光スペクトルの測定

1.1 エネルギーの単位

分子のエネルギーは、一般に光を用いて測定されていることから、光の真空中での波数 ($\tilde{\nu}$) を単位として用いることも多い (エネルギーの単位として用いられる場合、波数は媒質によらない扱いを受けることに注意)。波数と波長 λ は逆数関係にあり、振動数 ν との間には比例関係 $\nu = c\tilde{\nu}$ (c は真空中の光速) が成り立つ。したがって、光量子のエネルギー E と波数 $\tilde{\nu}$ の関係は、

$$E = h\nu = \hbar\omega = hc\tilde{\nu} = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

となる。ここで h はプランク定数 ($6.62607015 \times 10^{-34}$ J s) であり、 ω は角振動数 (角速度の大きさ) で \hbar は $h/2\pi$ (これをプランク定数とする流儀もある)。波数は一定長さに含まれる光の波の数に対応し、単位としては通常 cm^{-1} が用いられる。エネルギーの単位として用いる時には、 $hc \text{ cm}^{-1}$ とするのが正確であるが、単に cm^{-1} と表記することが多い。また電気的なエネルギーとの対応を見る場合には電子ボルト eV ($1 \text{ eV} = 1.602176634 \times 10^{-19}$ J) もよく用いられる (数値は新 SI の定義による)。

1.2 蛍光スペクトル

ある試料が光を吸収し、電子基底状態 (S_0) から励起状態 (S_1) へと遷移したとする (図 1)。この励起状態が失活するとき、そのエネルギーを光として放出したものが蛍光である。試料に励起光を照射すると、蛍光は四方八方に放射され、蛍光測定では通常、励起光と直角方向に放出される光を測定する。試料溶液が清澄であれば励起光の散乱光は弱く、光吸収・発光の効率の高い分子であれば蛍光による検出感度は非常に高く、しばしば生理活性物質など微量成分の検出・分析に利用される。この点、光吸収による測定は昼間の星を見るのにも似ていて検出感度は蛍光に及ばない。

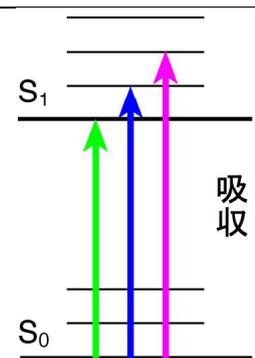
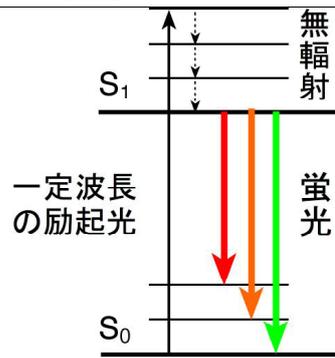
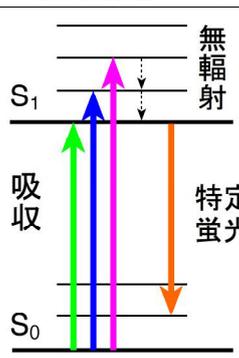
		吸収スペクトル	蛍光スペクトル	蛍光励起スペクトル
概念図				
入射光の波長		変化させる	一定波長に固定	変化させる
スペクトル	横軸	入射光の波長	蛍光の波長	入射光の波長
	縦軸	吸光度	蛍光強度	特定波長の蛍光強度

図 1. 吸収スペクトル、蛍光発光スペクトル、蛍光励起スペクトルの比較

試料に光を吸収させ電子励起状態に遷移させた時、一般に分子振動等も励起されるが、溶液などの凝縮相では周囲の分子との相互作用により、光を発せず速やかに緩和が生じる(無輻射遷移。10⁻¹²秒程度)。このためたいていの場合、始状態が第1励起状態(S₁)の最低振動準位にほぼ限定された形で発光し(Kasha則)、電子基底状態のいずれかの振動励起状態に達することになる。したがって励起波長を変えても、たいていの場合、蛍光スペクトルの形状には変化が現れないし、ある波長の蛍光強度を励起波長を変えながらモニターしたもの(蛍光励起スペクトル)は吸収スペクトルの形状と似たものとなる。また観測される蛍光スペクトルの形状には、電子励起状態ではなく電子基底状態の振動準位がもっぱら反映される。

ある分子が発光しても、周りの分子によってその光が吸収されてしまうことがしばしば起きる。特に励起された分子の発光が、基底状態の同種の分子によって吸収されることによって蛍光スペクトルの形状が変化することには注意が必要である。蛍光スペクトルに対する蛍光の再吸収の影響は、濃度を下げた測定を行うと明瞭になる。

1.3 蛍光スペクトルの表現と装置補正

蛍光スペクトルの強度 $F(\lambda)$ の表記には、いくつかの流儀がある。特に(a)波長 λ を用いるか、波数 $\tilde{\nu}$ (あるいは振動数) を用いるか、(b)エネルギー強度を用いるか(以下で添え字 e)、光量子数を用いるか(以下で添え字 q) に注意する。相互に次のような関係が成立する：

$$\lambda^3 F_e(\lambda) = \lambda^2 F_q(\lambda) = \lambda F_e(\tilde{\nu}) = F_q(\tilde{\nu}) \quad (2)$$

ここで例えば $F_e(\tilde{\nu})$ は波数に対するエネルギー強度分布を意味する。吸収スペクトルについては、一般に吸光度 A あるいは透過率 T が用いられ、たいていの場合(2)式のような相互変換を要しない。

ある物質 X の吸収スペクトルと蛍光スペクトルを対比する時、通常、吸収スペクトルについては吸光度を、蛍光スペクトルについては発光強度を取る。これは吸光度・蛍光強度が、ともに存在する X の物質に比例すると考えられるからである。たとえば蛍光スペクトルの励起スペクトル(ある波長での蛍光強度を一定に保つ励起光の波長と強度の関係。1.2 参照)は、たいていの場合、吸光度のスペクトルと一致する。

一般に光の検出器の感度・回折格子の分光特性等は波長に依存する。したがって測定結果からある程度定量的な議論をするには、前もって標準とされる物質の蛍光スペクトルを用いて装置の較正を行う必要がある。フルオレセインについては精密な測定によって、図2のような相対蛍光スペクトル $F_q(\lambda)$ を示すことが知られている*。フルオレセインの蛍光で直接較正できる範囲はおよそ 500 nm~650 nm である。

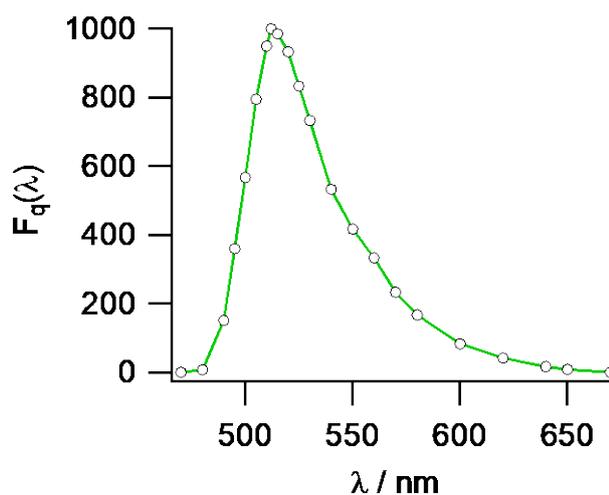


図2. フルオレセインの標準蛍光スペクトル。

* C. A. Heller, R. A. Henry, B. A. McLaughlin, and D. E. Bliss, J. Chem. Eng. Data 19, 214 (1974).

実験にあたっての注意点

- ✓ 分光器は精密な装置であるので、取り扱いに注意すること。
- ✓ 人間の目には映らなくても、多くの有機物は紫外部の光を強く吸収する。特に共用の溶媒の汚染には十分注意する。
- ✓ 溶液は必要な分量だけ作り、有機化合物を含む溶液は指針に従って処理する。

2. 吸収・蛍光スペクトルの測定

本課題では、種々の有機化合物溶液の吸収・発光スペクトルの測定を行う。試料として蛍光物質として著名なフルオレセイン (fluorescein。法定色素で黄色 201 号とも呼ばれ、入浴剤等にも使用される) とアントラセンとともに、身近な生体関連物質としてクロロフィルやリボフラビンを取り上げる。。

☆スペクトルの測定には CHEMUSB 4 分光光度計を用いる。CHEMUSB 4 は本来、光源と検出部が一体となった光吸収を測定するための装置であるが、その光検出部のみを使用し、励起光源を別途用意することで発光を測定することも可能である (ただし検出感度は蛍光測定専用の装置に比べると格段に落ちることは否めない)。

☆励起光源としてここでは主に LED を利用する。簡便な測定には市販のキーライトなどが利用できるが、さまざまな励起波長での実験を行う上では、種々の LED の素子を用意して電源 (ここでは USB からの給電を利用) と組み合わせて使用する必要がある。

2.1. 光源と電源

PC等に付いている USB ポートは信号の通信に使用されるが、携帯電話の充電に使用されるように、電源としても利用できる (電圧は 5 V で USB 2.0 では 500 mA まで給電できることになっている)。今回の実験では USB ポートを利用して、LED 等の発光を行わせる。

【LED 素子の接続】

- (1) LED には極性があるので、電極の+と-を正しくつなぐ。たいていの場合 LED から出ている端子の長い方が+ (アノード)。また砲弾型の LED では- (カソード) 側の方が真円から少し削った形にしてある。

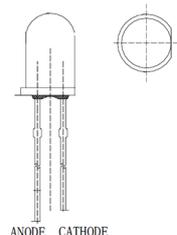


図 3. 砲弾型 LED 素子。

- (2) LED はバイアス電圧 (赤色 LED で 2 V、紫外 LED で 4 V 程度) を超えると急激に電気を通しやすくなる。今回の実験では過大な電流が流れるのを防ぐため LED に直列に 200 Ω程度の抵抗を入れる。

2.2. フルオレセインの吸収と発光

フルオレセインはおよそ pH 6~7 で電離して 2 価の陰イオンになり、強い蛍光を示すようになる。ここでは主に炭酸塩緩衝液 (pH 10) 中でのフルオレセインの光吸収・蛍光を測定し、蛍光の励起波長依存性を調べ、標準スペクトルと比較することで装置特性を調べる。

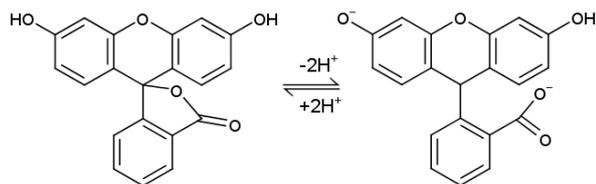


図 4. フルオレセインの電離平衡

- (1) CHEMUSB 4 分光光度計で分光光度計の光源のスペクトル強度を測り、656 nm 付近の鋭いピーク（光源に使用されている D2 ランプ中の重水素原子からの発光。水素原子の主量子数 $n = 3$ から $n = 2$ への遷移に相当する）の位置を確認する。ピーク位置が 656.1 nm から 2 nm 以上外れていたなら教員・TAに知らせる。
- (2) 光学セルにシリカゲルの懸濁液を入れ、SpectraSuite の Strobe/Lamp Enable のチェックを外し、CHEMUSB 4 分光光度計の光源を切って SpectraSuite を光強度測定モードにし、光学セルの上方から LED で光を照射し散乱光のスペクトルが取れることを確かめる。
- (3) 実験室の室内灯、青、赤、白の LED など用意されている数種の LED 素子を用いて光を照射し、シリカゲルの懸濁液を用いてそれぞれの光源のスペクトルを測定する（散乱強度の波長依存性は大きくないので、散乱光のスペクトルを励起光源のスペクトルと同一視する）。
- (4) 用意されている 1.0×10^{-3} mol/L フルオレセイン溶液を炭酸塩緩衝液で 50~100 倍程度に希釈して（可視部の吸収極大の吸光度が 0.5~1.5 程度に収まればよい）、CHEMUSB 4 分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定する。
- (5) 散乱光を測定した時と同様にして、種々の励起光源に対するフルオレセイン溶液の蛍光を測定する。
- (6) 測定に用いた溶液を 4 倍程度に希釈し蛍光スペクトルを測定する。

【検討】

- (1) 励起光を変化させて得られた蛍光スペクトルを比較し、吸収する光によらず蛍光スペクトルの形状が変化しないことを確認せよ。
- (2) 溶液の希釈前後の蛍光スペクトルを比較して、蛍光の再吸収の影響を検討せよ。
- (3) 得られた蛍光スペクトルを標準スペクトルと比較し、装置の感度の波長依存性を検討せよ。
- (4) pH 4 あるいは pH 7 の緩衝溶液中でのフルオレセインの吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定し、炭酸塩緩衝溶液中の結果と比較する。

2.3. アントラセンの光吸収と発光

アントラセンは吸収・発光スペクトルに明瞭な振動構造を示す。このアントラセンのスペクトルを解析し、ストークスシフトや吸収・発光スペクトルの振動構造についての理解を深める。

光吸収・発光と光化学反応

- (1) アントラセンの 1.0×10^{-4} mol/L 程度の酢酸エチル溶液を調製し*、適宜希釈して CHEMUSB 4 分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定する (UV 用のディスポセルを使用する。300~400 nm の吸収極大の吸光度が 0.5~1.5 程度に収まればよい。なお 260 nm 以下では溶媒の酢酸エチルの吸収が大きく測定は困難である)。
- (2) フルオレセインの場合と同様にして、紫外 LED (極大波長約 370 nm) を使用して蛍光を測定する。測定に用いた溶液を 4 倍程度に希釈して同様に蛍光を測定する。

【検討】

- (1) 溶液の希釈前後の蛍光スペクトルを比較して、再吸収の影響のない場合の蛍光スペクトルのピークの値を評価せよ。
- (2) 吸収・蛍光スペクトルの振動構造の間隔を求め、励起状態・基底状態で、光吸収・発光にもなって励起される振動モードの振動数を評価せよ。

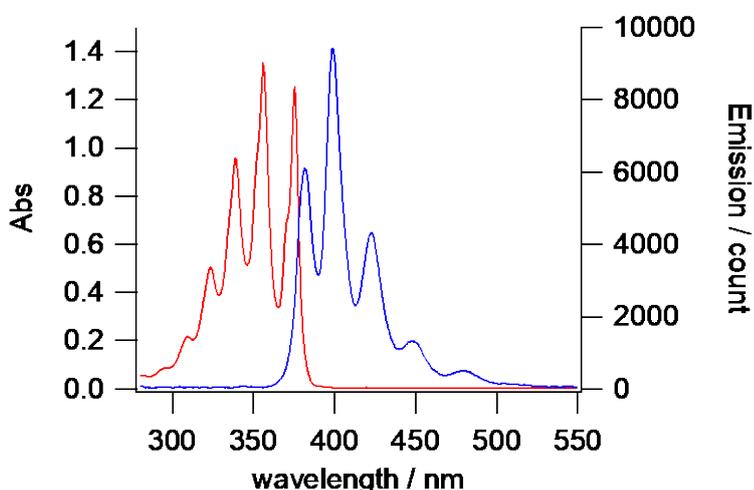


図 5. アントラセンの吸収スペクトルと蛍光スペクトル (370 nm 励起)。

2.4. クロロフィル・フィコシアニンの光吸収・発光

光合成には種々の色素が関与するが、中でもクロロフィル (油溶性) とフィコシアニン (水溶性タンパク質) はそのカギとなる色素であるといつてよい。ここでは市販のシアノバクテリアの乾燥粉末の酢酸エチルによる抽出物と pH 7 の緩衝液による抽出物について、それぞれの光吸収・発光挙動を調べる。酢酸エチル抽出液にはクロロフィルとカロチン等、水抽出液にはフィコシアニン等が含まれていると期待される。

- (1) 市販の「スピルリナ パウダー」を 0.03 g 程度ずつ 2 本のサンプル管にとり、1 本には pH 7 のリン酸緩衝液、もう一本には酢酸エチルを 2 mL 程度加えて混ぜ、得た水抽出液と酢酸エチル抽出液をろ過し、それぞれ吸収と発光の測定を行う。ろ液は 0.5 mL も取れば十分で、ろ紙が目詰まりしてろ過が進まなくなったらろ過を打ち切り、適宜ろ液を希釈して使用すればよい。
- (2) フルオレセインの場合同様、4 倍程度に希釈した状態でも測定を行う。励起光源としては用意してある LED と赤色レーザー (655 nm 程度) を利用する。

* 1 mg/mL 程度の溶液を調製し、その 0.1 mL 程度を希釈して 5 mL 程度にすればよい。溶液の汚染に十分注意すること。

光吸収・発光と光化学反応

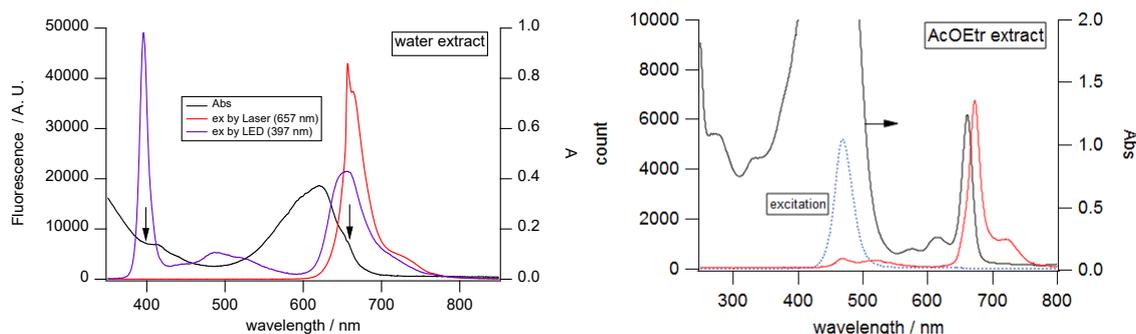


図 6. スピルリナの水抽出液 (左) と酢酸エチル抽出液 (右) の光吸収と蛍光スペクトル。

2.5. リボフラビンの定性試験

水溶性ビタミンのリボフラビン (ビラミン B₂) はアルカリ性で容易に光分解して油溶性のルミフラビンになる。このことを利用してリボフラビンを定量する手法が食品分析で使用されている。ここでは公定法を簡略化して、栄養ドリンク中のリボフラビンの定性試験を行う。

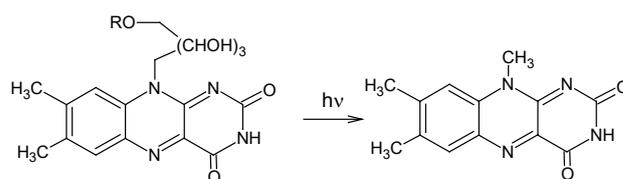


図 7. リボフラビンの光分解によるルミフラビンの生成。

- (1) 栄養ドリンクをリボフラビン濃度が 1 mg/100 mL 程度になるように適宜希釈して試料溶液を調製する。
- (2) CHEMUSB 4 分光光度計を用いて試料溶液の吸収スペクトルを測り、フルオレセインの場合と同様にして、青色 LED を用いて発光スペクトルを取る。
- (3) 試料溶液を 5 mL 取り、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 3 mL を加える。
- (4) (3)の溶液を 2 本のサンプル管に等量取り、一方は遮光し、もう一方は蛍光灯の近くにおいて 1 時間程度光を照射する。
- (5) それぞれのサンプル管の内容物を 2 本の遠沈管に取り、酢酸 0.3 mL を加えて中和し、それぞれにクロロホルムを 5 mL 加えてよく振り混ぜる。
- (6) 水層を除き硫酸ナトリウム約 2 g 加えて脱水する。
- (7) それぞれのクロロホルム層の吸収・発光スペクトルを測定する。

【検討】

- (1) 光吸収と蛍光を用いた検出法の感度と得失を検討せよ。
- (2) ここで得た蛍光スペクトルと、前の課題のフィコシアニンの蛍光スペクトルとの類似性を検討せよ。

3. アントラセンの二量化反応

アントラセンの光二量化反応は古くからよく知られた光化学反応である。ここではアントラセンの光二量化反応の生成物、およびその熱分解生成物を合成し、それぞれの吸収スペクトルを測定し、アントラセンの光二量化反応について検討する。

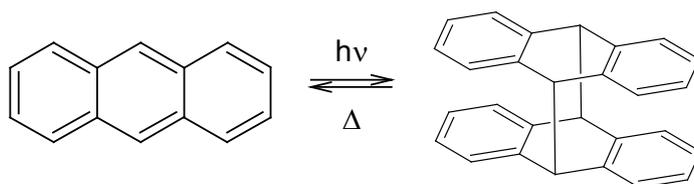


図8. アントラセンの光二量化

- (1) サンプル管にアントラセン 0.05 g 程度を取り、トルエン 5 mL を加えて溶かす（ヒートガンで加温あるいは超音波洗浄機を用いてもよい）。
- (2) ジェルネイル用紫外線照射装置に入れる。
- (3) 30 分～1 時間程度紫外線照射を行うとジアントラセンの結晶が得られるので分取する。
- (4) ジアントラセンをサンプル管に入れ、少量のトルエンにヒートガンで加熱しながら溶かした後冷却、再結晶して精製する（量が少ないときは再結晶操作を省略してもよい）。
- (5) 得られたジアントラセンの約半量を、外径 16.5 mm のサンプル管に入れ、370 nm の励起光に対する蛍光の挙動を調べる。
- (6) ホットプレート上で、加熱用のアルミブロックにサンプル管を入れ、400 nm 程度の波長のブラックライトを当てながら、温度を 300 °C 程度まで上げて様子を観察し、分解が終わったら電源を切り放冷する。
- (7) ジアントラセン、および(6)のジアントラセンの加熱生成物の 0.02 mg/mL 程度のトルエン溶液を調製し、ガラス製の光学セルを用いて紫外吸収スペクトルを測定する（300 nm 以下の領域はガラスセルの吸収があるので測れない）*。

【検討】

- (1) ヒュッケル法による電子状態計算の結果から、光二量化反応の生成物についてどのような説明が可能か考えてみよ。

注意:ジェルネイル用の紫外光源は、TLC のモニター用のブラックライトとちがって、人体に有害とされる 315 nm 以下の UVB、UVC 領域の光はほとんど出さない。しかし図 9 に示すように 400 nm 以下の紫外線を、可視部よりはるかに強い強度で放射している。一見光が弱いように見えても、直視したりしないように注意する。

* 2.3 で使用したアントラセンの 1.0×10^{-4} mol/L 溶液と同様に調製すればよい。なおジアントラセンでは 300 nm 以上の領域に吸収がみられないことに注意する。

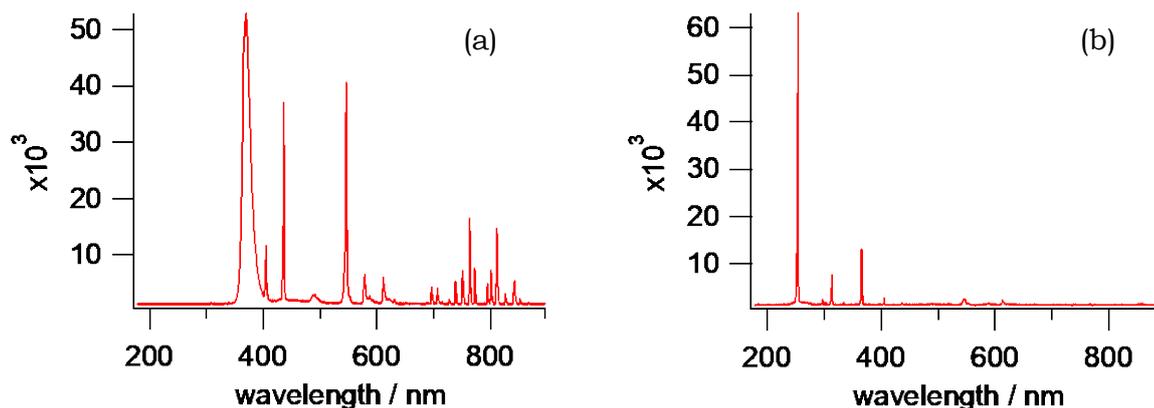


図9. ジェルネイル用紫外線照射装置(a)と TLC のモニター用のブラックライト(b)の発光スペクトル。

[付録] 単純ヒュッケル (Hückel) 分子軌道法によるアントラセンの取り扱い

アントラセン分子の π 電子の状態が、関連する 14 個の炭素原子の $2p$ 軌道の線形結合で与えられる分子軌道 Ψ_i で表されるとする。

$$\Psi_i = \sum c_i |i\rangle$$

分子軌道 Ψ_i は π 電子に対する有効ハミルトニアンを H とすると、

$$H\phi_i = E_i\phi_i$$

与えられるエネルギー固有値 E_i に属する固有ベクトル (これを以下単に分子軌道と呼ぶ) ϕ_i の線形結合で表され、14 個の π 電子はエネルギー固有値の小さい順に、分子軌道に入っていくものと考えられる。ヒュッケル法 (重なり積分を無視し、隣接する炭素原子以外の共鳴積分を無視) で与えられるアントラセンの分子軌道は表 A-1 のようになる。

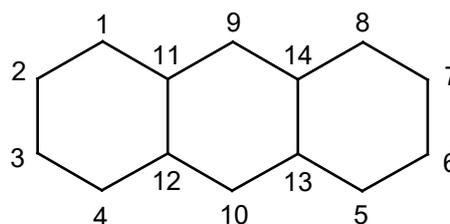


表 A-1. ヒュッケル法に求められるアントラセンの分子軌道のエネルギー準位と原子軌道の係数。 E^* は $(E - \alpha)/\beta$ 。 α はクーロン積分 $\langle m|H|m\rangle$ 、 β は共鳴積分 $\langle n|H|m\rangle$ (n と m は隣接する炭素原子の p 軌道)。縮退したレベルの係数の与え方には任意性があり、他の文献のものとは必ずしも一致しないことに注意。

E_i^*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
-2.414	0.21	-0.15	0.15	-0.21	-0.21	0.15	-0.15	0.21	0.30	-0.30	-0.37	0.37	0.37	-0.37
-2.000	0.29	-0.29	0.29	-0.29	0.29	-0.29	0.29	-0.29	0.00	0.00	-0.29	0.29	-0.29	0.29
-1.414	0.28	-0.12	-0.12	0.28	0.28	-0.12	-0.12	0.28	0.40	0.40	-0.28	-0.28	-0.28	-0.28
-1.414	0.17	-0.41	0.41	-0.17	-0.17	0.41	-0.41	0.17	-0.24	0.24	0.17	-0.17	-0.17	0.17

光吸収・発光と光化学反応

-1.000	0.41	-0.20	-0.20	0.41	-0.41	0.20	0.20	-0.41	0.00	0.00	-0.20	-0.20	0.20	0.20
-1.000	0.00	-0.35	0.35	0.00	0.00	-0.35	0.35	0.00	0.00	0.00	0.35	-0.35	0.35	-0.35
-0.414	0.31	-0.22	-0.22	0.31	0.31	-0.22	-0.22	0.31	-0.44	-0.44	0.09	0.09	0.09	0.09
0.414	0.31	0.22	-0.22	-0.31	-0.31	-0.22	0.22	0.31	-0.44	0.44	-0.09	0.09	0.09	-0.09
1.000	0.00	0.35	0.35	0.00	0.00	-0.35	-0.35	0.00	0.00	0.00	-0.35	-0.35	0.35	0.35
1.000	0.41	0.20	-0.20	-0.41	0.41	0.20	-0.20	-0.41	0.00	0.00	0.20	-0.20	0.20	-0.20
1.414	0.17	0.41	0.41	0.17	0.17	0.41	0.41	0.17	-0.24	-0.24	-0.17	-0.17	-0.17	-0.17
1.414	0.28	0.12	-0.12	-0.28	-0.28	-0.12	0.12	0.28	0.40	-0.40	0.28	-0.28	-0.28	0.28
2.000	0.29	0.29	0.29	0.29	-0.29	-0.29	-0.29	-0.29	0.00	0.00	0.29	0.29	-0.29	-0.29
2.414	0.21	0.15	0.15	0.21	0.21	0.15	0.15	0.21	0.30	0.30	0.37	0.37	0.37	0.37

問 1. アントラセンの各炭素原子を(1, 4, 5, 8), (2, 3, 6, 7), (9, 10), (11, 12, 13, 14)とグループ分けすると、計算される分子軌道の係数の大きさ $|c_i|$ が等しいことを確認せよ。

問 2. アントラセンの属する点群を D_2 とした時、各原子軌道は規約表現で分類すると $3A_1 + 4B_1 + 3B_2 + 4B_3$ と表され、指標表を用いて対称化軌道として次のような分子軌道を構成することができる。

	A_1	B_1	B_2	B_3
σ_1	$([1] - [4] + [5] - [8])/2$	$([1] + [4] + [5] + [8])/2$	$([1] + [4] - [5] - [8])/2$	$([1] - [4] - [5] + [8])/2$
σ_2	$([2] - [3] + [6] - [7])/2$	$([2] + [3] + [6] + [7])/2$	$([2] + [3] - [6] - [7])/2$	$([2] - [3] - [6] + [7])/2$
σ_3	$([11] - [12] + [13] - [14])/2$	$([9] + [10])/2^{1/2}$	$([11] + [12] - [13] - [14])/2$	$([9] - [10])/2^{1/2}$
σ_4		$([11] + [12] + [13] + [14])/2$		$([11] - [12] - [13] + [14])/2$

異なる規約表現に属する分子軌道 Ψ_a と Ψ_b について $\langle \Psi_a | \Psi_b \rangle$ 、 $\langle \Psi_a | H | \Psi_b \rangle$ が 0 になることを確認せよ。また A_1 の対称性に属する対称化分子軌道を用いて永年方程式を構成し、エネルギー固有値を計算せよ。余裕があれば、他の対称性に属する対称化分子軌道についてもエネルギー固有値を計算してみよ。