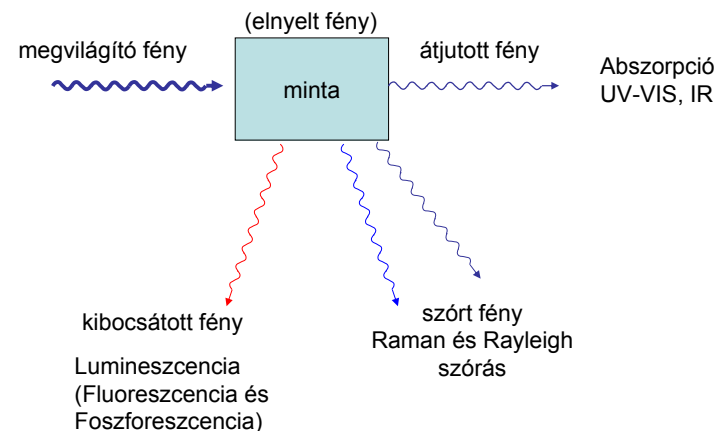


# Optikai spektroszkópai módszerek

Smeller László

## Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

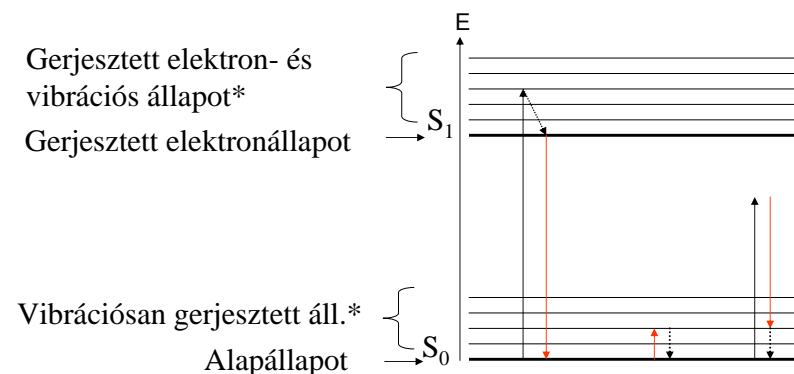


## Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

- Az átjutott vagy kibocsátott fény  
analizálása a hullámhossz függvényében.
- Információ:
  - atomok, molekulák azonosítása,
  - molekuláris szintű szerkezetváltozások  
(konformációváltozások) detektálása,
  - koncentráció meghatározás

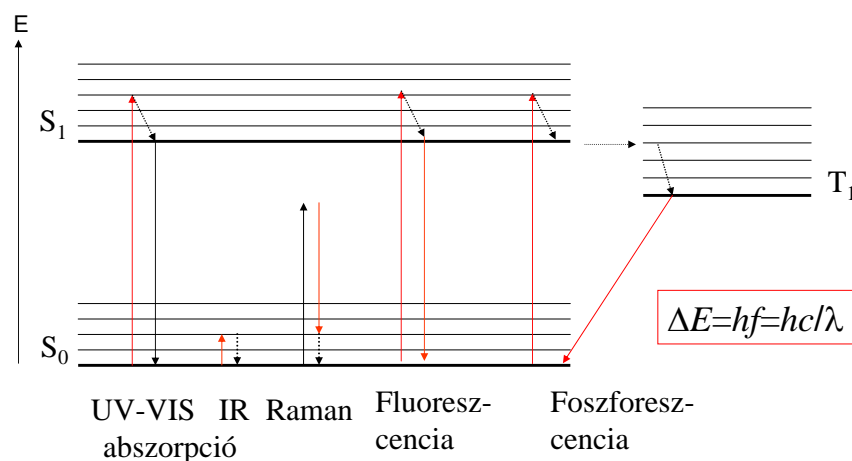
## Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- Energiaátmenet: ld. Jablonski diagram



\*csak molekuláknál!

## Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?



## Abszorpciós spektroszkópia (UV-VIS)

Ismétlésül:

- abszorpciós tv:  $J = J_0 \cdot e^{-\mu x}$  ahol  $\mu(\text{anyag}, c, \lambda)$
- Lambert-Beer törvény: 
$$A = \lg \frac{J_0}{J} = \varepsilon(\lambda) c x$$
- spektrum:  $A(\lambda)$
- mérés: spektrofotométer (felépítése ld. gyakorlat) referencia oldat ( $J_0$ )
- információ: azonosítás, koncentráció.

## Infravörös spektroszkópia

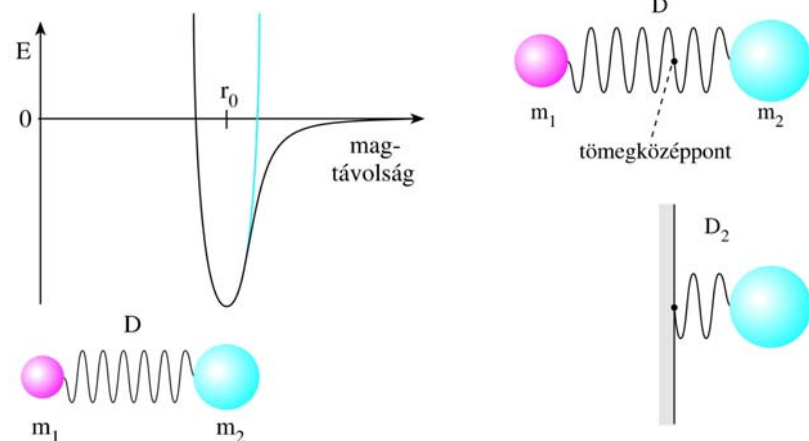
- Infravörös fény:  $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$   
közép infra tartomány:  $2,5\text{-}50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer

## Molekularezgések

Az elektronok könnyűek, gyorsan követik az atommag mozgását, ezért az atommagok rezgéseit az elektronok nem befolyásolják.

A klasszikus fizikai leírásban az atommagok közti kötést, egy rugóval vesszük figyelembe.

# Molekularezgések: kétatomos molekula



a középiskolából ismert:

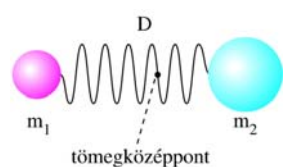
$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

$$\frac{m_2}{m_1} = \frac{\ell_1}{\ell_2}$$

$$\begin{aligned} \frac{D_2}{D} &= \frac{F/D}{F/D_2} = \frac{\Delta\ell}{\Delta\ell_2} = \frac{\ell}{\ell_2} = \\ &= \frac{\ell_1 + \ell_2}{\ell_2} = \frac{\ell_1}{\ell_2} + 1 = \frac{m_2}{m_1} + 1 = \frac{m_1 + m_2}{m_1} \end{aligned}$$

$F = D\Delta\ell$

tehát:  $\frac{m_1 + m_2}{m_1} = \frac{D_2}{D}$ , amit az  $f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$



egyenletbe helyettesítve a rezgési frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

az  $m_{\text{redukált}} = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$  mennyiséget redukált

tömegnek is nevezik, ezzel a frekvencia:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

A hullámhossz:

$$\lambda = \frac{c}{f} = 2\pi c \sqrt{\frac{m_{\text{redukált}}}{D}}$$

Az infravörös spektroszkópiában a  $\lambda$  reciprokát, a hullámszámot ( $\nu$ ) használják:

$\nu$ : hány hullám fér el egységnyi hosszúságon? [ $\text{cm}^{-1}$ ]

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

Példa: CO

A mért rezgési hullámszám:  $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

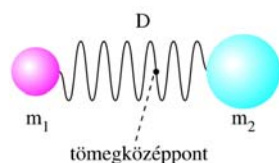
$$\begin{aligned} \Rightarrow \lambda &= 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz} \\ m_{\text{C}} &= 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_{\text{O}} = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \end{aligned} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha  $\nu$  ismert,  $D$  számolható

ha  $D$  ismert,  $\nu$  számolható

## Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

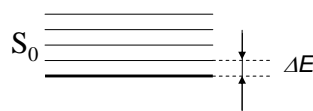
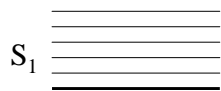
### Klasszikus kép



$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D}{m_{\text{redukált}}}}$$

rezonancia az  $f$  frekvenciájú fénnel

### Energianívók



$$\Delta E = hf$$

u.a.!!!

## A rezgési frekvencia függése a tömegtől és a kötéserősségtől

### Tömeg:

#### Infravörös rezgési frekvenciák (cm<sup>-1</sup>)

B-H 2400	C-H 3000	N-H 3400	O-H 3600	F-H 4000
Al-H 1750	Si-H 2150	P-H 2350	S-H 2570	Cl-H 2890
	Ge-H 2070	As-H 2150	Se-H 2300	Br-H 2650

Víz (O-H): 3600 => nehézvíz: 2600 cm<sup>-1</sup>

### Kötéserősség:

C-N: 1100 cm<sup>-1</sup>,  
C=N: 1660 cm<sup>-1</sup>,  
C≡N: 2220 cm<sup>-1</sup>.

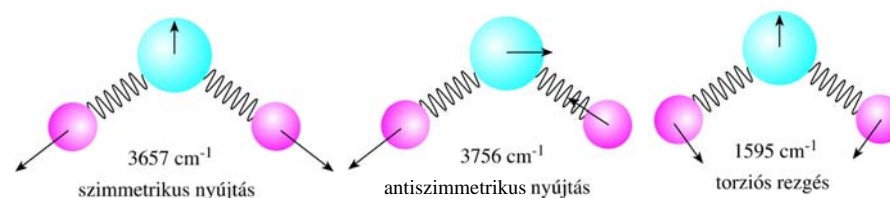
## Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

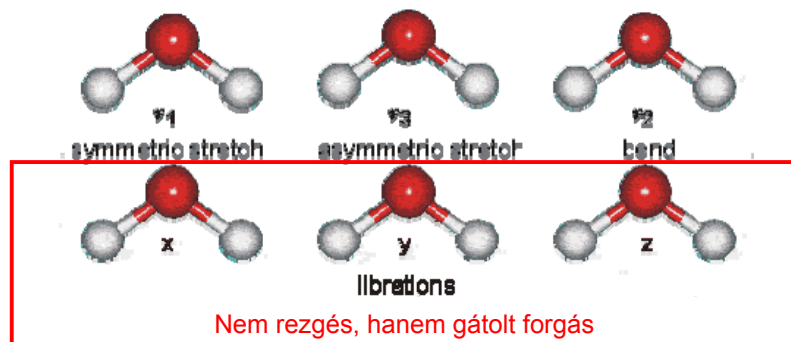
- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések

## Normálrezgések

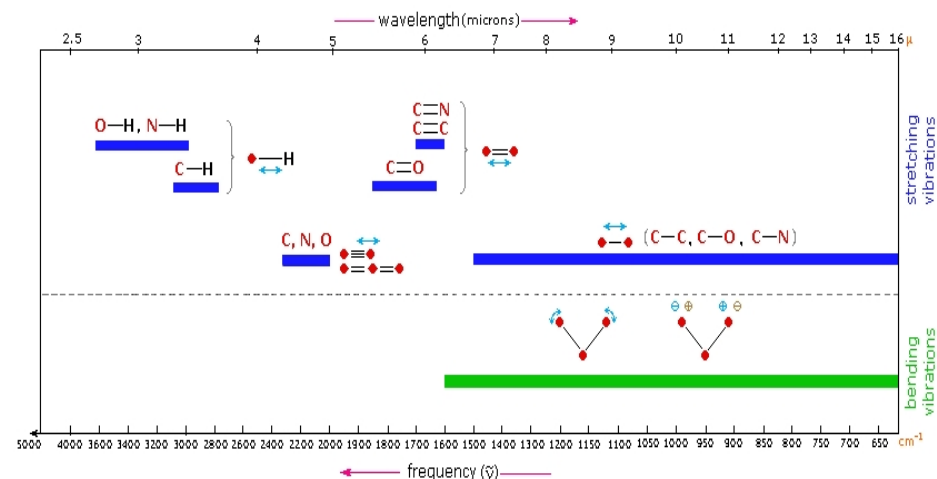
- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:



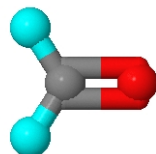
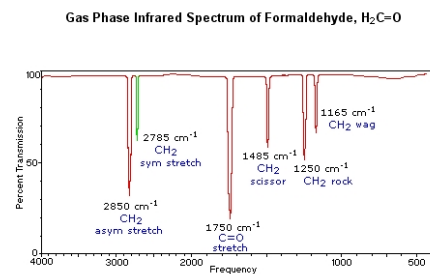
# A víz normálrezgései



# Néhány tipikus rezgési frekvencia



## Példa: Formaldehid



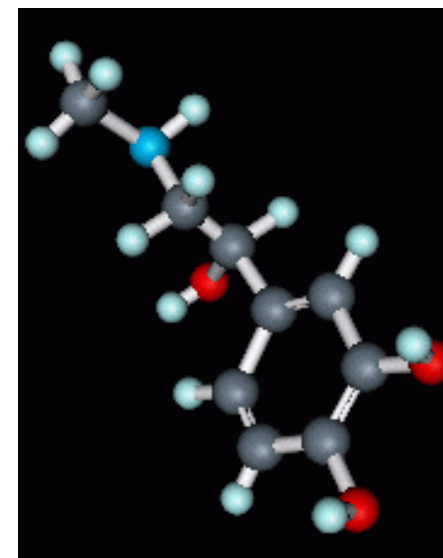
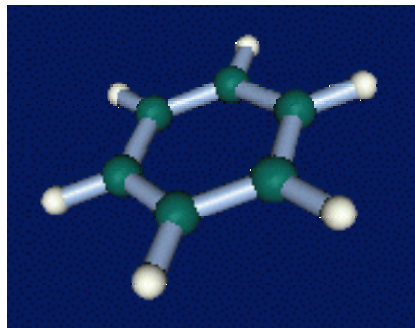
- ☐ View CH<sub>2</sub> Asymmetric Stretch
- ☐ View CH<sub>2</sub> Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH<sub>2</sub> Scissoring
- ☐ View CH<sub>2</sub> Rocking
- ☐ View CH<sub>2</sub> Wagging

- ☐ Ball&Stick Model
- ☐ Spacefill Model
- ☐ Stick Model
- ☐ Motion Off

## Flavin



## Benzol

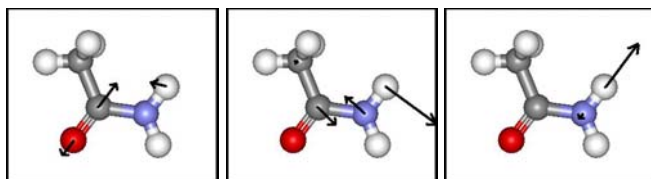
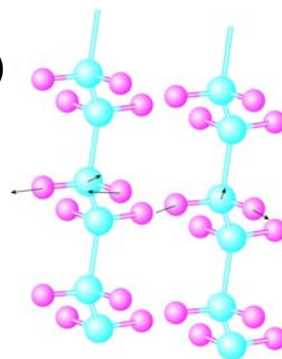


## Makromolekulák rezgései

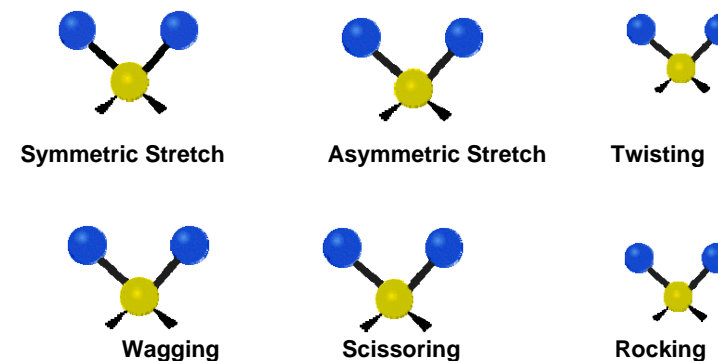
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

- CH<sub>2</sub> rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)

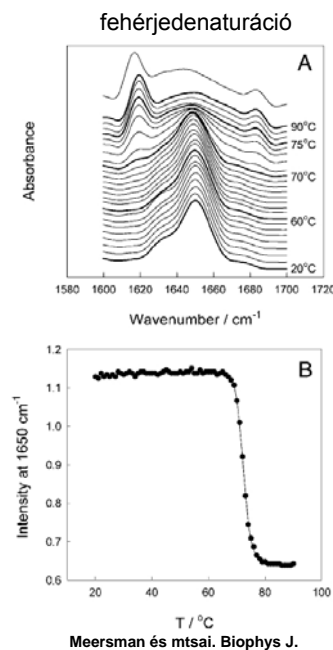
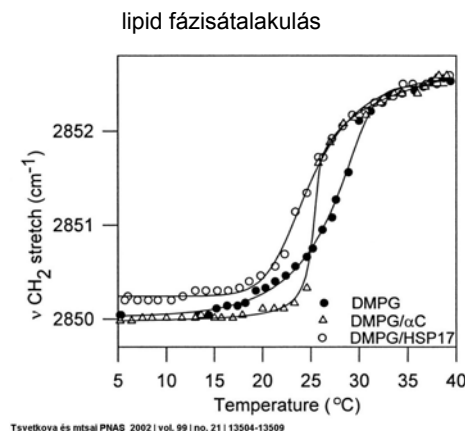


## Lipidek



Types of Vibrational Modes. Figure from Wikipedia

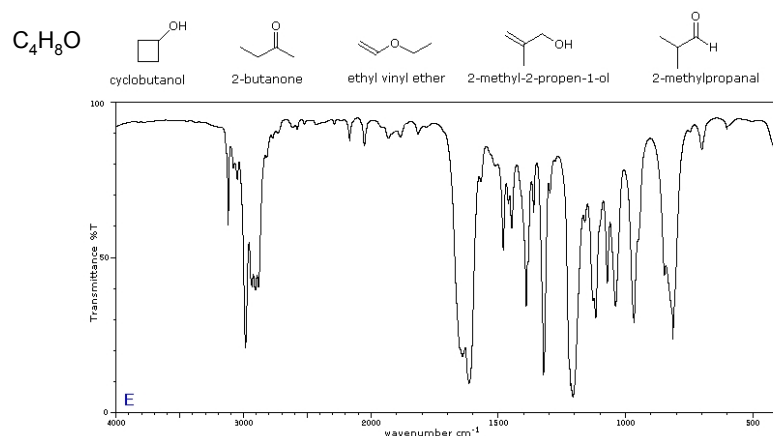
## Alkalmazások



## Gyógyszerészeti alkalmazások

- szintézis: közti és végtermék azonosítás
  - szerkezet bizonyítás
  - metabolit kimutatás
  - gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
- 
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

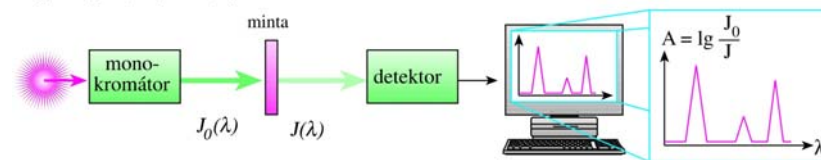
## Gyógyszerészeti alkalmazás: molekula azonosítás



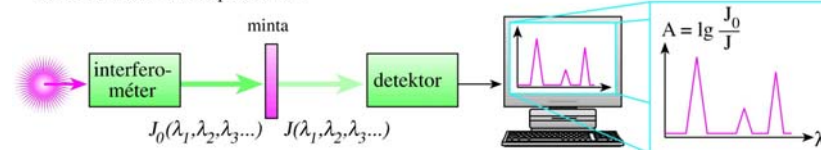
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

## A spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer (FTIR)

hagyományos (diszperziós) spektrométer

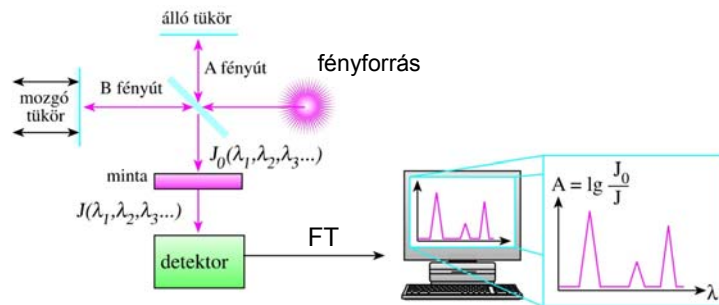


Fourier transzformációs spektrométer



tk 6.17 ábra

## Speciális IR módszerek: 1. IR Mikroszkópia



tk 6.18 ábra

## A komponensek térbeli eloszlása

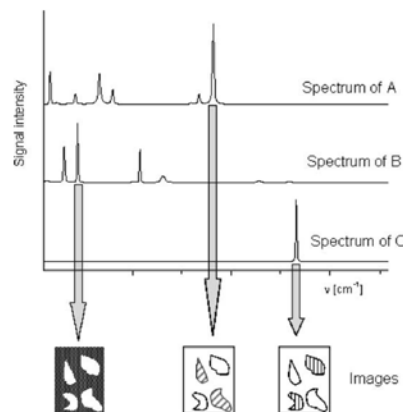
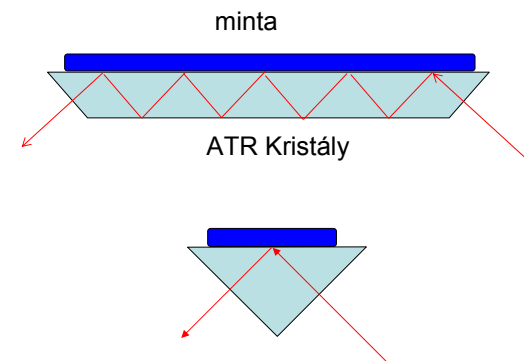


Fig. 6. The principle of vibrational spectroscopic imaging.

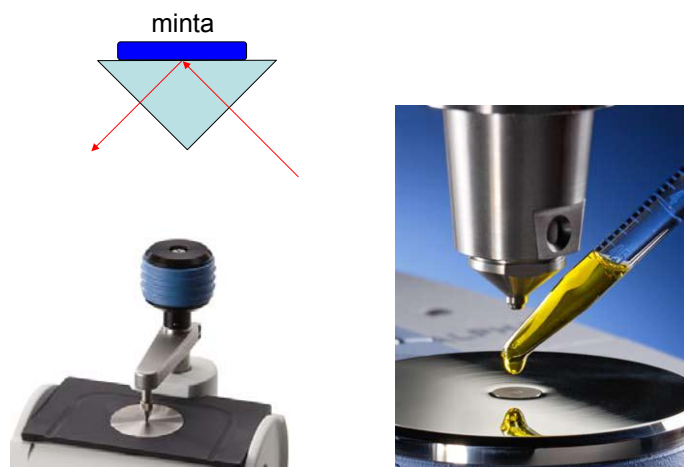
## Speciális IR módszerek: 2. ATR technika (Attenuated Totalreflexion)



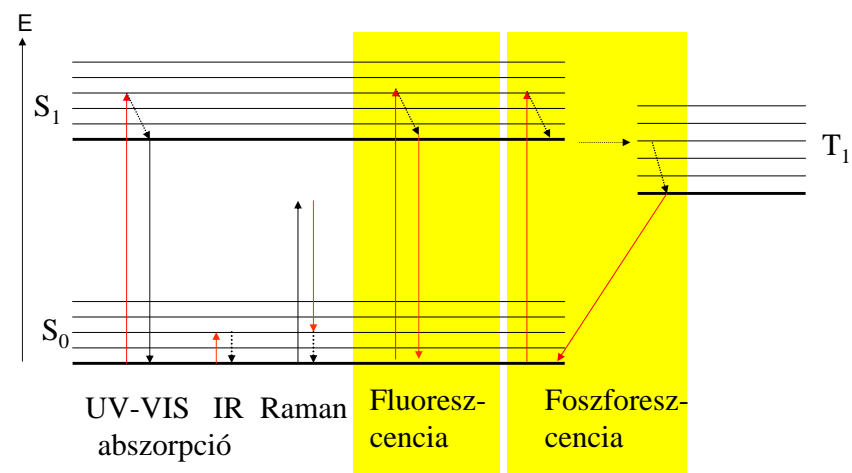


## ATR technika

Nagyon egyszerű minta-előkészítés



## Lumineszcencia spektroszkópia



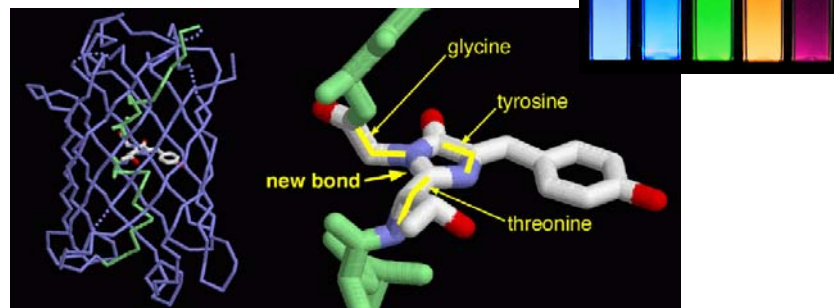
## Milyen molekulák fluoreszkálnak?

Aminosavak (triptofán, tirozin, fenilalanin)

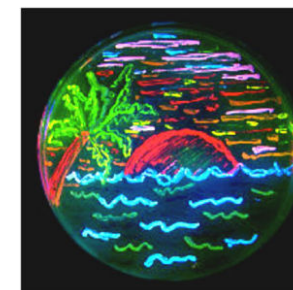
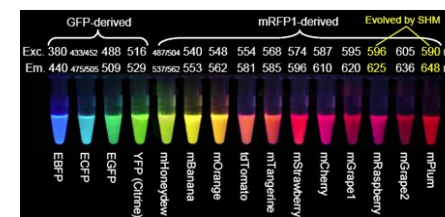
Fluoreszcens festékek

GFP

...



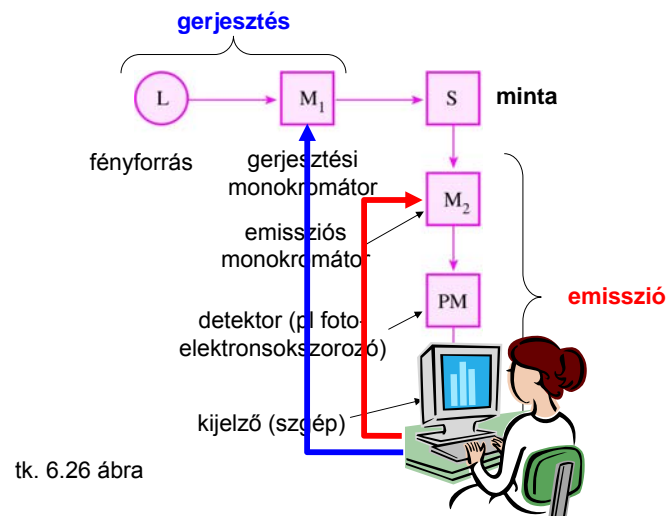
Aequorea victoria



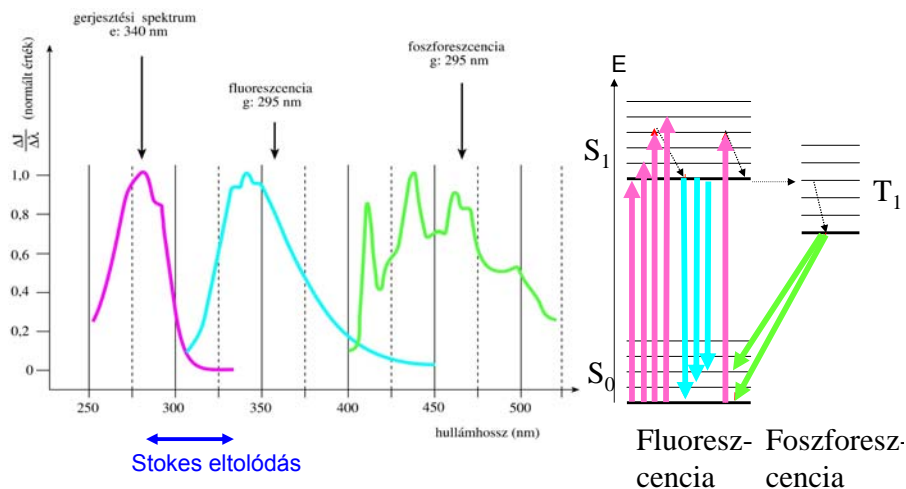
## Mérhető mennyiségek

- a gerjesztő fény hullámhossza
- az emittált fény hullámhossza (fluor., foszf)
- az emittált fény időbeli eloszlása
- az emittált fény polarizációja
- az emittált fény intenzitása

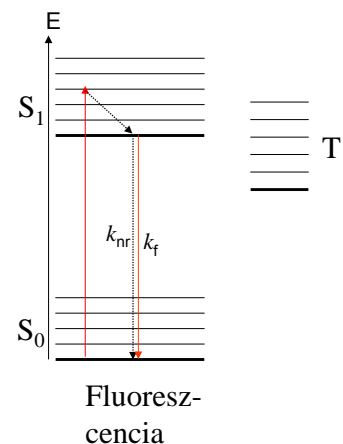
## A lumineszcens spektrométer felépítése



## Gerjesztési, és emissziós spektrumok



## A fluoreszcencia kvantumhatásfok (Q)



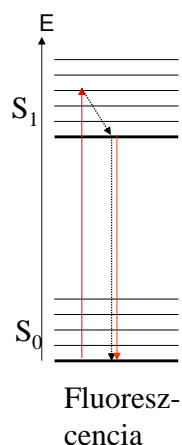
Kvantumhatásfok  $Q =$   
 $= \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}}$

$$Q_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}}$$

$k_f$  fluoreszcens átmenet valószínűsége  
 $k_{nr}$  nem sugárzásos atm. vsz.

festékek, fl. jelzők  $Q \approx 1$

## A gerjesztett állapot élettartama



$N$  gerjesztett molekulából

$\Delta t$  idő alatt

$-\Delta N = (k_f + k_{nr})N\Delta t$  gerjesztődik le.

Differenciálegyenlet:

$$\frac{dN}{dt} = -(k_f + k_{nr})N$$

Megoldása:

$$N = N_0 e^{-(k_f + k_{nr})t} = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}} \quad \text{a gerjesztett állapot élettartama}$$

## A fluoreszcencia intenzitás lecsengése

Az emittált fotonok száma arányos  $\Delta N$ -el, tehát  $N$ -el is, azaz a fotonszám is exponenciálisan csökken,  $\tau$  időállandóval.

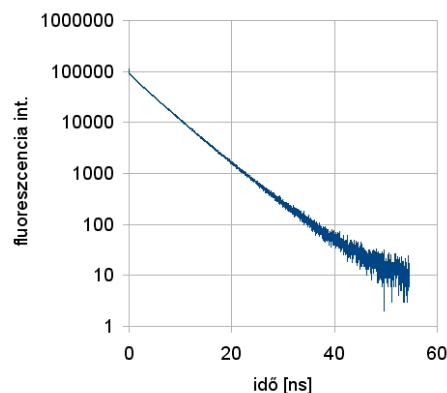
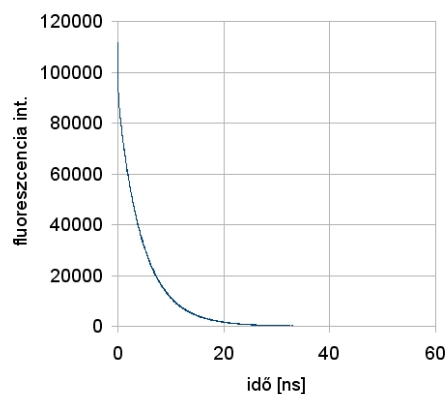
Mérése: impulzusszerű megvilágítás (villanólámpa, v. impulzuslézer), fotonszámlálás az idő függvényében.

Megj. Kvantumhatásfok és élettartam a foszforeszcencia esetén is hasonlóan definiálható ill. mérhető.

$\tau_{\text{fluoreszcencia}}$  ns

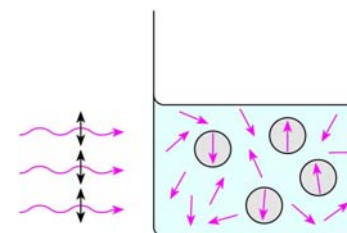
$\tau_{\text{foszforeszcencia}}$   $\mu\text{s} \dots \text{s}$

## Példa



## Fluoreszcencia polarizáció

polarizált fénnel világítjuk meg a mintát



mérjük, h. az emittált fény mennyire polarizált

elfordulhat a gerjesztett állapot élettartama alatt  $\Rightarrow$  dinamikai információ

# Fényszórás

Rayleigh

$$\lambda_{\text{szórt}} = \lambda_{\text{megvil}}$$

Raman

$$\lambda_{\text{szórt}} \neq \lambda_{\text{megvil}}$$



Raman szórás:

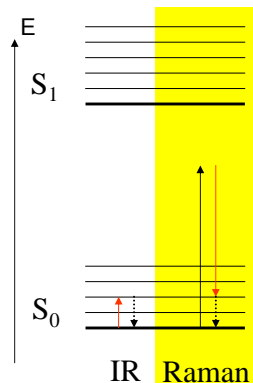
$$\lambda_{\text{szórt}} \neq \lambda_{\text{megvil}} \Rightarrow f_{\text{szórt}} \neq f_{\text{megvil}}$$

$$\Rightarrow E_{\text{foton, szórt}} \neq E_{\text{foton, megvil}}$$

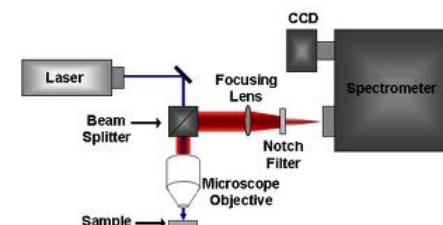
hova lett az energia?

Molekularezgést kelt (ld. IR)

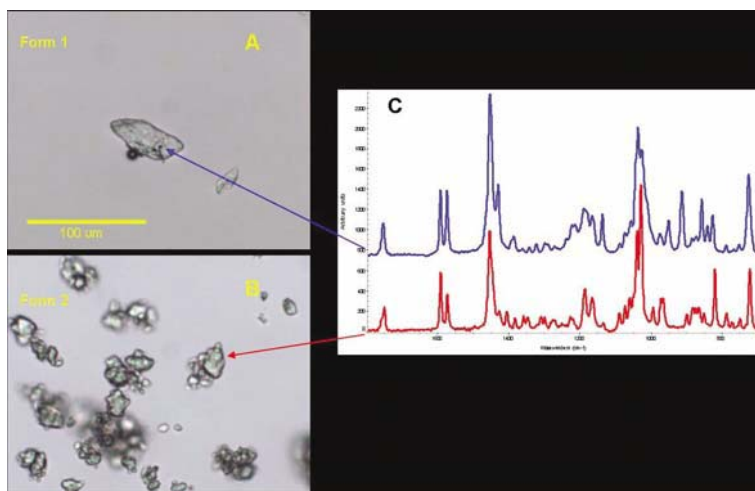
gyenge intenzitású



# Raman spektrométer



# Gyógyszerészeti alkalmazás



# Rayleigh szórás

ha a részecske mérete:  $a \ll \lambda$

a szórt intenzitás:

$$J_{\text{szórt}} \sim J_0 N \frac{a^6}{\lambda^4}$$

információ: méret, mennyiség

(pl. kolloidok)

Kék égbolt

## A Rayleigh szórás mérése

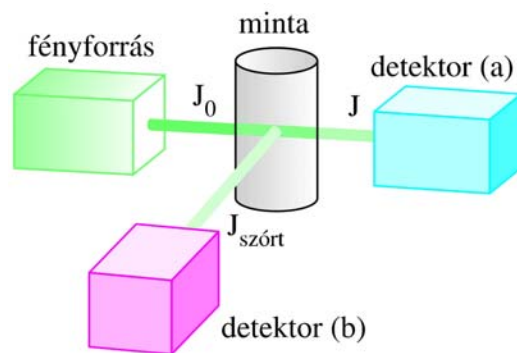
ha  $J_{\text{szórt}} \ll J_0$

$J_{\text{szórt}}$ -at mérjük  
(Nefelometria)

ha  $J_{\text{szórt}} \approx J_0$

$J$ -t mérjük  
(turbidimetria)

Technikailag ua. mint az abszorpciós spektroszkópia,  
csak most a  $J$  a szórás miatt kisebb, mint  $J_0$



## Mie szórás

Ha  $\lambda \approx a$  a szórás hullámhossz-független.

↑  
Részecskeméret

Szürke égbolt

Rayleigh szórás



Mie szórás !

