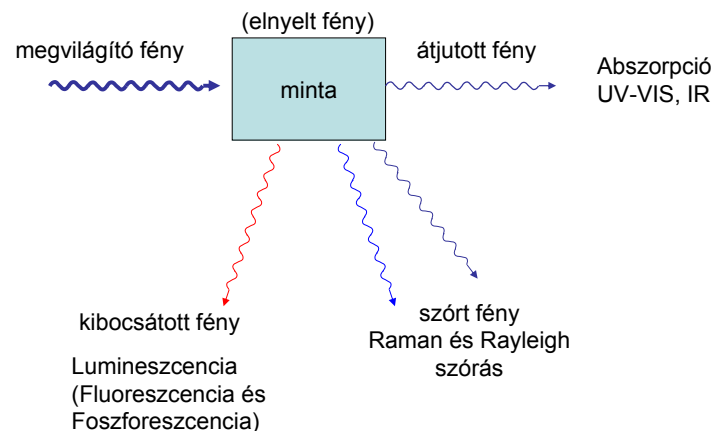


Optikai spektroszkópai módszerek

Smeller László

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

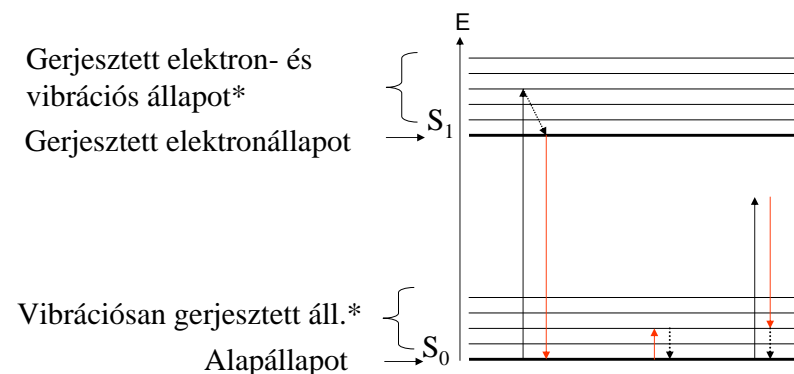


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

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

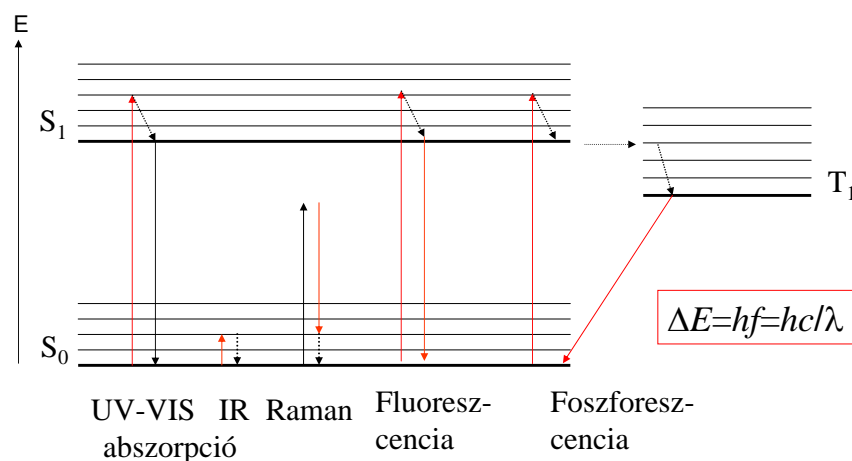
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- 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

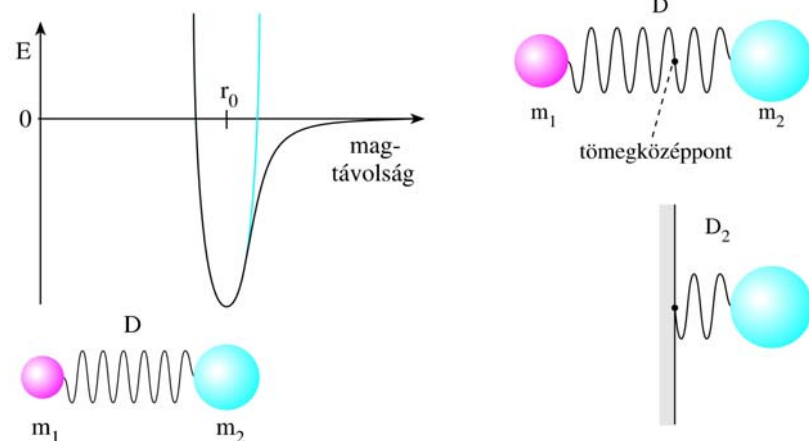
- Infravörös fény: $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer

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.

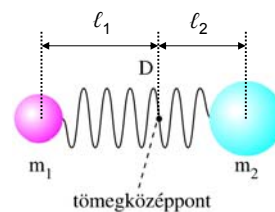
Molekularezgések: kétatomos molekula



a középiskolából ismert:

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

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

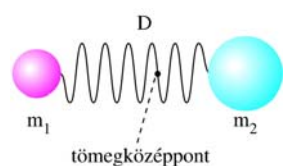


$$\frac{D_2}{D} = \frac{F/D}{F/D_2} = \frac{\Delta \ell}{\Delta \ell_2} = \frac{\ell}{\ell_2} =$$

$$= \frac{\ell_1 + \ell_2}{\ell_2} = \frac{\ell_1}{\ell_2} + 1 = \frac{m_2}{m_1} + 1 = \frac{m_1 + m_2}{m_1}$$

$$F = D\Delta \ell$$

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 λ reciprokát, a hullámszámot (ν) használják:

ν : hány hullám fér el egységnyi hosszúságon? [cm^{-1}]

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

Példa: CO

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

$$\Rightarrow \lambda = 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz}$$

$$m_C = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_O = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

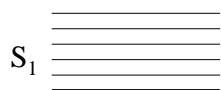
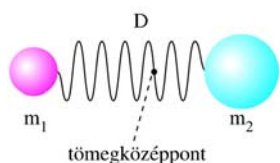
Ha ν ismert, D számolható

ha D ismert, ν számolható

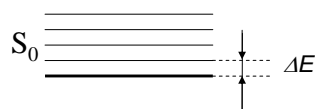
Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

- Klasszikus kép

Energianívók



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



rezonancia az f frekvenciájú fénnel

$$\Delta E = hf$$

u.a.!!!

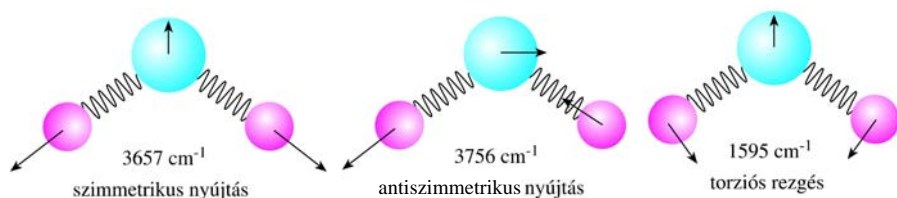
Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

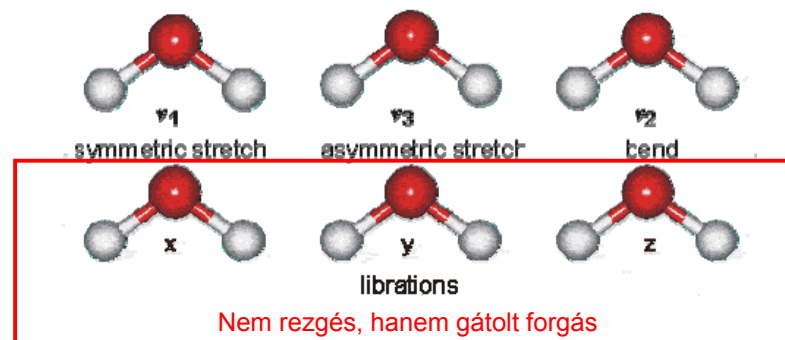
- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések

Normálrezgések

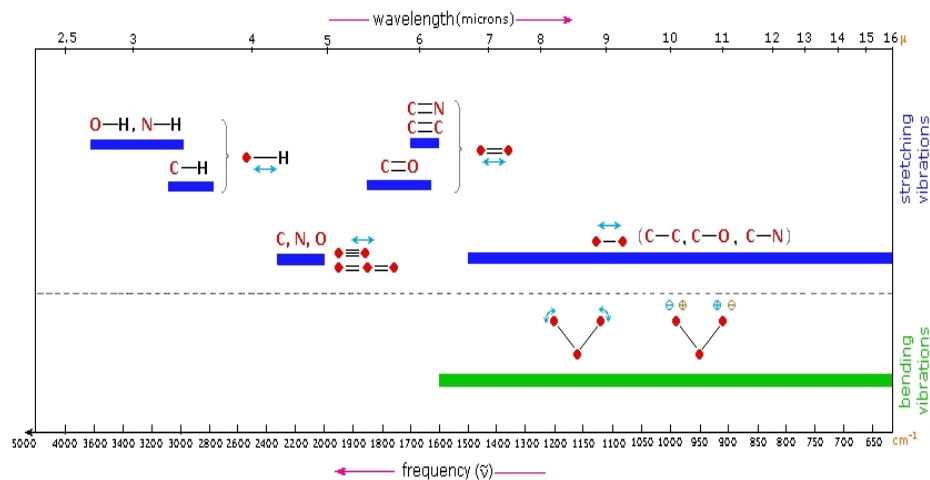
- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:



A víz normálrezgései

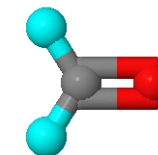
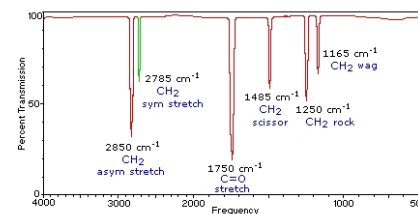


Néhány tipikus rezgési frekvencia



Példa: Formaldehid

Gas Phase Infrared Spectrum of Formaldehyde, H₂C=O



- ☐ View CH₂ Asymmetric Stretch
- ☐ View CH₂ Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH₂ Scissoring
- ☐ View CH₂ Rocking
- ☐ View CH₂ Wagging

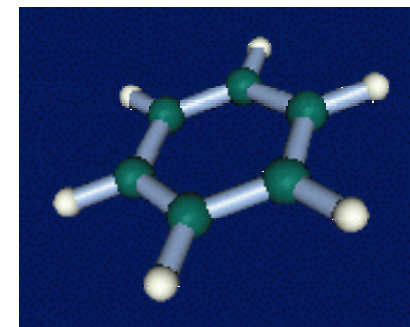
- ☐ Ball&Stick Model
- ☐ Spacefill Model
- ☐ Stick Model
- ☒ Motion Off

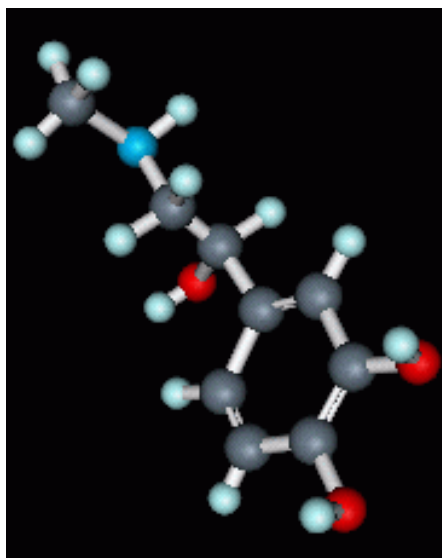
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

Flavin



Benzol



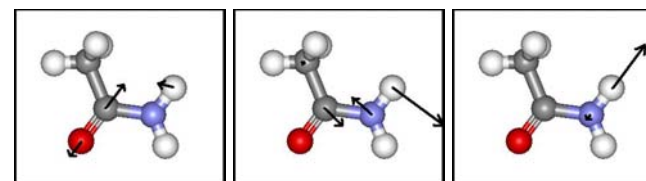
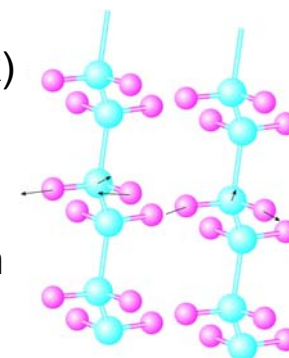


Makromolekulák rezgései

Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

- CH_2 rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)



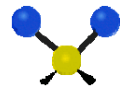
Lipidek



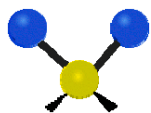
Symmetric Stretch



Asymmetric Stretch



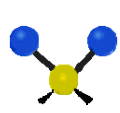
Twisting



Wagging



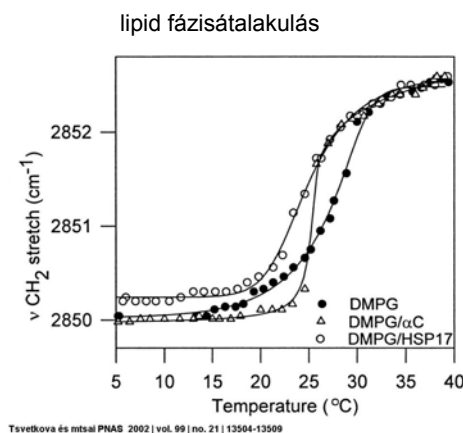
Scissoring



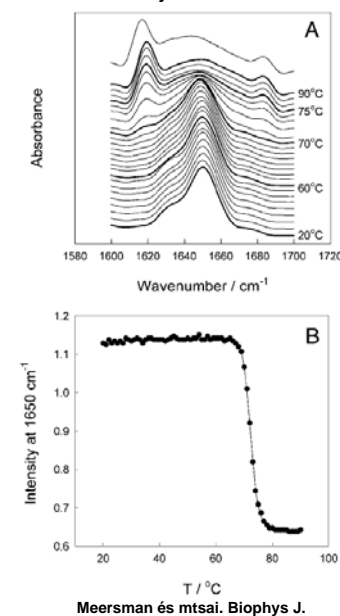
Rocking

Types of Vibrational Modes. Figure from Wikipedia

Alkalmazások



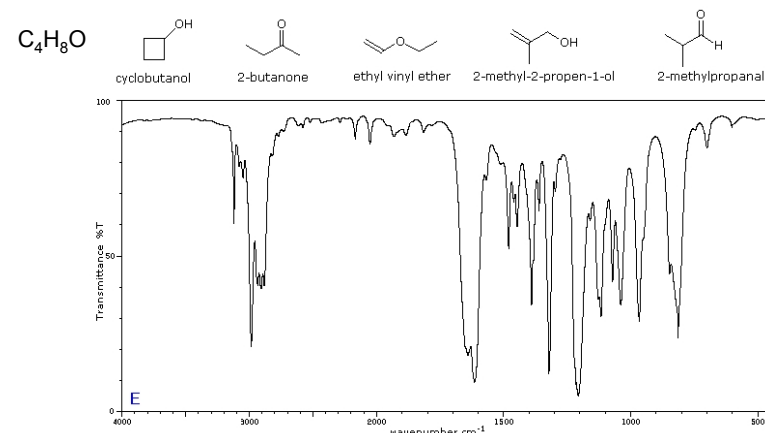
fehérjedenaturáció



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.

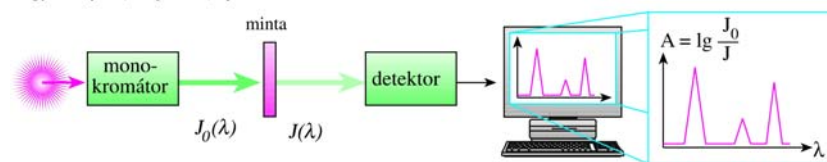
Gyógyszerészeti alkalmazás: molekula azonosítás



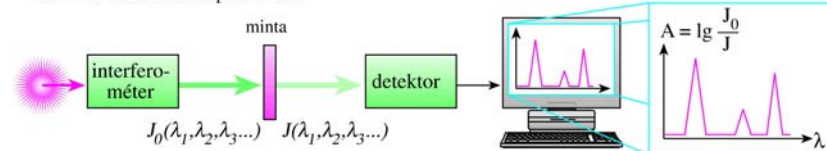
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

A spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer (FTIR)

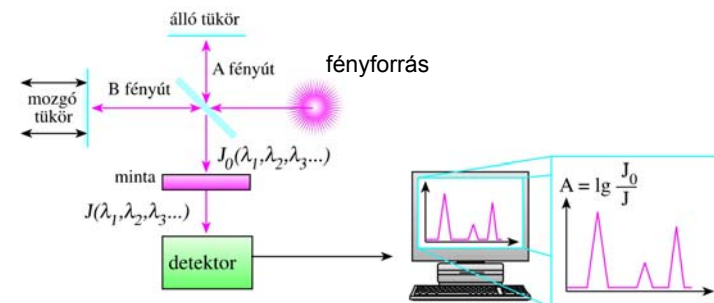
hagyományos (diszperziós) spektrométer



Fourier transzformációs spektrométer



tk 6.17 ábra



tk 6.18 ábra

Speciális IR módszerek: 1. IR Mikroszkópia



A komponensek térbeli eloszlása

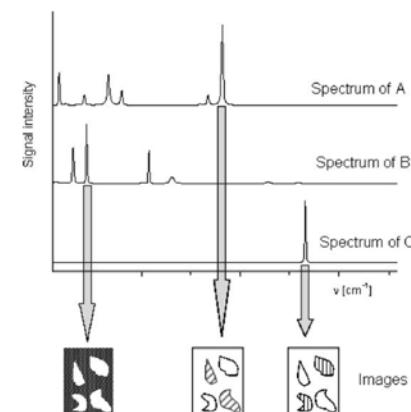
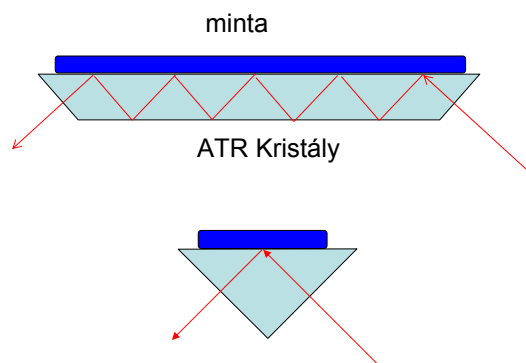


Fig. 6. The principle of vibrational spectroscopic imaging.

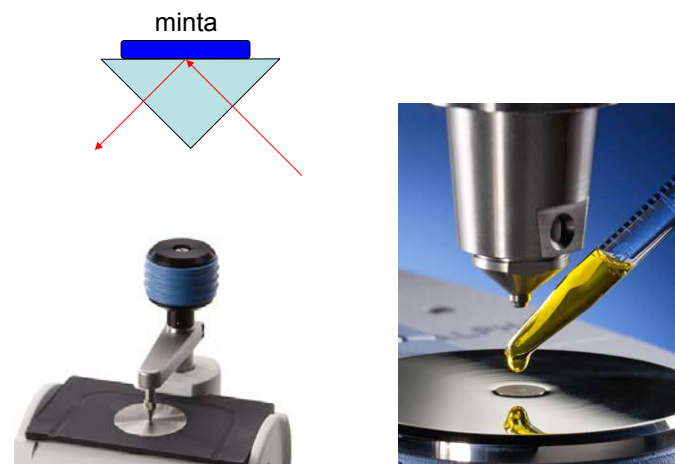
S. Wartewiga, R. H.H. Neubert, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1144– 1170

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

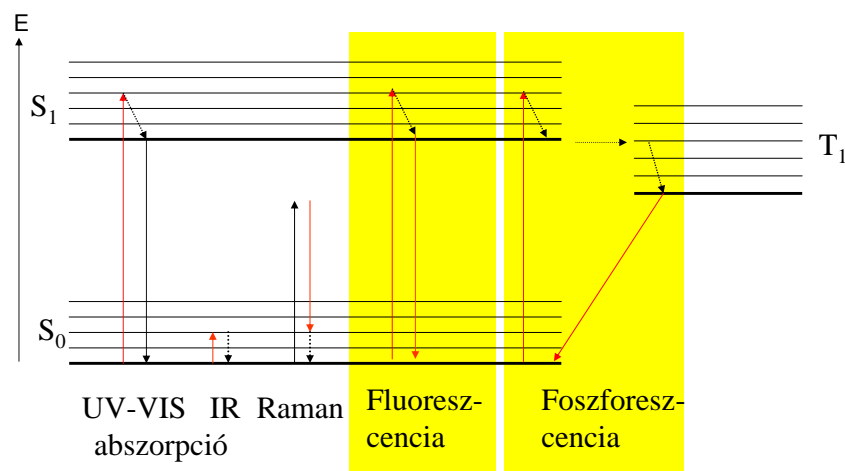


ATR technika

Nagyon egyszerű minta-előkészítés



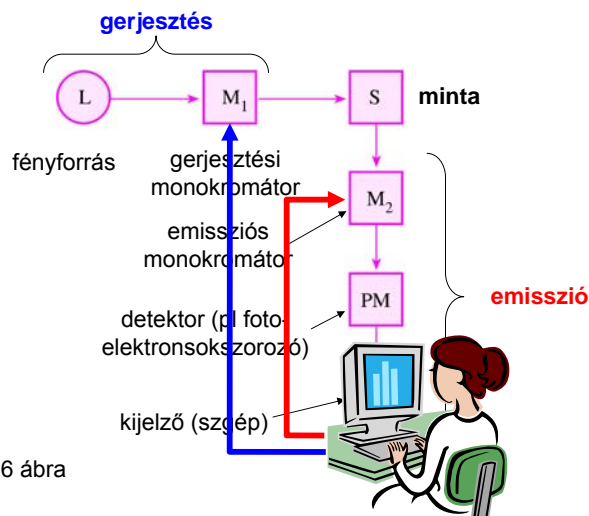
Lumineszcencia spektroszkópia



Mérhető mennyiségek

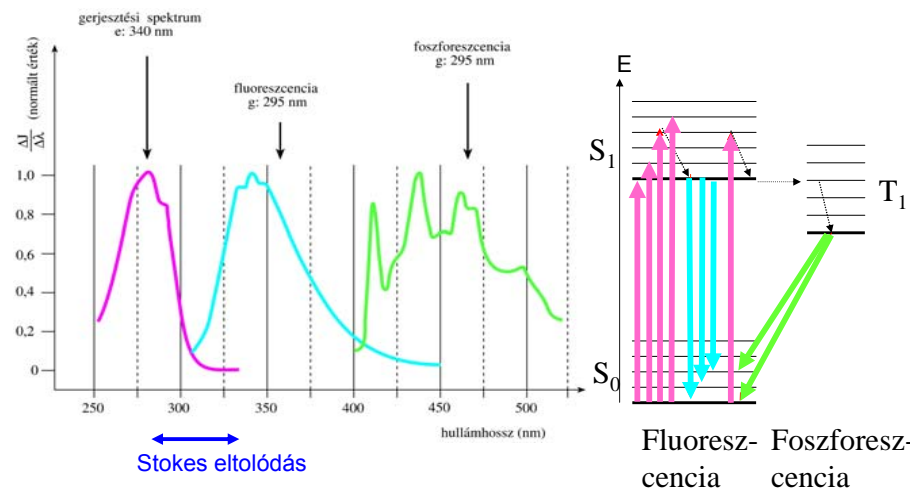
- a gerjesztő fény hullámhossza
- az emittált fény hullámhossza (fluor., foszf)
- az emittált fény időbeli eloszlása
- az emittált fény polarizációja
- az emittált fény intenzitása

A lumineszcens spektrométer felépítése



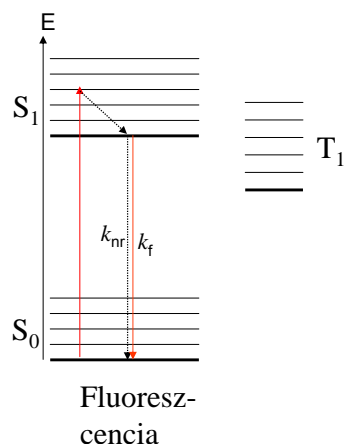
tk. 6.26 ábra

Gerjesztési, és emissziós spektrumok



tk 6.25. ábra

A fluoreszcencia kvantumhatásfok (Q)



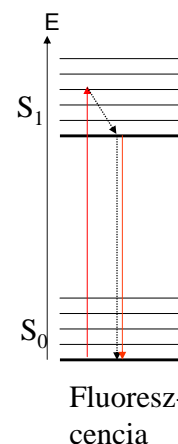
Kvantumhatásfok $Q =$
 $= \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}}$

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

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

festékek, fl. jezők $Q \approx 1$

A gerjesztett állapot élettartama



N gerjesztett molekulából
 Δt 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 ΔN -el, tehát N -el is, azaz a fotonszám is exponenciálisan csökken, τ időállandóval.

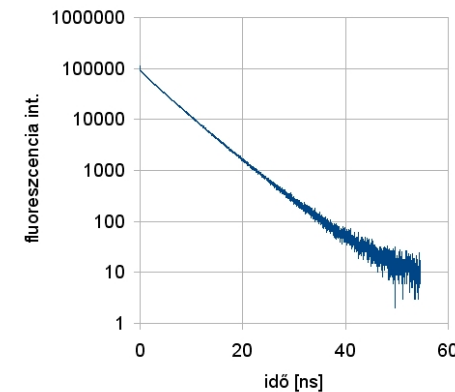
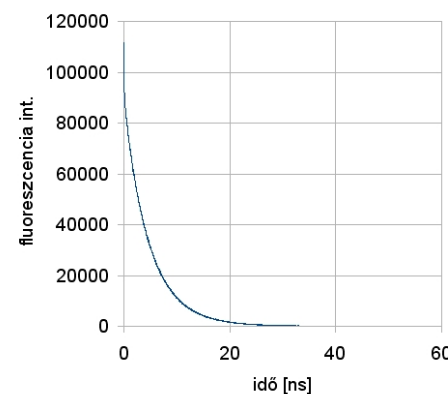
Mérése: impulzusszerű megvilágítás (villanólámpa, v. impulzuslézer),
 fotonszámlálás az idő függvényében.

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

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

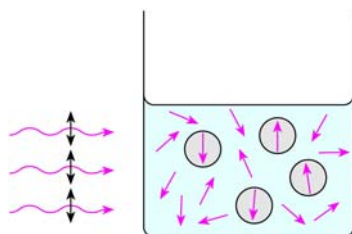
$\tau_{\text{foszforeszcencia}}$ $\mu\text{s} \dots \text{s}$

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

tk 6.28 ábra

Fényszórás



Rayleigh

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

Raman

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

Raman szórás:

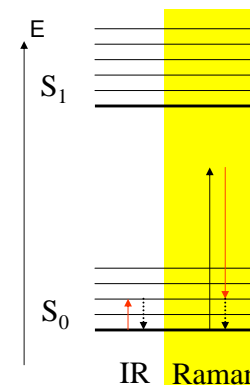
$$\lambda_{\text{szórt}} \neq \lambda_{\text{megvil}} \Rightarrow f_{\text{szórt}} \neq f_{\text{megvil}}$$

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

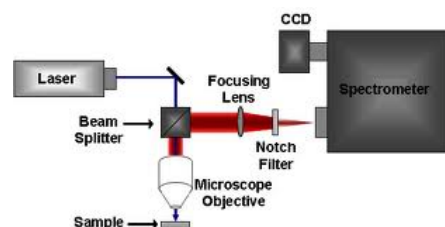
hova lett az energia?

Molekularezgést kelt (ld. IR)

gyenge intenzitású



Raman spektrométer



Gyógyszerészeti alkalmazás

