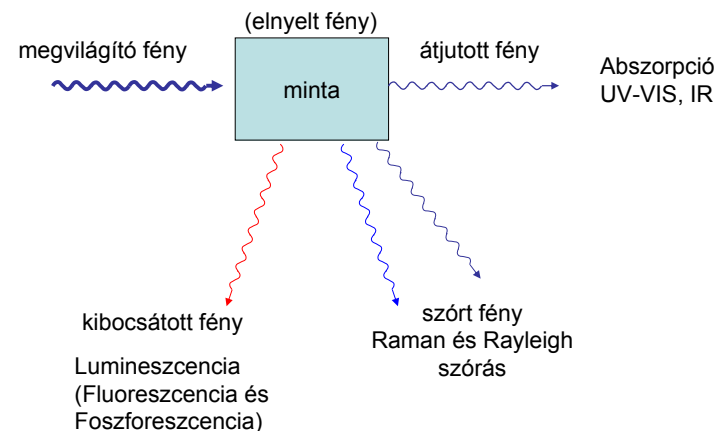


Optikai spektroszkópai módszerek

Smeller László

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

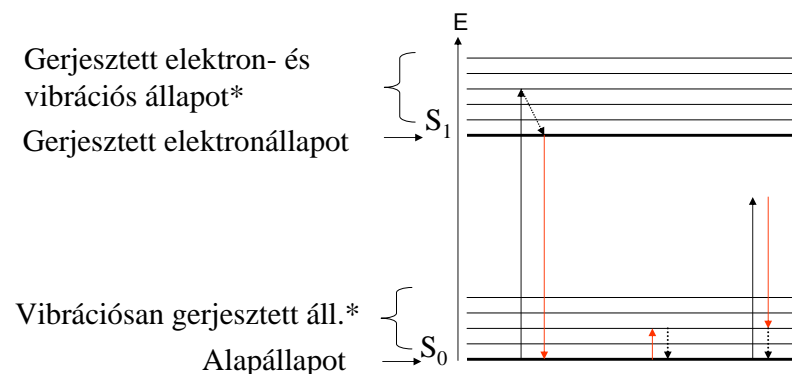


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

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

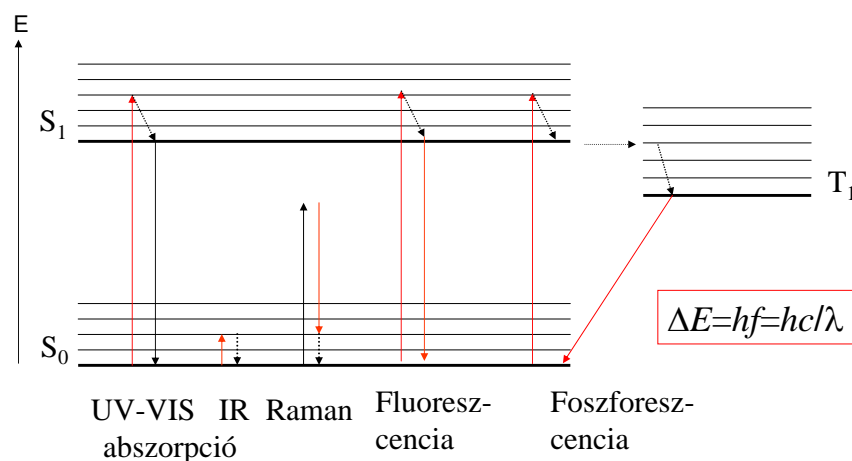
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- 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

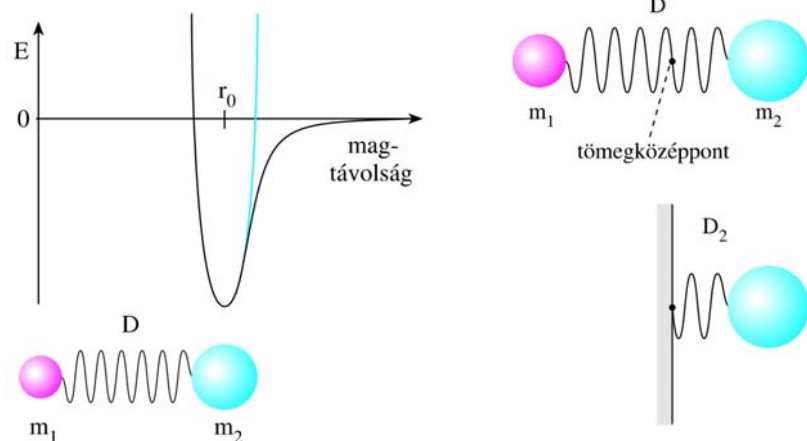
- Infravörös fény: $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer

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.

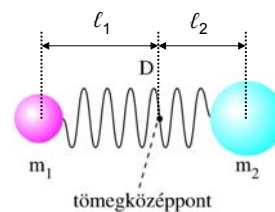
Molekularezgések: kétatomos molekula



a középiskolából ismert:

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

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

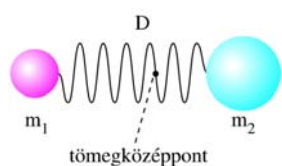


$$\frac{D_2}{D} = \frac{F/D}{F/D_2} = \frac{\Delta\ell}{\Delta\ell_2} = \frac{\ell}{\ell_2} =$$

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

$$F = D\Delta\ell$$

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: $\nu = 2143 \text{ cm}^{-1}$

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

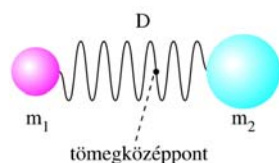
$$m_C = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_O = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha ν ismert, D számolható

ha D ismert, ν számolható

Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

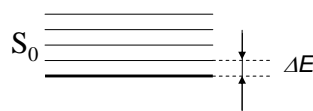
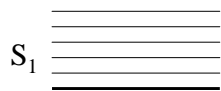
- Klasszikus kép



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

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⁻¹)

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⁻¹

Kötéserősség:

C-N: 1100 cm⁻¹,
C=N: 1660 cm⁻¹,
C≡N: 2220 cm⁻¹.

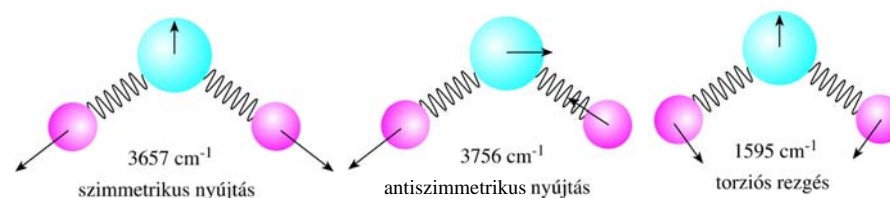
Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

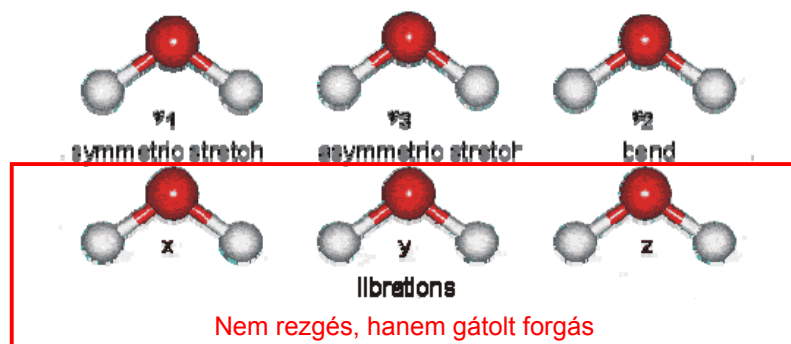
- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések

Normálrezgések

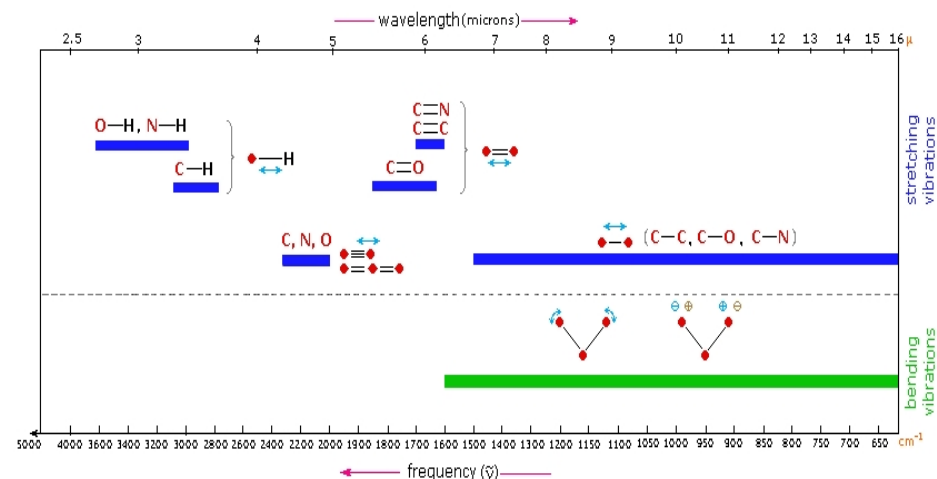
- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:



A víz normálrezgései

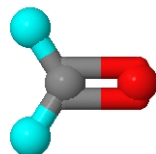
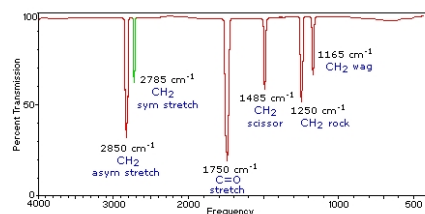


Néhány tipikus rezgési frekvencia



Példa: Formaldehid

Gas Phase Infrared Spectrum of Formaldehyde, $H_2C=O$



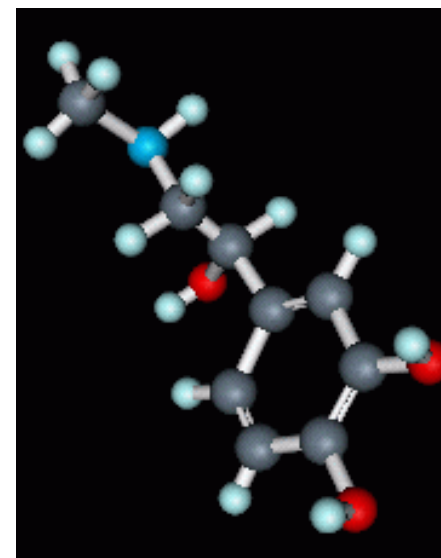
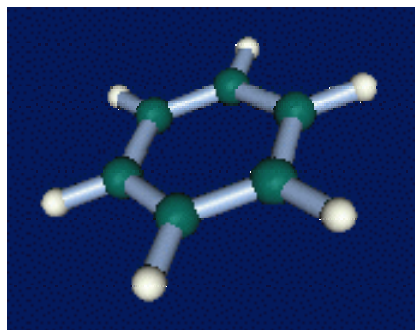
- ☐ View CH₂ Asymmetric Stretch
- ☐ View CH₂ Symmetric Stretch
- ☐ View C=O Stretch
- ☐ View CH₂ Scissoring
- ☐ View CH₂ Rocking
- ☐ View CH₂ Wagging

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

Flavin



Benzol

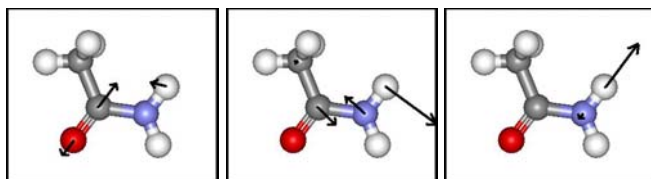
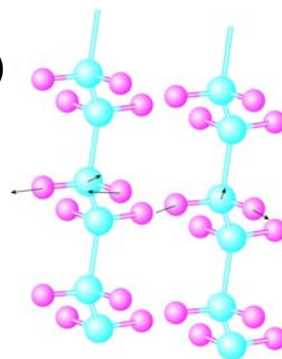


Makromolekulák rezgései

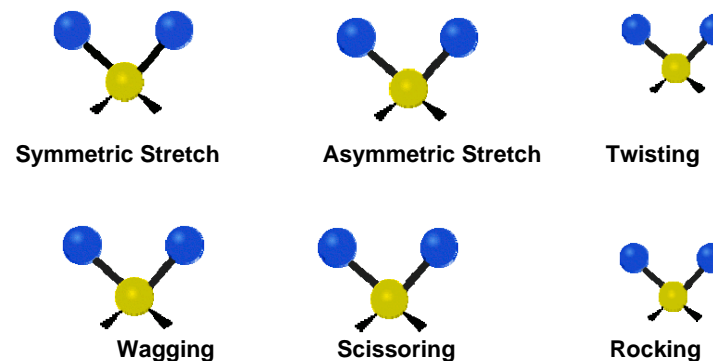
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

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

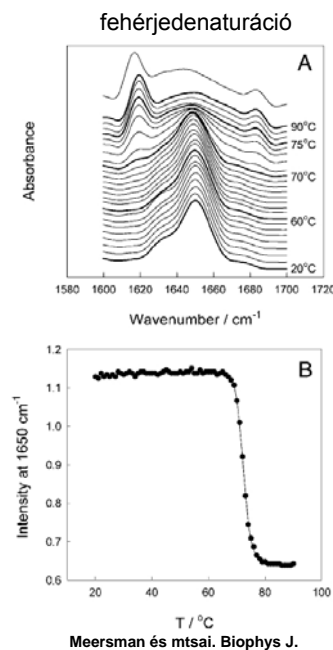
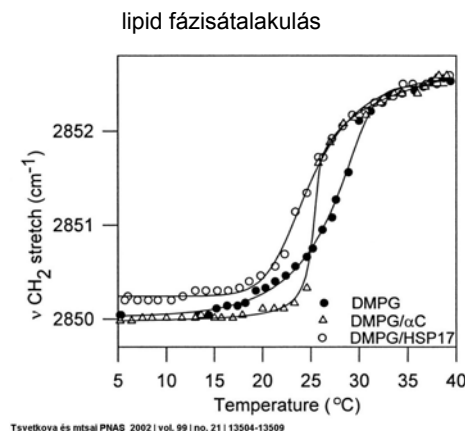


Lipidek



Types of Vibrational Modes. Figure from Wikipedia

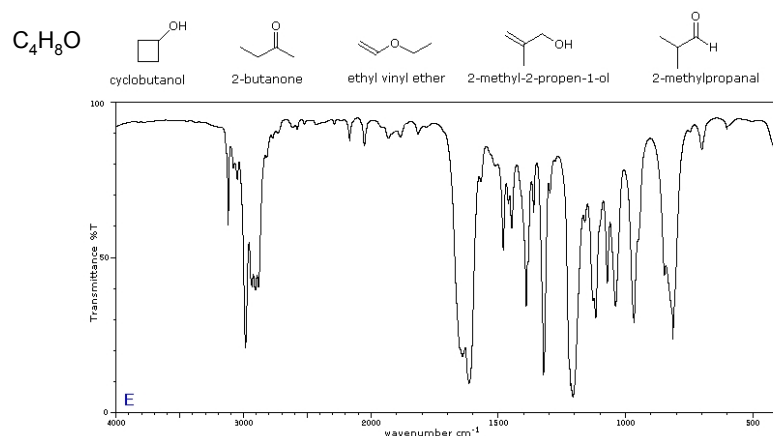
Alkalmazások



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.

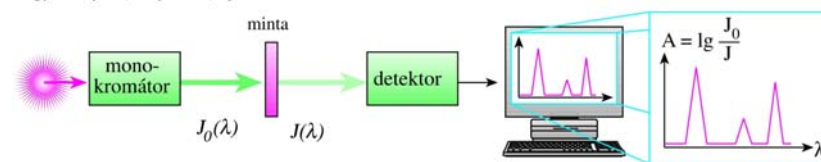
Gyógyszerészeti alkalmazás: molekula azonosítás



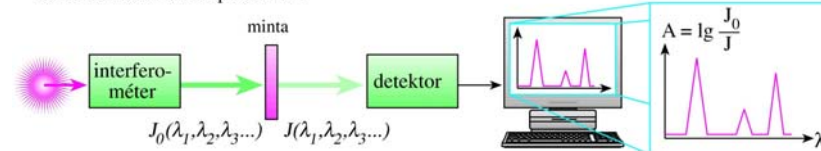
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

A spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer (FTIR)

hagyományos (diszperziós) spektrométer

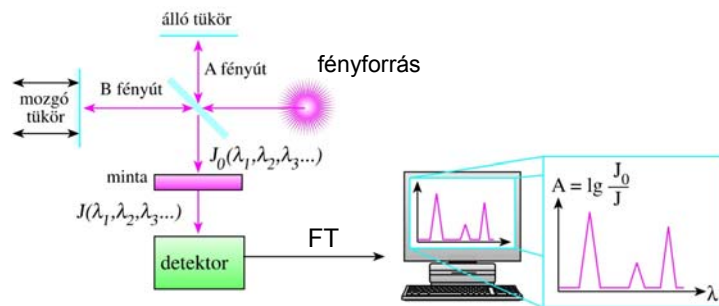


Fourier transzformációs spektrométer



tk 6.17 ábra

Speciális IR módszer: IR Mikroszkópia



tk 6.18 ábra

A komponensek térbeli eloszlása

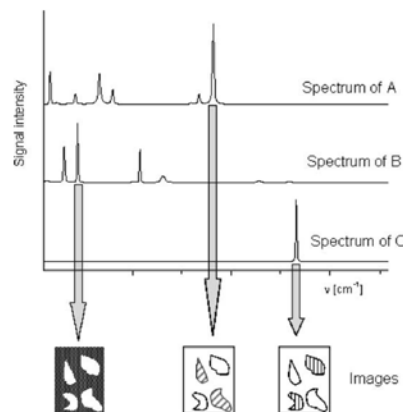
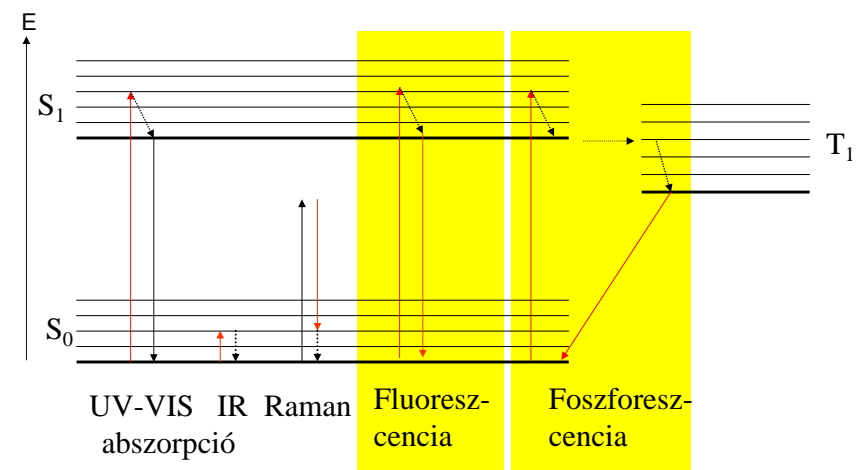


Fig. 6. The principle of vibrational spectroscopic imaging.

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

Lumineszcencia spektroszkópia



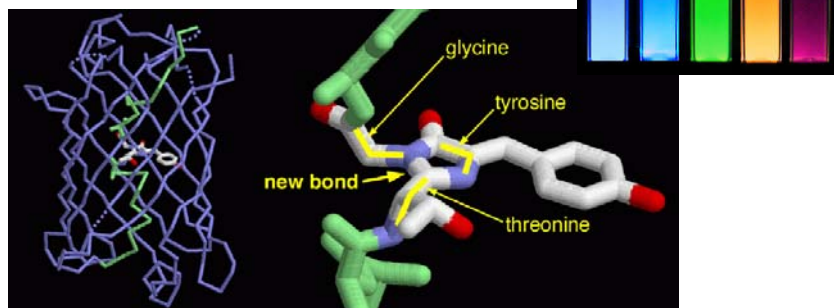
Milyen molekulák fluoreshkálnak?

Aminosavak (triptofán, tirozin, fenilalanin)

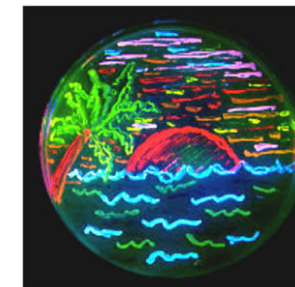
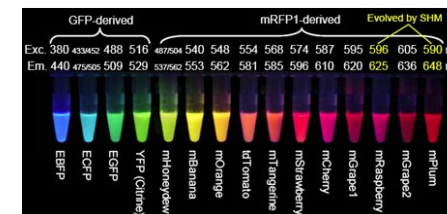
Fluoreszcens festékek

GFP

• • •



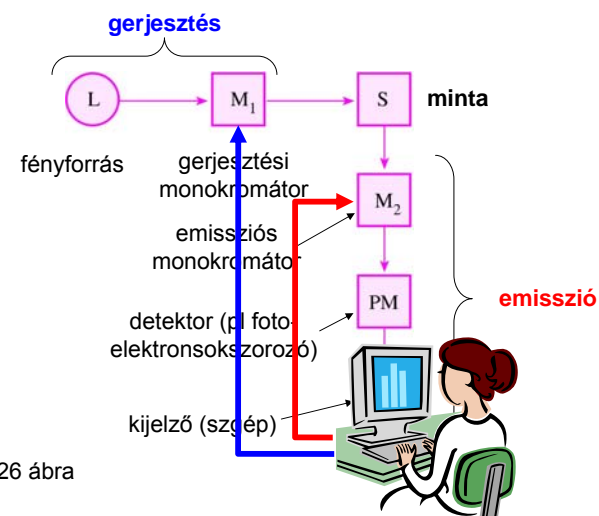
Aequorea victoria



Mérhető mennyiségek

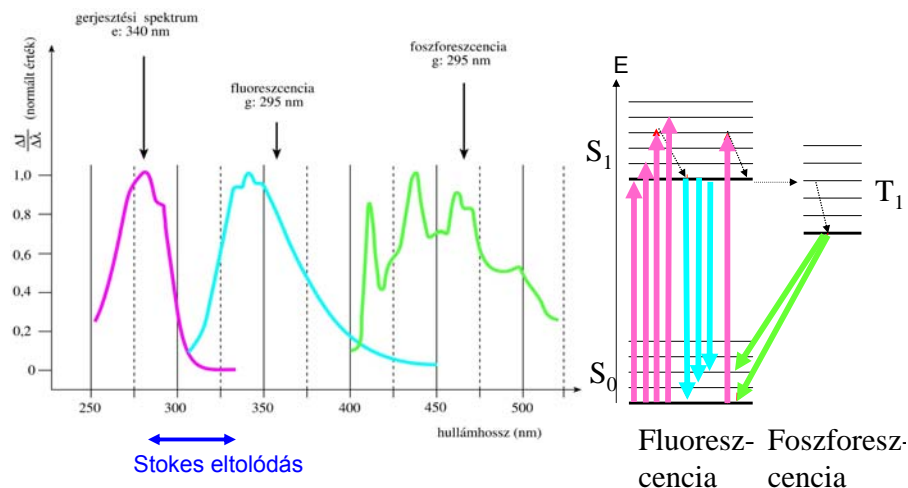
- a gerjesztő fény hullámhossza
- az emittált fény hullámhossza (fluor., foszf)
- az emittált fény időbeli eloszlása
- az emittált fény polarizációja
- az emittált fény intenzitása

A lumineszcens spektrométer felépítése



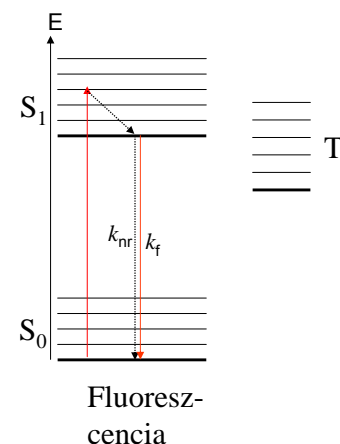
tk. 6.26 ábra

Gerjesztési, és emissziós spektrumok



tk 6.25. ábra

A fluoreszcencia kvantumhatásfok (Q)



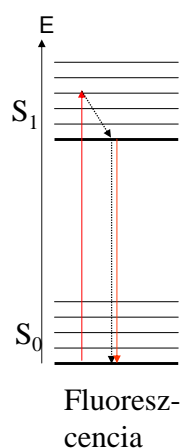
Kvantumhatásfok $Q =$
 $= \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}}$

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

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

festékek, fl. jelzők $Q \approx 1$

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:

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

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

A fluoreszcencia intenzitás lecsengése

Az emittált fotonok száma arányos ΔN -el, tehát N -el is, azaz a fotonszám is exponenciálisan csökken, τ időállandóval.

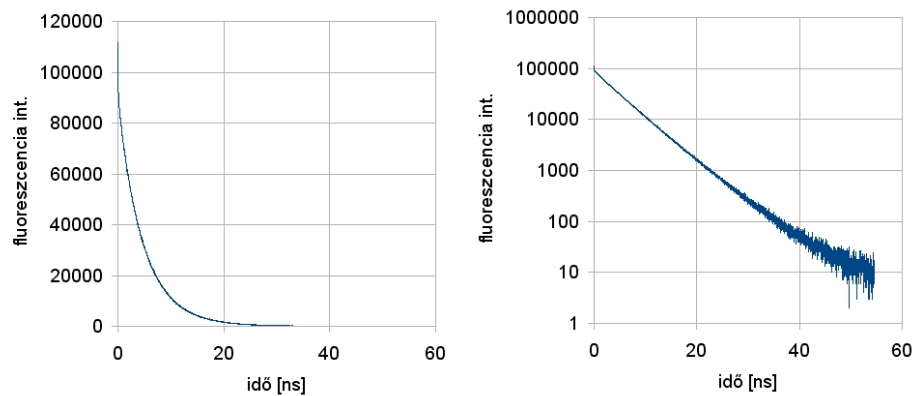
Mérése: impulzusszerű megvilágítás (villanólámpa, v. impulzuszlaser), fotonszámlálás az idő függvényében.

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

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

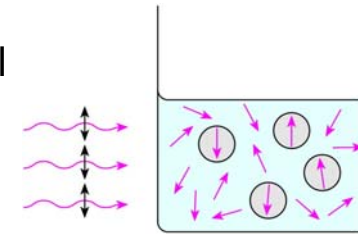
$\tau_{\text{foszforeszcencia}}$ $\mu\text{s} \dots \text{s}$

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

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



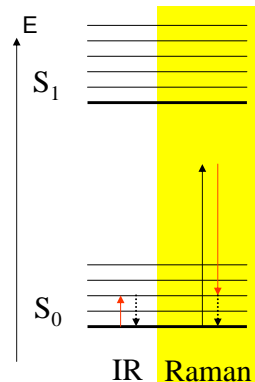
Raman szórás:

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

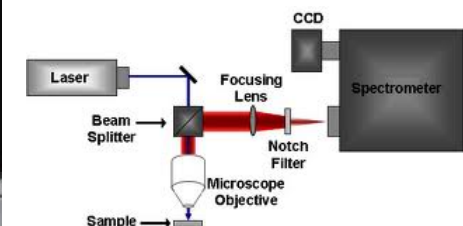
$$\Rightarrow E_{\text{foton, szórt}} \neq E_{\text{foton, megvil}}$$

hova lett az energia?

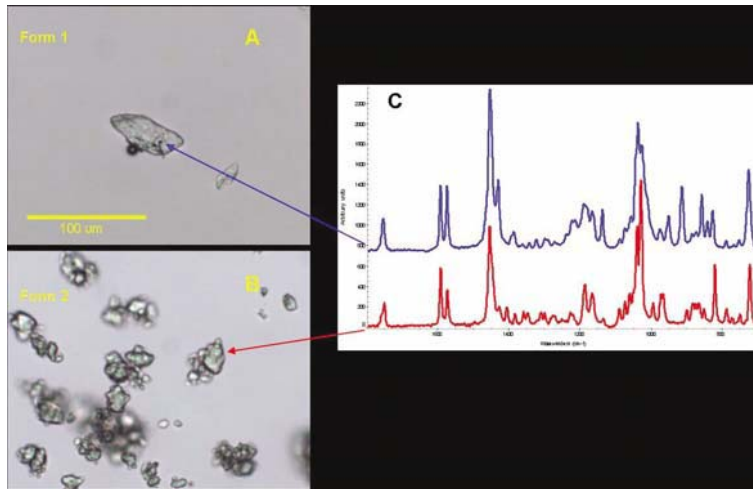
Molekularezgést kelt (ld. IR)
gyenge intenzitású



Raman spektrométer



Gyógyszerészeti alkalmazás



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

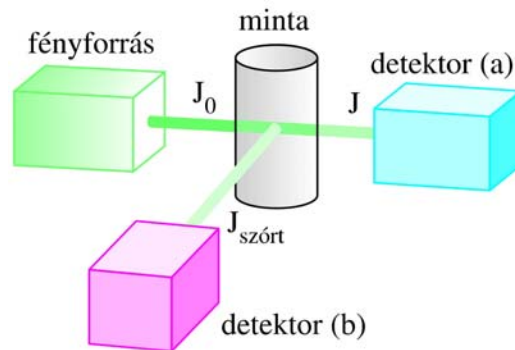
ha $J_{\text{szórt}} \ll J_0$

$J_{\text{szórt}}$ -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

