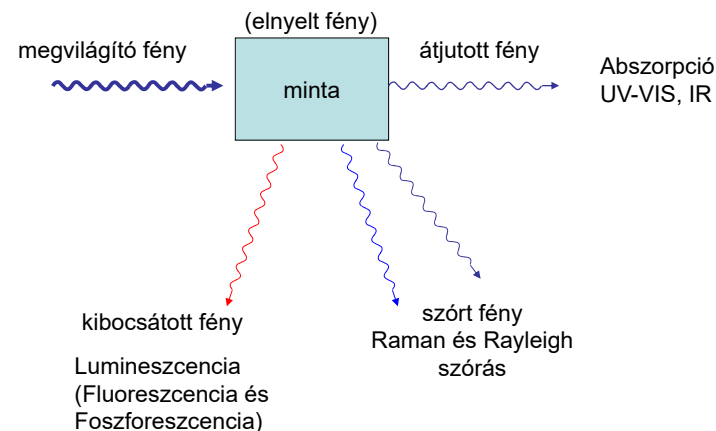


Optikai spektroszkópai módszerek

Smeller László

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

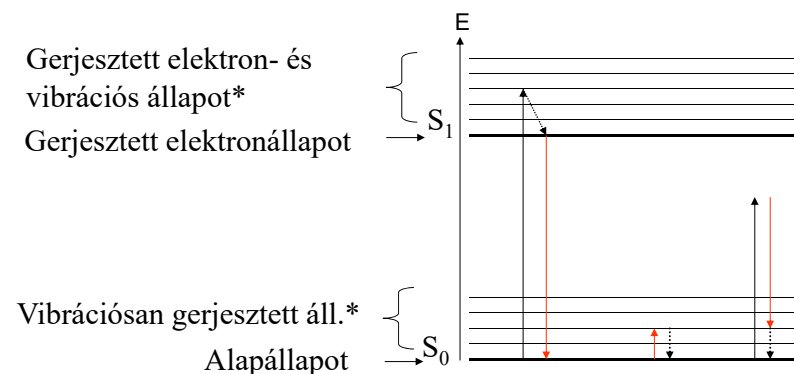


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

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

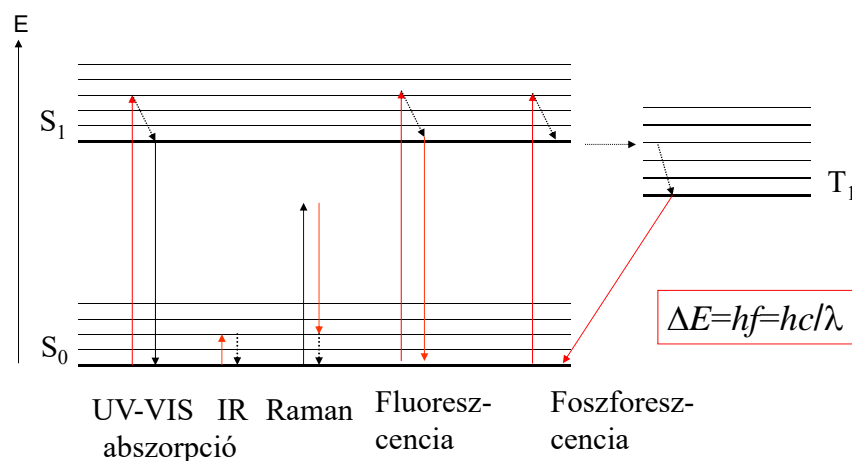
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- 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

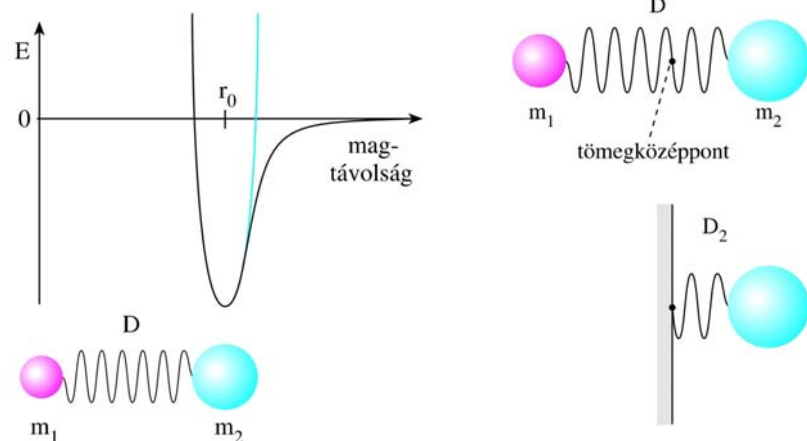
- Infravörös fény: $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer

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:

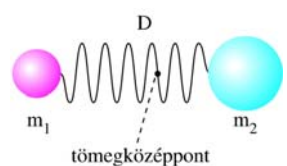
$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{D_2}{m_2}}$$

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

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

$F = D\Delta\ell$

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

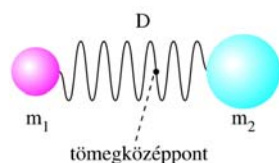
$$\begin{aligned} \Rightarrow \lambda &= 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz} \\ m_{\text{C}} &= 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_{\text{O}} = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg} \end{aligned} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

Ha ν ismert, D számolható

ha D ismert, ν számolható

Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

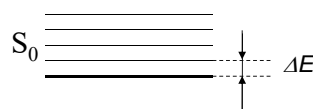
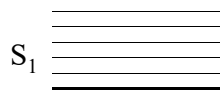
- Klasszikus kép



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

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

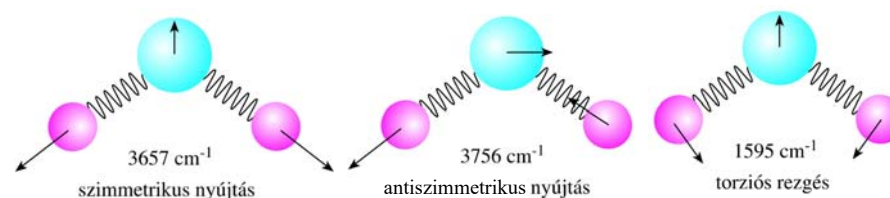
Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

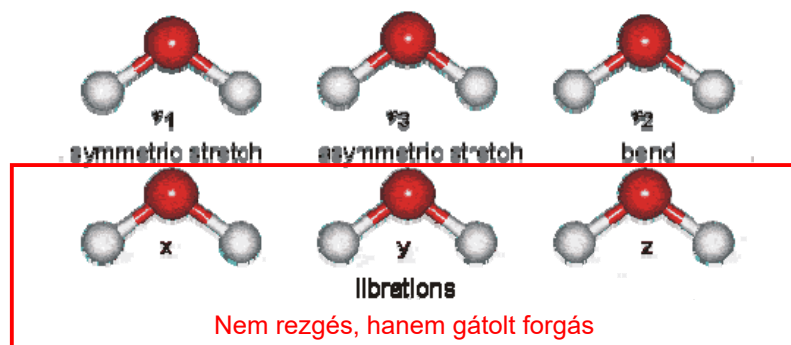
- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések

Normálrezgések

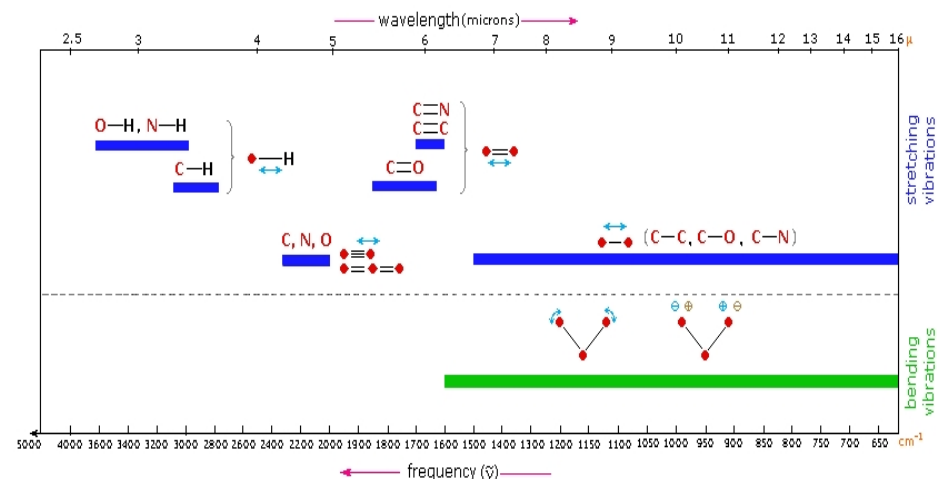
- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:



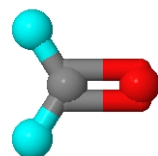
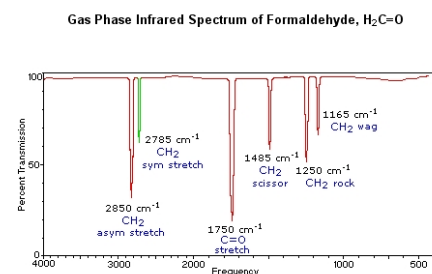
A víz normálrezgései



Néhány tipikus rezgési frekvencia

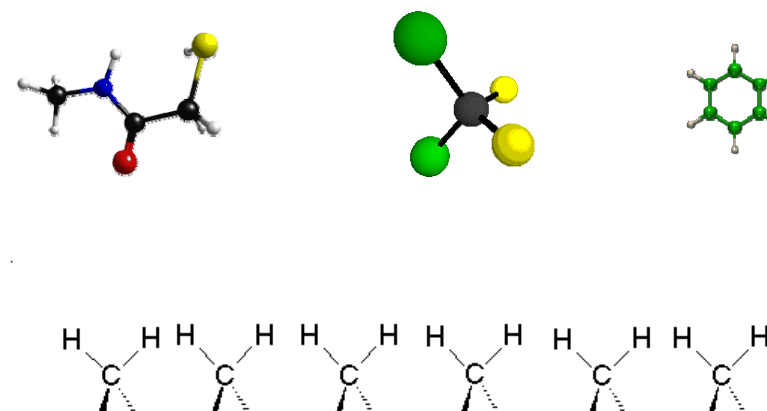


Példa: Formaldehid



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

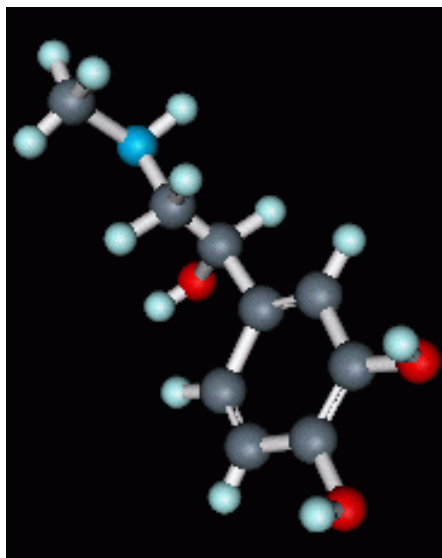
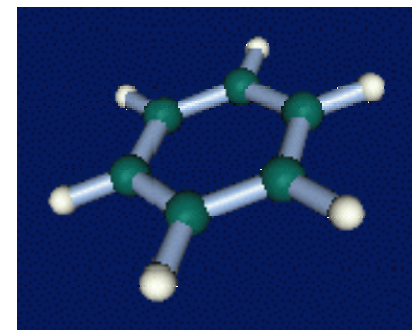
- ☐ Ball&Stick Model
- ☐ Spacefill Model
- ☐ Stick Model
- ☐ Motion Off



Flavin



Benzol

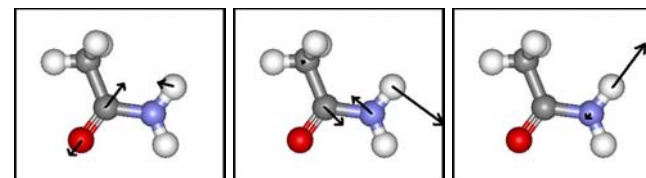
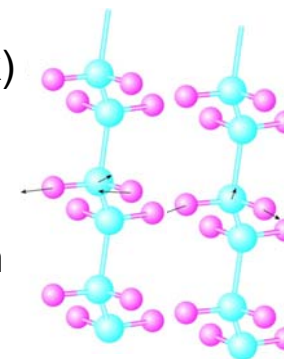


Makromolekulák rezgései

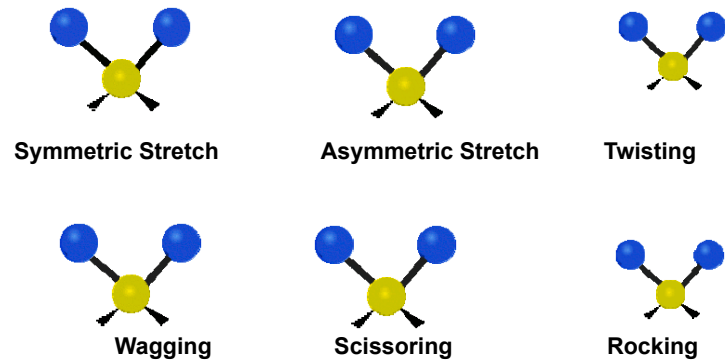
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

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

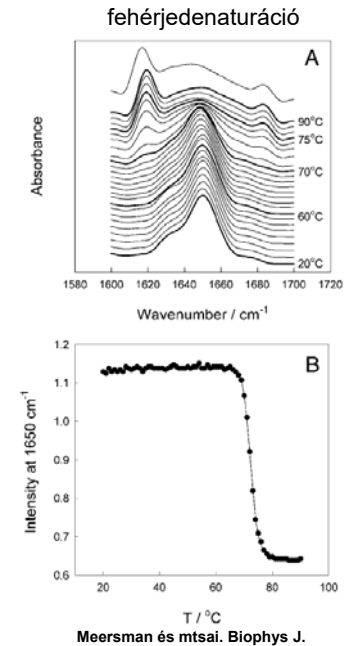
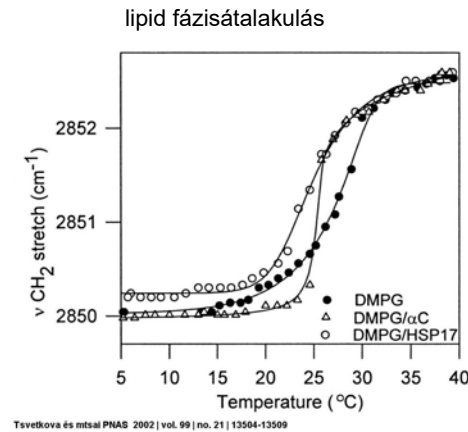


Lipidek



Types of Vibrational Modes. Figure from Wikipedia

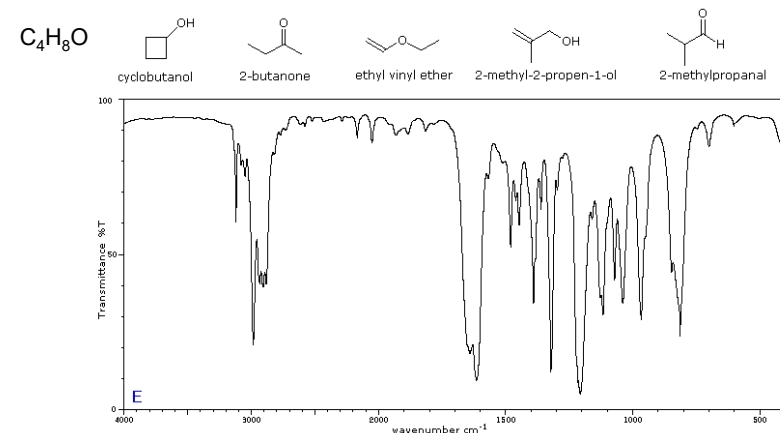
Alkalmazások



Gyógyszerészeti alkalmazások

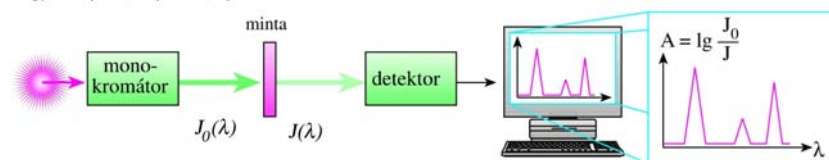
- szintézis: közti és végtermék azonosítás
- szerkezet bizonyítás
- metabolit kimutatás
- gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

Gyógyszerészeti alkalmazás: molekula azonosítás

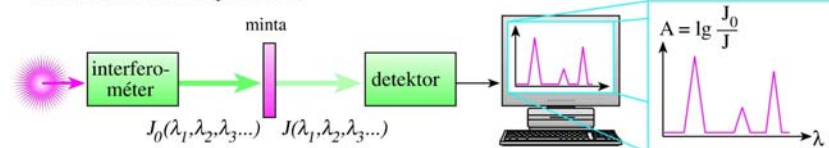


A spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer (FTIR)

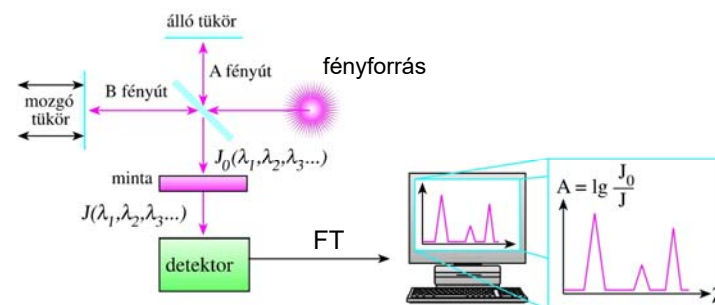
hagyományos (diszperziós) spektrométer



Fourier transzformációs spektrométer



tk 6.17 ábra



tk 6.18 ábra

Speciális IR módszerek: 1. IR Mikroszkópia



A komponensek térbeli eloszlása

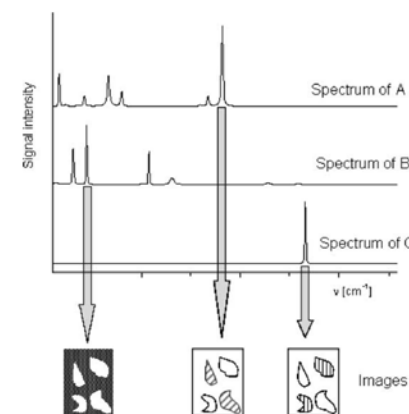
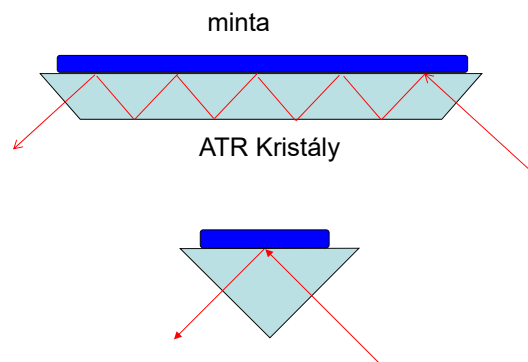


Fig. 6. The principle of vibrational spectroscopic imaging.

Speciális IR módszerek:

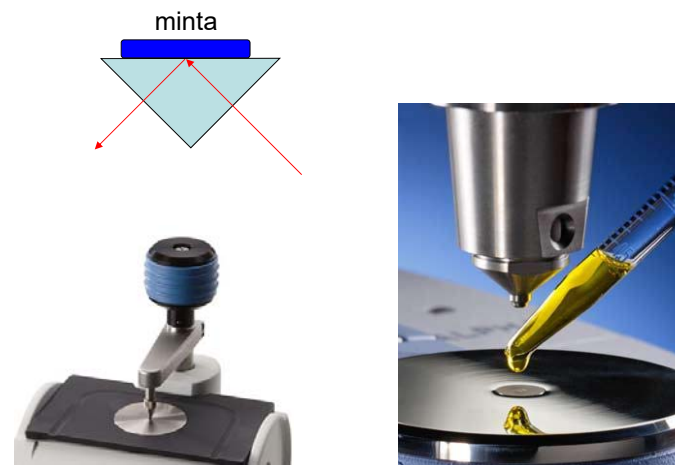
2. ATR technika

(Attenuated Totalreflexion)

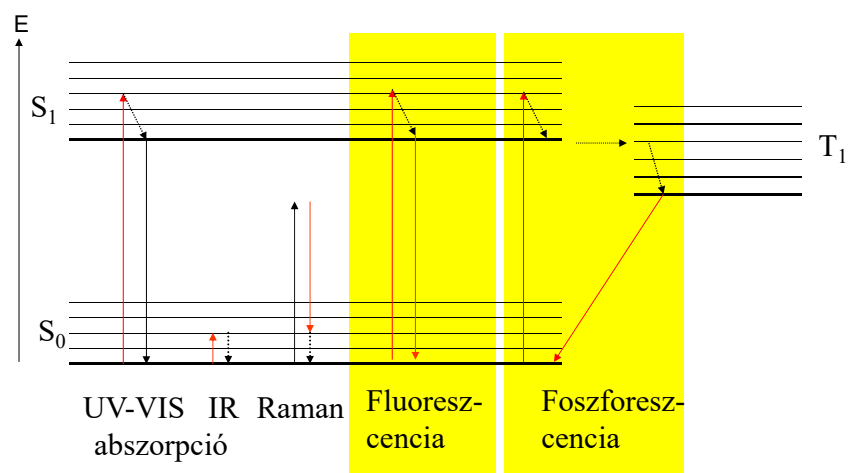


ATR technika

Nagyon egyszerű minta-előkészítés



Lumineszcencia spektroszkópia

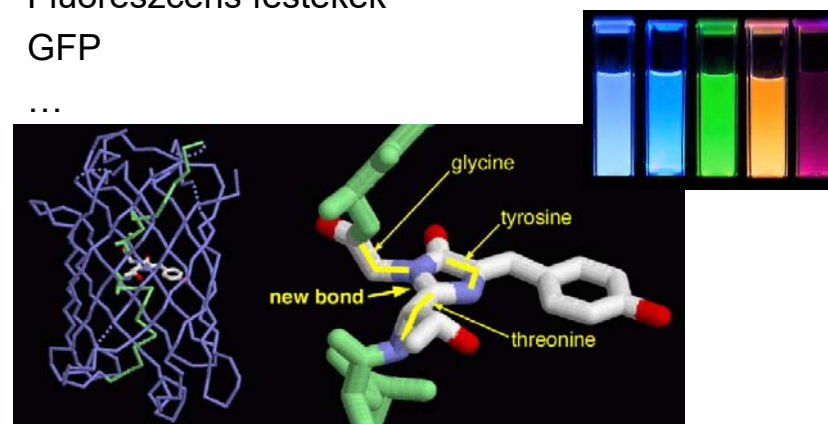


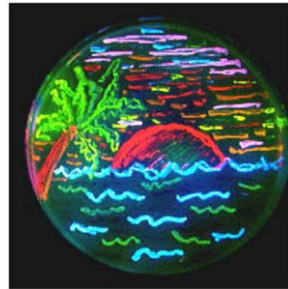
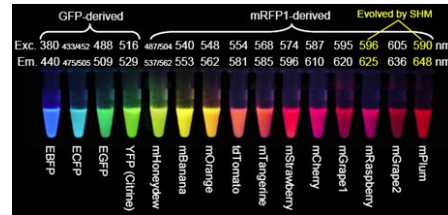
Milyen molekulák fluoreszkálnak?

Aminosavak (triptofán, tirozin, fenilalanin)

Fluoreszcens festékek

GFP

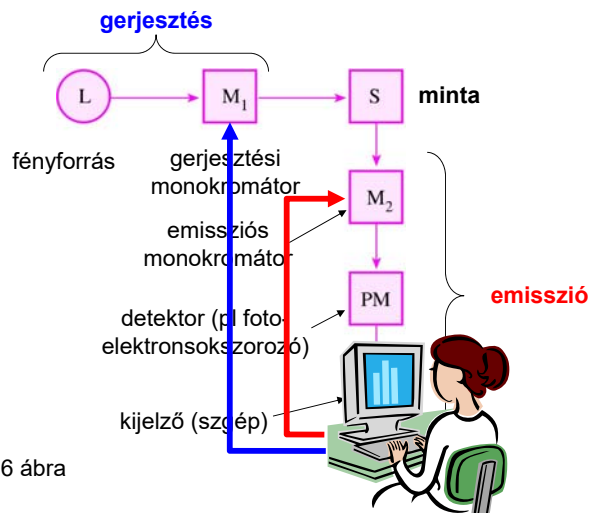




Mérhető mennyiségek

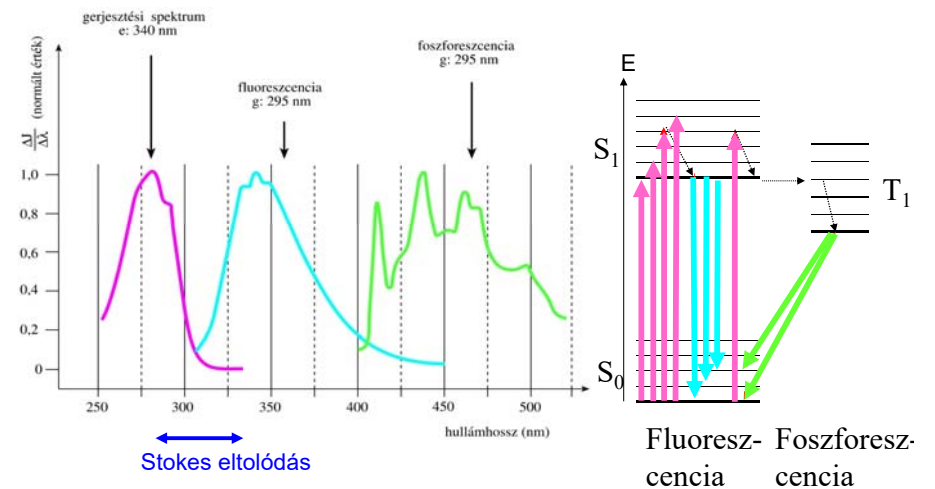
- a gerjesztő fény hullámhossza
- az emittált fény hullámhossza (fluor., foszf)
- az emittált fény időbeli eloszlása
- az emittált fény polarizációja
- az emittált fény intenzitása

A lumineszcens spektrométer felépítése



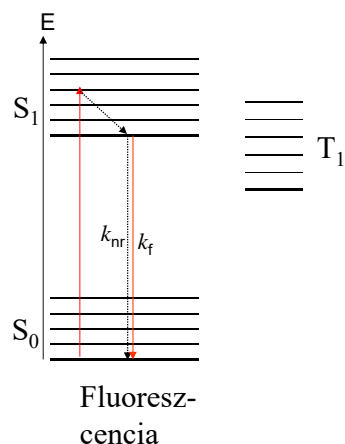
tk. 6.26 ábra

Gerjesztési, és emissziós spektrumok



tk 6.25. ábra

A fluoreszcencia kvantumhatásfok (Q)



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

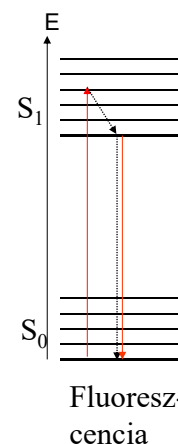
$$Q_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}}$$

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.

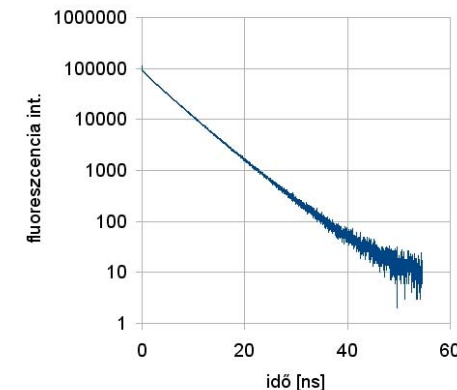
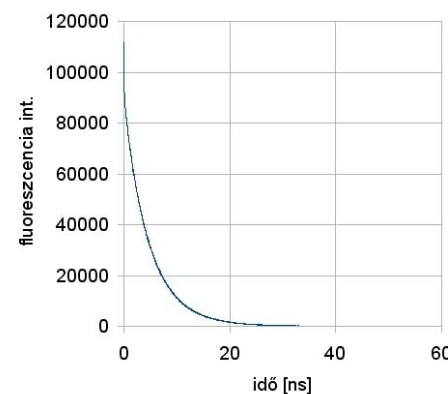
Mérése: impulzusszerű megvilágítás
 (villanólámpa, v. impulzslézer),
 fotonszámlálás az idő függvényében.

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

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

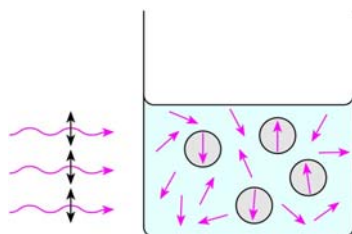
$\tau_{\text{foszforeszcencia}}$ $\mu\text{s} \dots \text{s}$

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

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

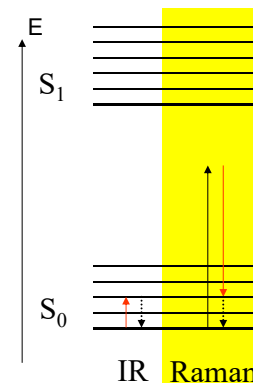
Raman szórás:

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

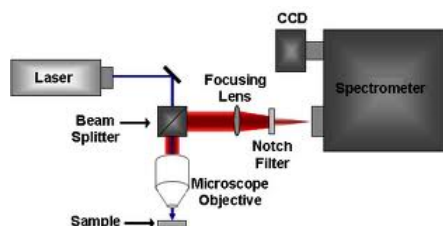
$$\Rightarrow E_{\text{foton, szórt}} \neq E_{\text{foton, megvil}}$$

hova lett az energia?

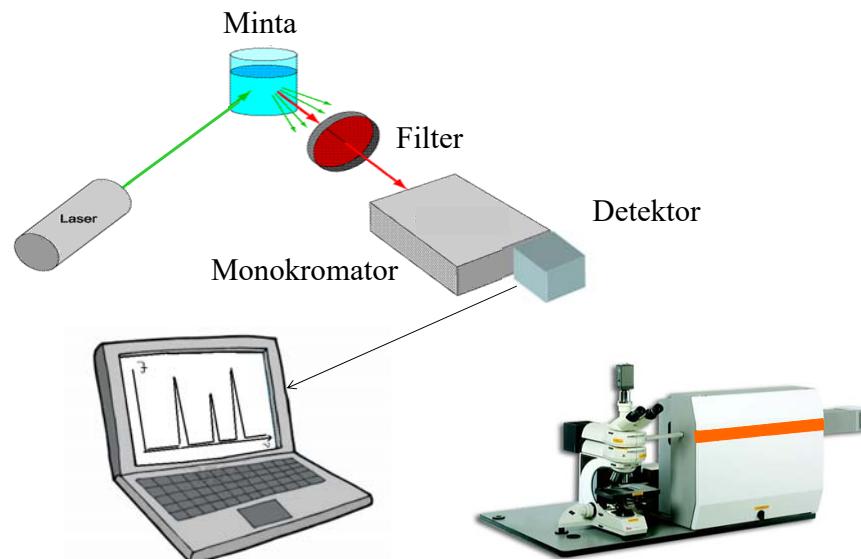
Molekularezgést kelt (ld. IR)
gyenge intenzitású



Raman spektrométer



Raman Spektrometer



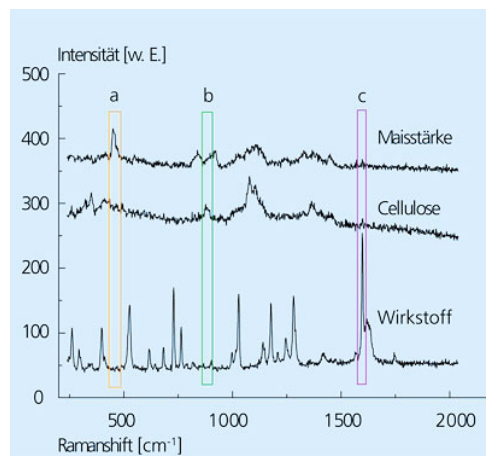
Raman-szórás, Raman spektroszkópia

A vibrációs
állapotok
jellemzőek a
molekulákra

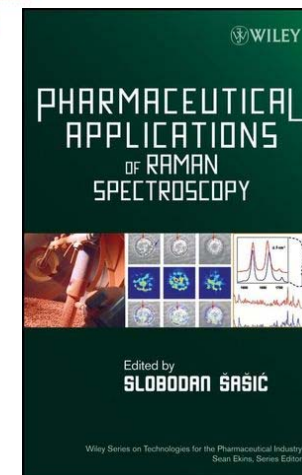
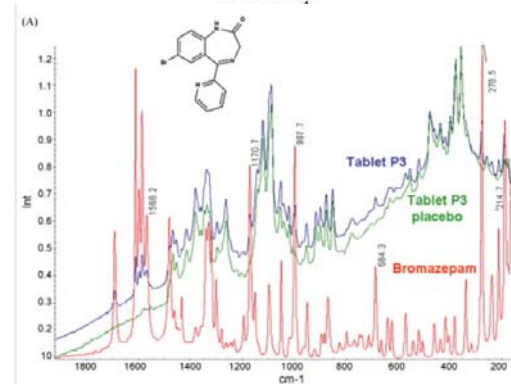
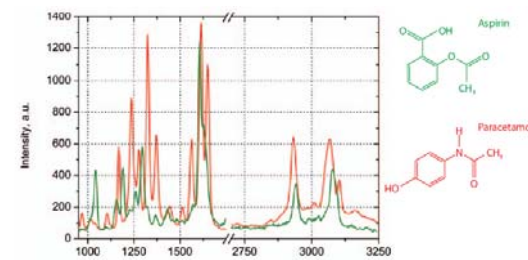


Raman
Spektroszkópia

Tabletta hatóanyag-
tartalmának mérése



<http://www.igb.fraunhofer.de/de/kompetenzen/grenzflaechentechnik/oberflaechenanalytik/ausstattung/konfokale-mikroskopie-spektroskopie/raman-spektroskopie-tablette.html>



Hordozható Raman spektrométerek anyagok azonosítására:

