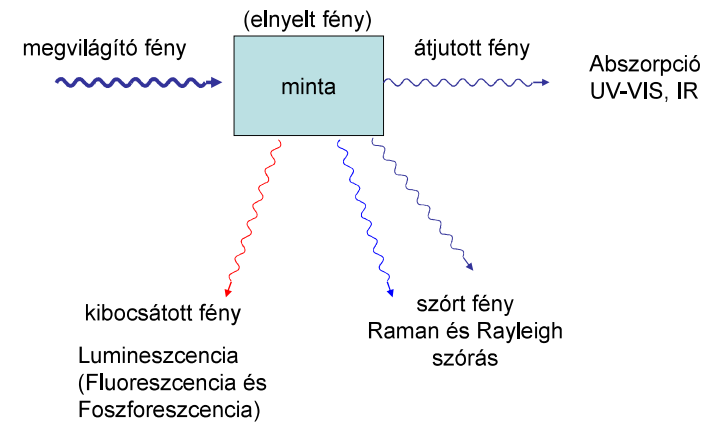


Optikai spektroszkópai módszerek

Smeller László

Mi történhet, ha egy mintát fénnel világítunk meg?

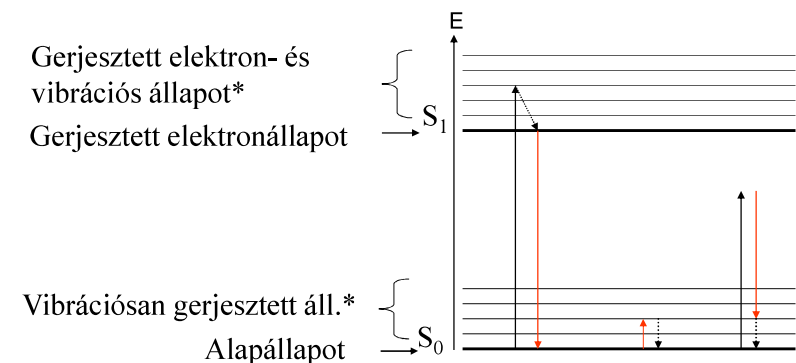


Abszorpciós és emissziós spektroszkópia

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

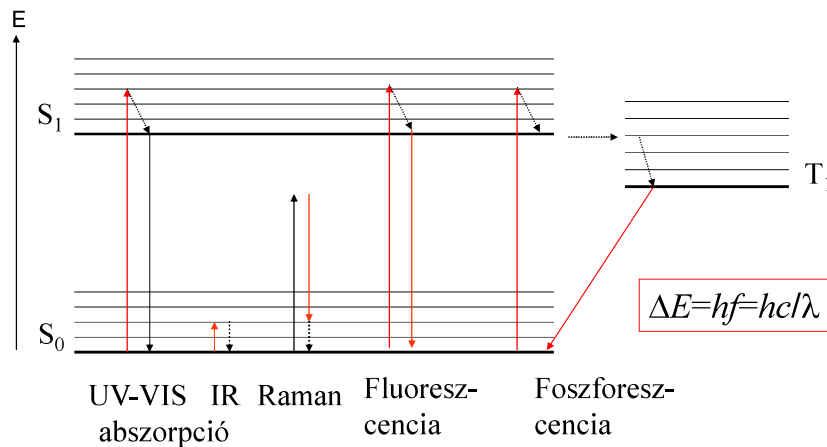
Miért nyel el ill. bocsát ki fényt egy atom v. molekula?

- 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

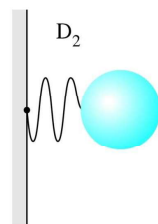
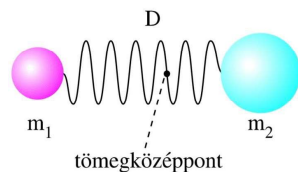
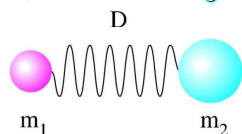
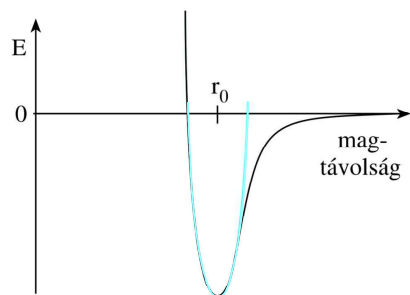
- Infravörös fény: $\lambda = 800 \text{ nm} - 1 \text{ mm}$
közép infra tartomány: $2,5 - 50 \mu\text{m}$
- abszorpciós spektroszkópia
- az elnyelt infravörös sugárzás molekularezgéseket kelt
- érzékeny a molekulaszervezetre
- speciális detektálás: FT spektrométer

Molekularezgések

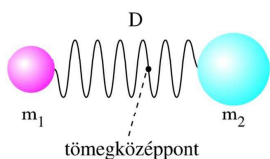
Az elektronok könnyűek, gyorsan követik az atommag mozgását, ezért az atommagok rezgéseit az elektronok nem befolyásolják.

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

Molekularezgések: kétatomos molekula



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

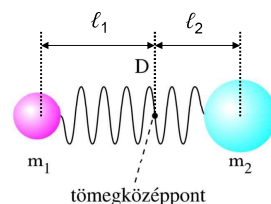
tömegnek is nevezik, ezzel a frekvencia:

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

a középiskolából ismert:

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

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



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

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

$$F = D\Delta \ell$$

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

$$\Rightarrow \lambda = 4,67 \mu\text{m} \Rightarrow f = 6,43 \cdot 10^{13} \text{ Hz} \left. \vphantom{\begin{matrix} \lambda \\ f \end{matrix}} \right\} \Rightarrow D = 1875 \text{ N/m}$$

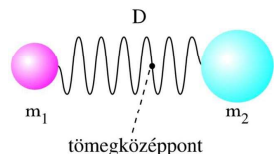
$$m_C = 2 \cdot 10^{-26} \text{ kg}, m_O = 2,7 \cdot 10^{-26} \text{ kg}$$

Ha ν ismert, D számolható

ha D ismert, ν számolható

Klasszikus fizikai rezgések és energianívók kapcsolata

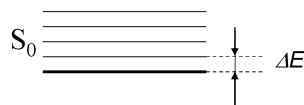
- Klasszikus kép



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

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.

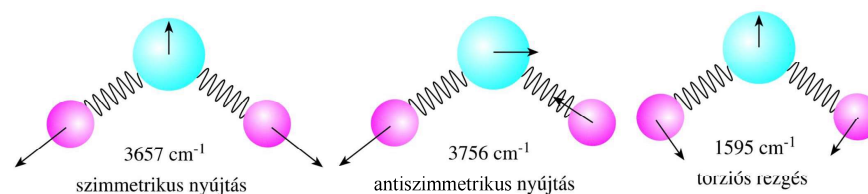
Sokatomos molekulák rezgései

N atomos molekula:

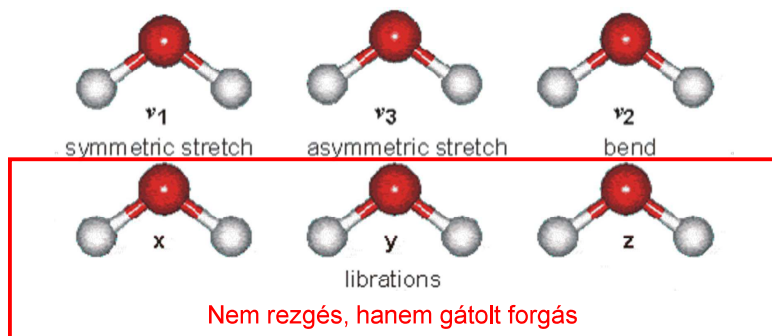
- 3N szabadsági fok, 3-3 a teljes molekula translációja ill. rotációja
- 3N-6 rezgési szabadsági fok (lineáris molekuláknál csak 3N-5)
- normálrezgések

Normálrezgések

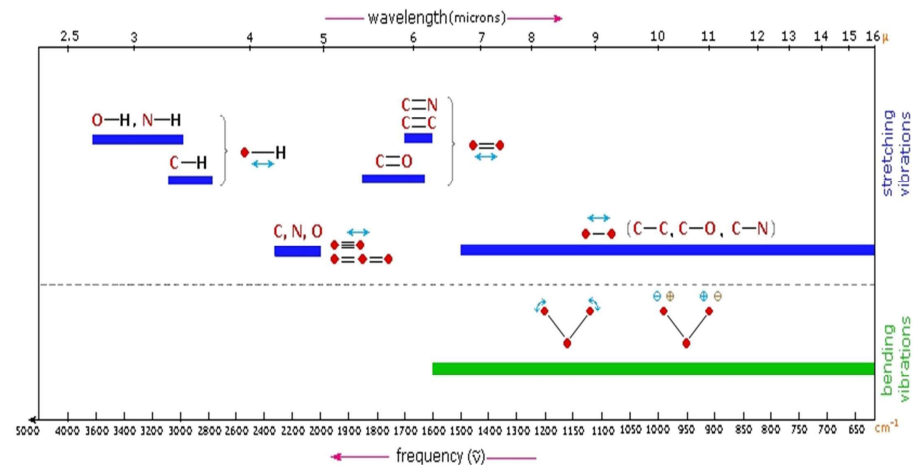
- Minden atom ugyanazzal a frekvenciával, de különböző amplitúdóval és irányban rezeg.
- Pl. víz:



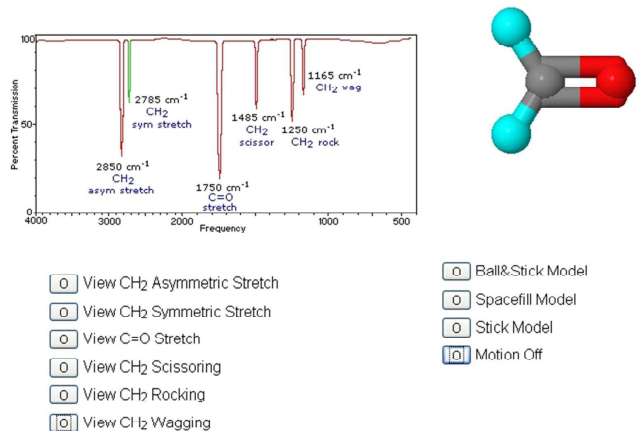
A víz normálrezgései



Néhány tipikus rezgési frekvencia



Példa: Formaldehid

Gas Phase Infrared Spectrum of Formaldehyde, H₂C=O

További példák molekuláris vibrációkra:

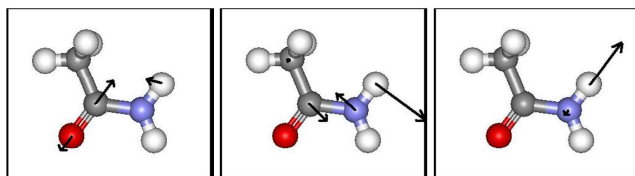
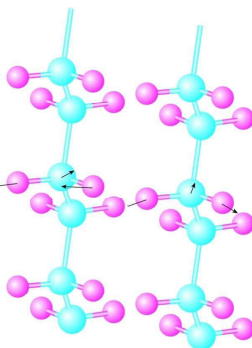
- Víz:
<https://www.youtube.com/watch?v=1uE2lvVkJW0>
- CO₂:
<https://www.youtube.com/watch?v=W5gimZIFY6I>
- Ammonia:
<https://www.youtube.com/watch?v=aSiJ2bt1jwQ>
- Etanol:
<https://www.youtube.com/watch?v=O5dulWd-OnQ>
- Benzol:
<https://www.youtube.com/watch?v=NA9etutSt7A>
- ...

Makromolekulák rezgései

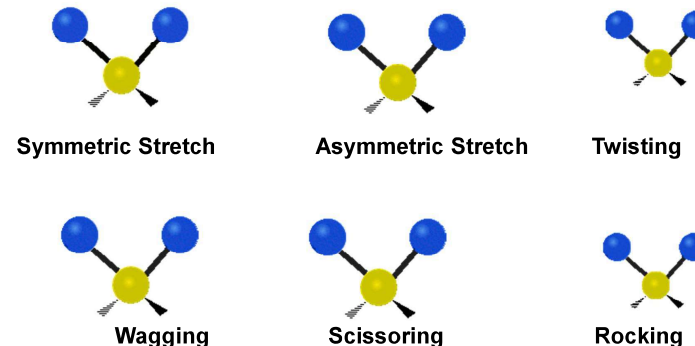
Globális rezgések (bonyolultak)

Lokalizált rezgések, pl:

- CH₂ rezgések a lipidekben
- amid rezgések a fehérjékben (acetamid rezgések)

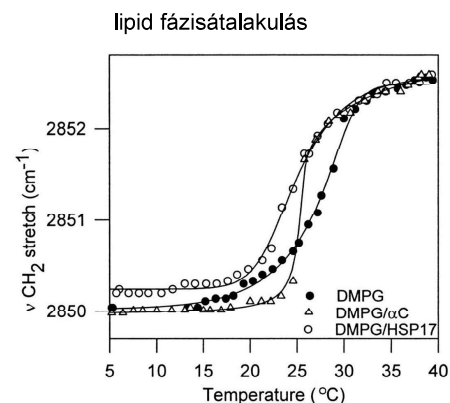


Lipidek

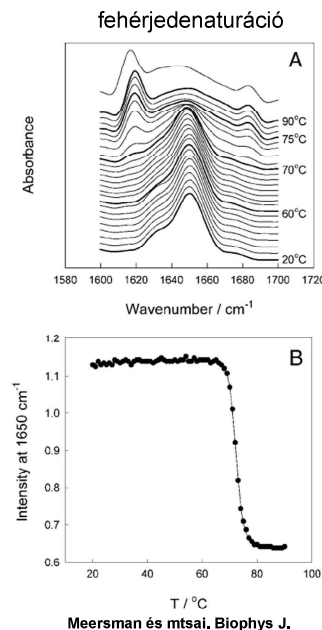


Types of Vibrational Modes. Figure from Wikipedia

Alkalmazások



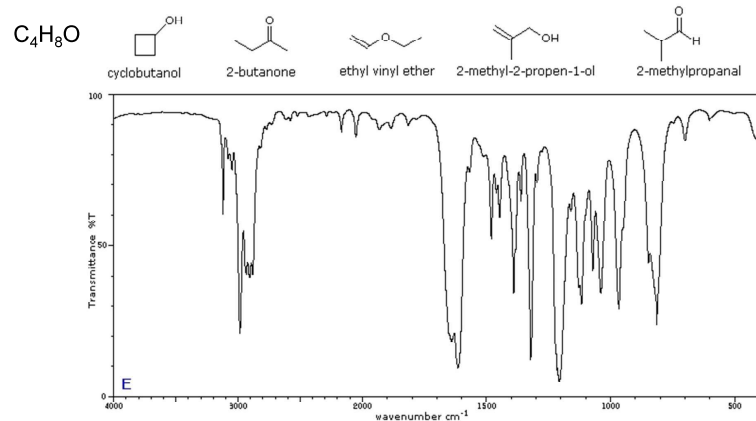
Tsvetkova és mtsai PNAS 2002 | vol. 99 | no. 21 | 13504-13509



Gyógyszerészeti alkalmazások

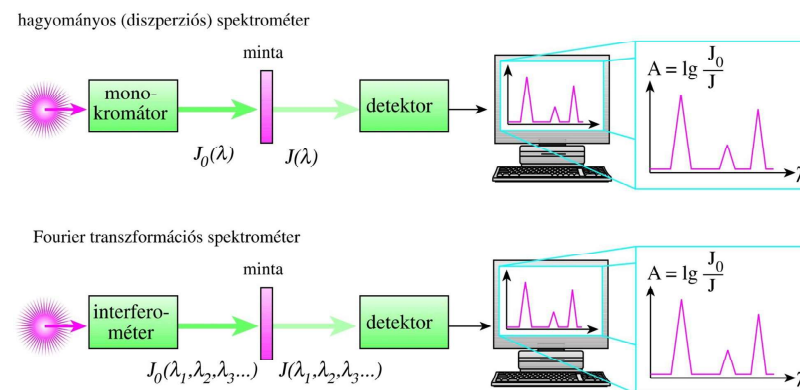
- szintézis: közti és végtermék azonosítás
- szerkezet bizonyítás
- metabolit kimutatás
- gyógyszerellenőrzés (tisztaság vizsgálat)
- Megj.: Lambert-Beer tv. itt is igaz, koncentráció meghatározás is lehetséges.

Gyógyszerészeti alkalmazás: molekula azonosítás



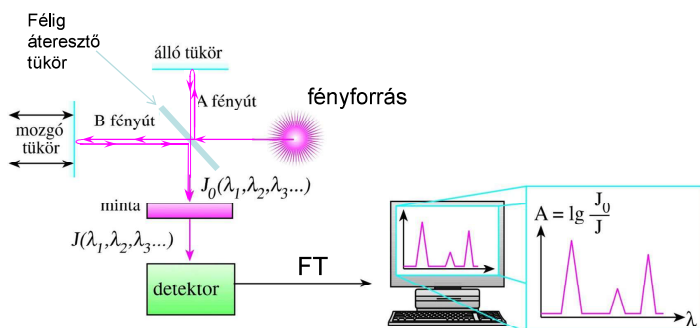
<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>

A spektrum mérése: Fourier transzformációs spektrométer (FTIR)



tk 6.17 ábra

Speciális IR módszerek: 1. IR Mikroszkópia



tk 6.18 ábra



A komponensek térbeli eloszlása

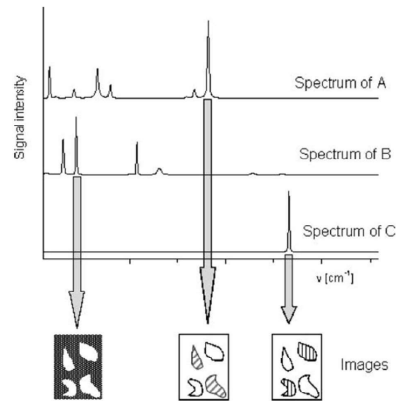


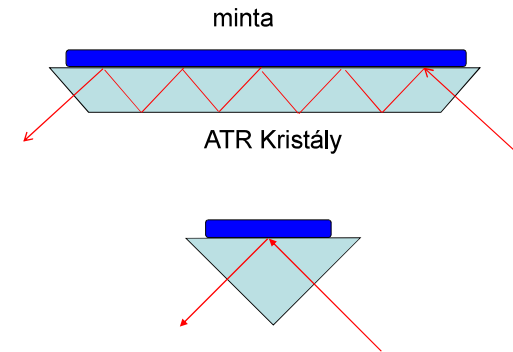
Fig. 6. The principle of vibrational spectroscopic imaging.

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

Speciális IR módszerek:

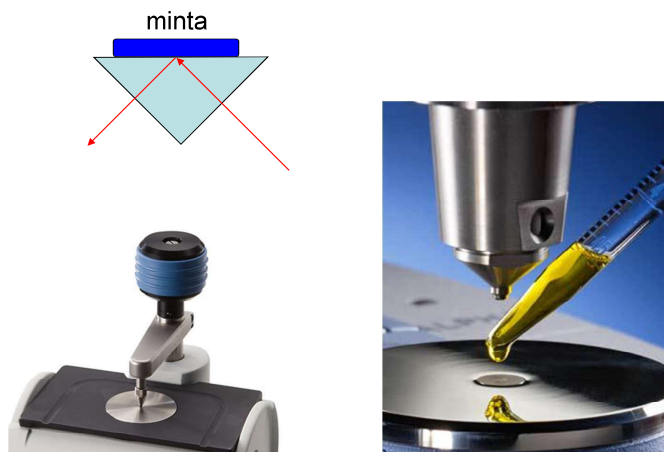
2. ATR technika

(Attenuated Totalreflexion)

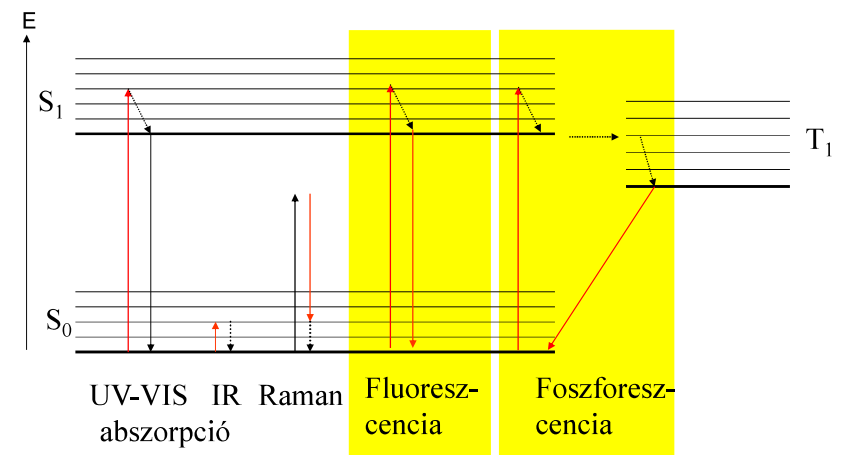


ATR technika

Nagyon egyszerű minta-előkészítés



Lumineszcencia spektroszkópia

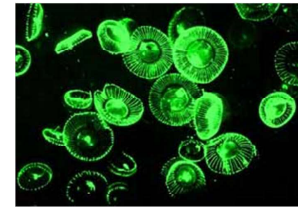
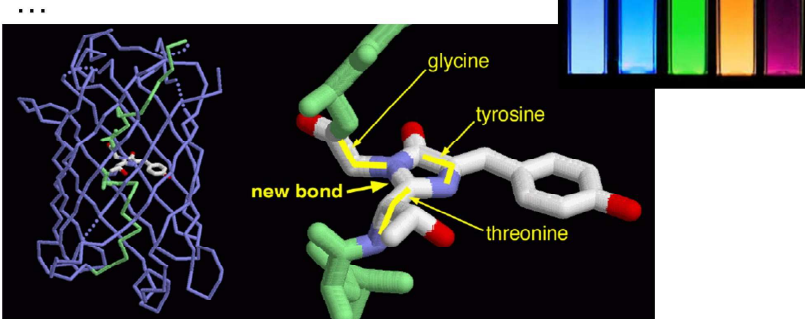


Milyen molekulák fluoreszkálnak?

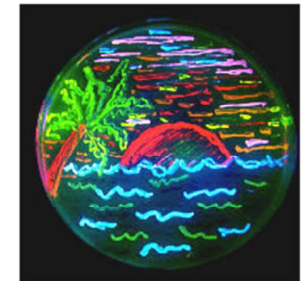
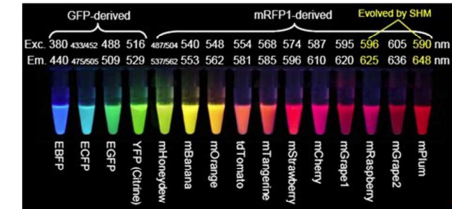
Aminosavak (triptofán, tirozin, fenilalanin)

Fluoreszcens festékek

GFP



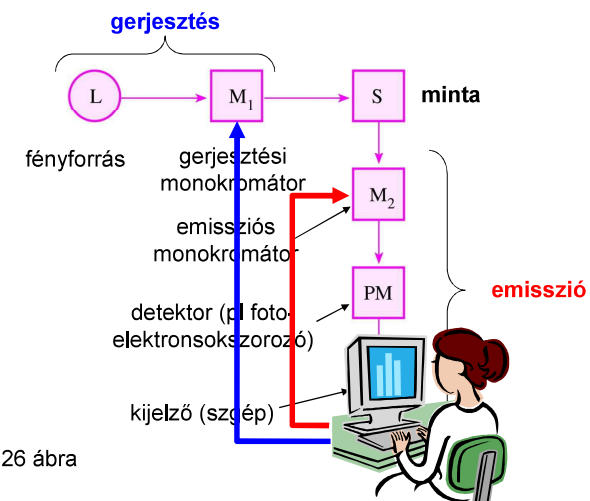
Aequorea victoria



Mérhető mennyiségek

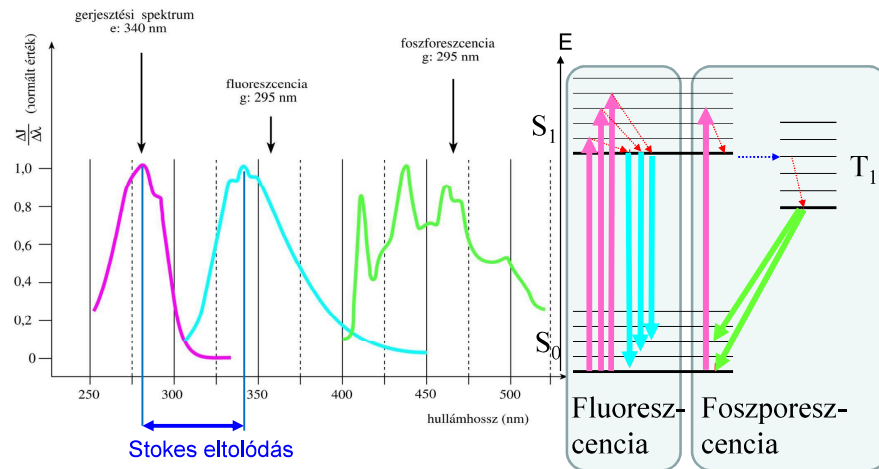
- a gerjesztő fény hullámhossza
- az emittált fény hullámhossza (fluor., foszf)
- az emittált fény időbeli eloszlása
- az emittált fény polarizációja
- az emittált fény intenzitása

A lumineszcens spektrométer felépítése



tk. 6.26 ábra

Gerjesztési, és emissziós spektrumok



tk 6.25. ábra

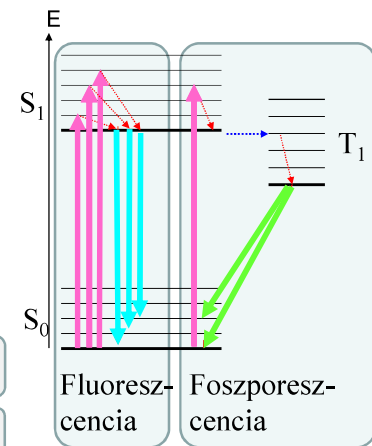
Kasha szabály

Kasha szabály:

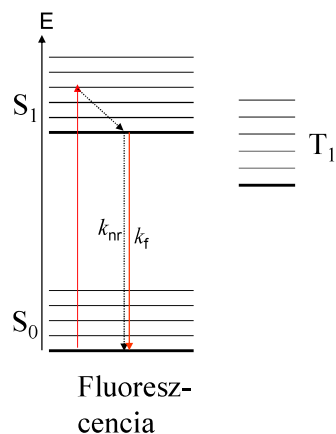
A gerjesztett molekula gyors átmenettel az S_1 elektronállapot alap vibrációs szintjére kerül és a fotonemisszió ebből az állapotból történik.

Vibrációs relaxáció (c.a. 10^{-12} s)

„Intersystem crossing”



A fluoreszcencia kvantumhatásfok (Q_f)



$$Q_f = \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{elnyelt fotonok száma}}$$

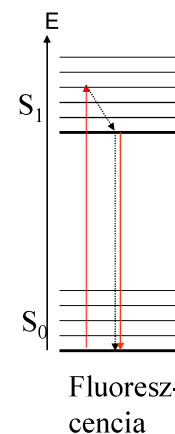
$$Q_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}}$$

k_f fluoreszcens átmenet valószínűsége

k_{nr} nem sugárzásos átm. vsz.

festékek, fl. 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:

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

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

A fluoreszcencia intenzitás lecsengése

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

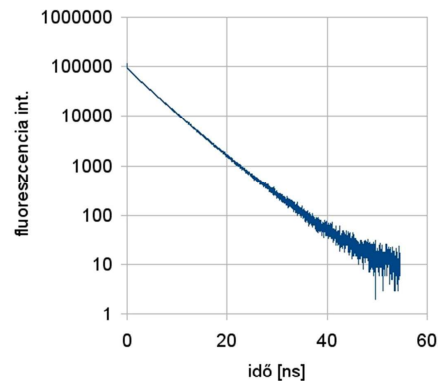
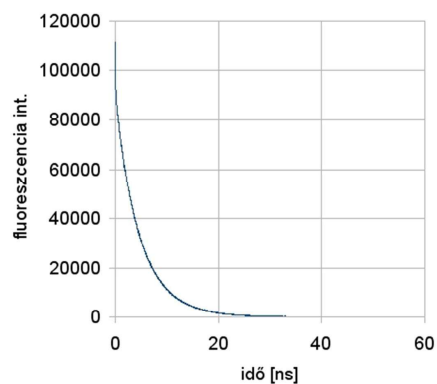
Mérése: impulzusszerű megvilágítás (villanólámpa, v. impulzuszézer), fotonszámlálás az idő függvényében.

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



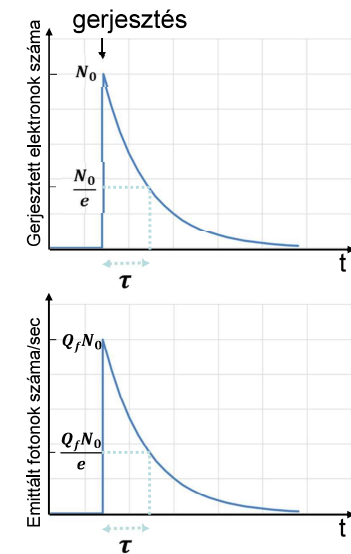
Lumineszcencia élettartam

$$N = N_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}}$$

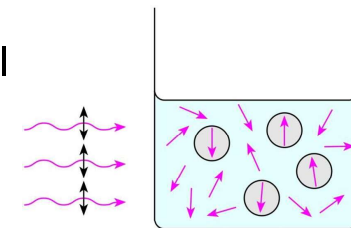
k_f : Foton kibocsátásával járó átmenetek valószínűsége ill. sebességi állandója

k_{nr} : Foton kibocsátás nélküli átmenetek valószínűsége ill. sebességi állandója



Fluoreszcencia polarizáció

polarizált fénnel világítjuk meg a mintát



mérjük, h. az emittált fény mennyire polarizált

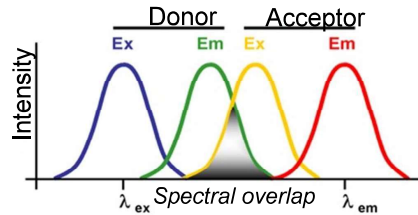
elfordulhat a gerjesztett állapot élettartama alatt \Rightarrow dinamikai információ

FRET

Förster Resonance Energy Transfer

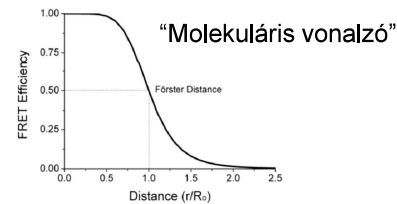
Energiaátadás két kromofor között.

- Feltételek:
- spektrális átfedés a donor emissziós és az akceptor gerjesztési spektruma között
 - térbeli közelség (tipikusan néhány nm)



$$E = \frac{1}{1 + (r/r_0)^6}$$

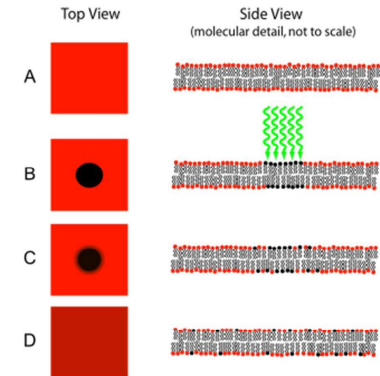
r_0 : Förster távolság



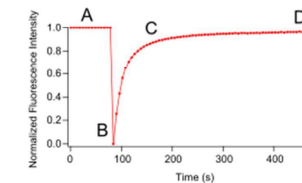
FRAP

Fluorescence Recovery After Photobleaching

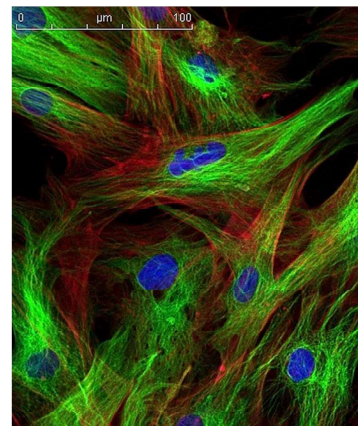
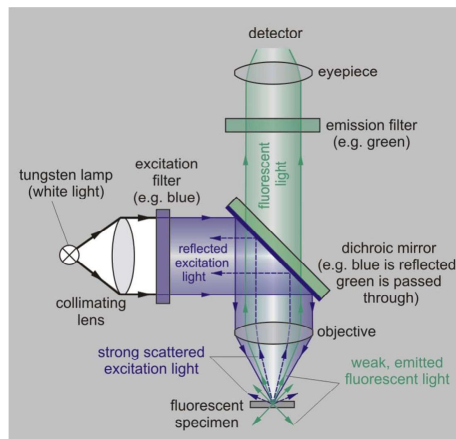
Photobleaching:
a fluoreszcencia végleges kioltása



Lipid molekulák
laterális diffúziója



Fluoreszcencia mikroszkópia



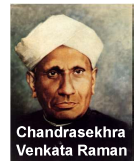
Fényszórás

Rayleigh

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

Raman

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



Raman szórás:

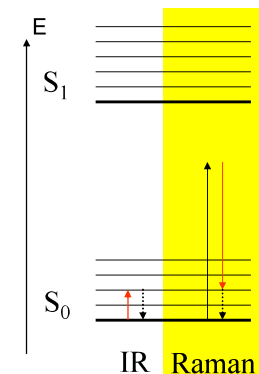
$$\lambda_{szórt} \neq \lambda_{megvil} \Rightarrow f_{szórt} \neq f_{megvil}$$

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

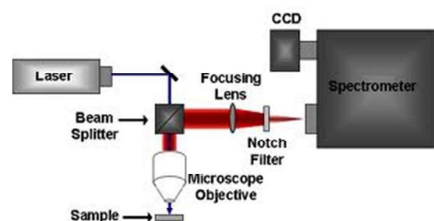
hova lett az energia?

Molekularezgést kelt (Id. IR)

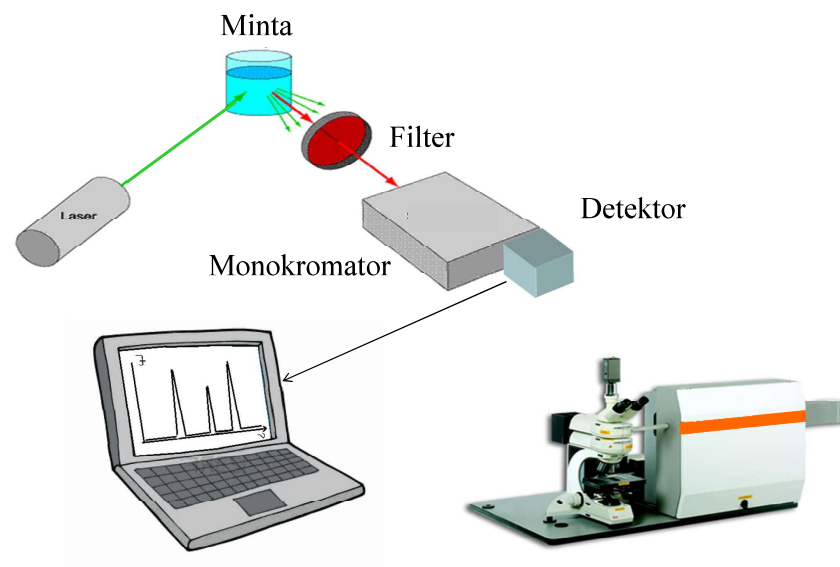
gyenge intenzitású



Raman spektrométer



Raman Spektrometer



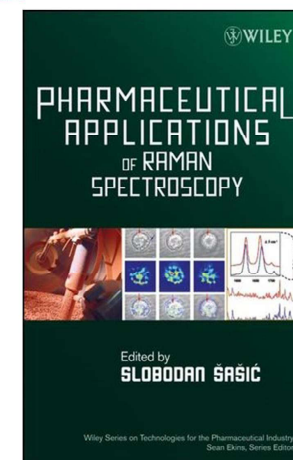
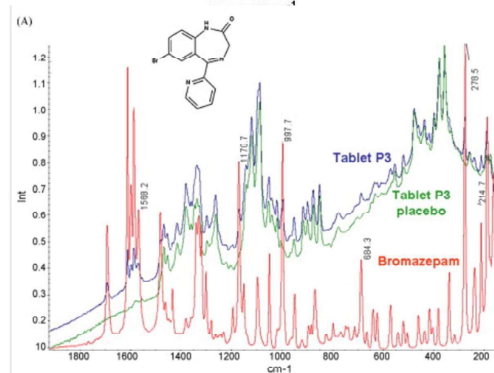
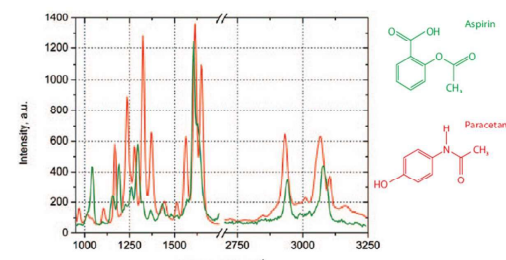
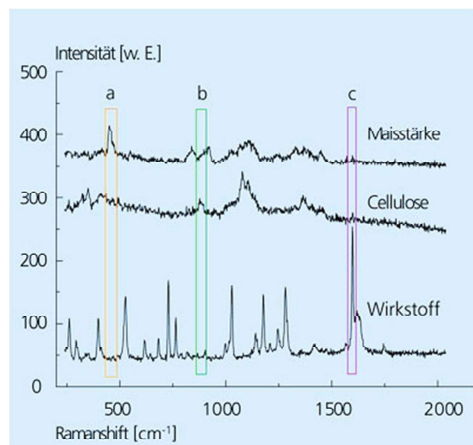
Raman-szórás, Raman spektroszkópia

A vibrációs
állapotok
jellemzők a
molekulákra



Raman
Spektroszkópia

Tabletta hatóanyag-
tartalmának mérése



Hordozható Raman spektrométerek anyagok azonosítására



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

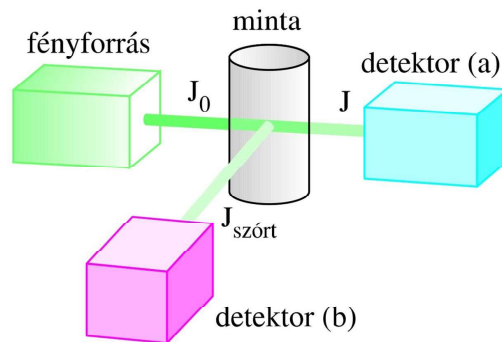
ha $J_{\text{szórt}} \ll J_0$

$J_{\text{szórt}}$ -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

