

INFRAČERVENÁ A RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

aneb

CO NÁM MOHOU VIBRACE ŘÍCI O (BIO)MOLEKULÁCH

Vladimír Baumruk

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta
Fyzikální ústav UK



vibrační spektroskopie

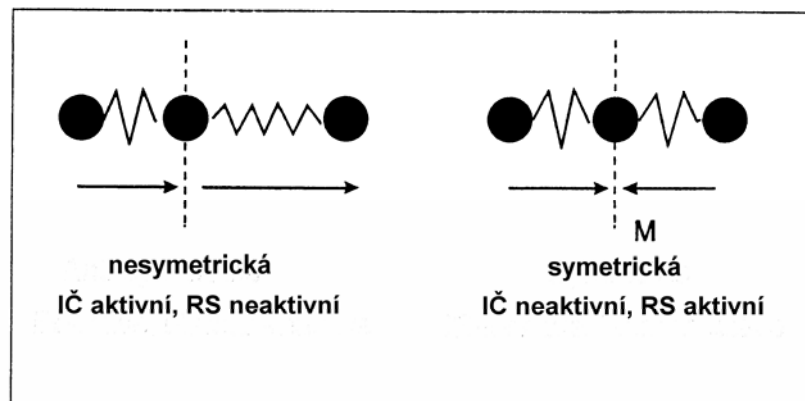
- **infračervená spektroskopie (IČ)**
- **Ramanova spektroskopie (RS)**

CO_2 - lineární molekula ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$) se středem symetrie

$n = 3 \Rightarrow 3n - 5 = 4 \Rightarrow$ 2 valenční vibrace \Rightarrow nesymetrická \Rightarrow **aktivní v IČ**
 \Rightarrow symetrická \Rightarrow **aktivní v RS**
 \Rightarrow 2 deformační vibrace (degenerované) \Rightarrow **aktivní v IČ**

střed symetrie \Rightarrow alternativní zákaz

vibrace aktivní v IČ spektru nejsou aktivní v Ramanově spektru a vice versa (tedy komplementarita IČ a Ramana)



frekvence vibrace

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

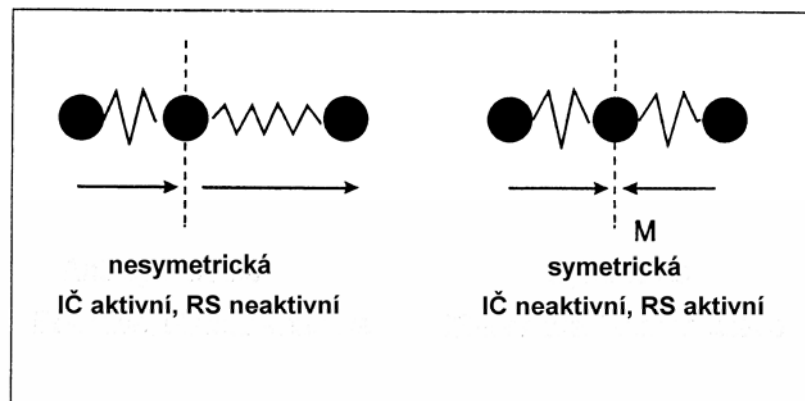
f – silová konstanta (síla vazby)
 μ – redukovaná hmotnost

CO_2 - lineární molekula ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$) se středem symetrie

$n = 3 \Rightarrow 3n - 5 = 4 \Rightarrow$ 2 valenční vibrace \Rightarrow nesymetrická \Rightarrow **aktivní v IČ**
 \Rightarrow symetrická \Rightarrow **aktivní v RS**
 \Rightarrow 2 deformační vibrace (degenerované) \Rightarrow **aktivní v IČ**

střed symetrie \Rightarrow alternativní zákaz

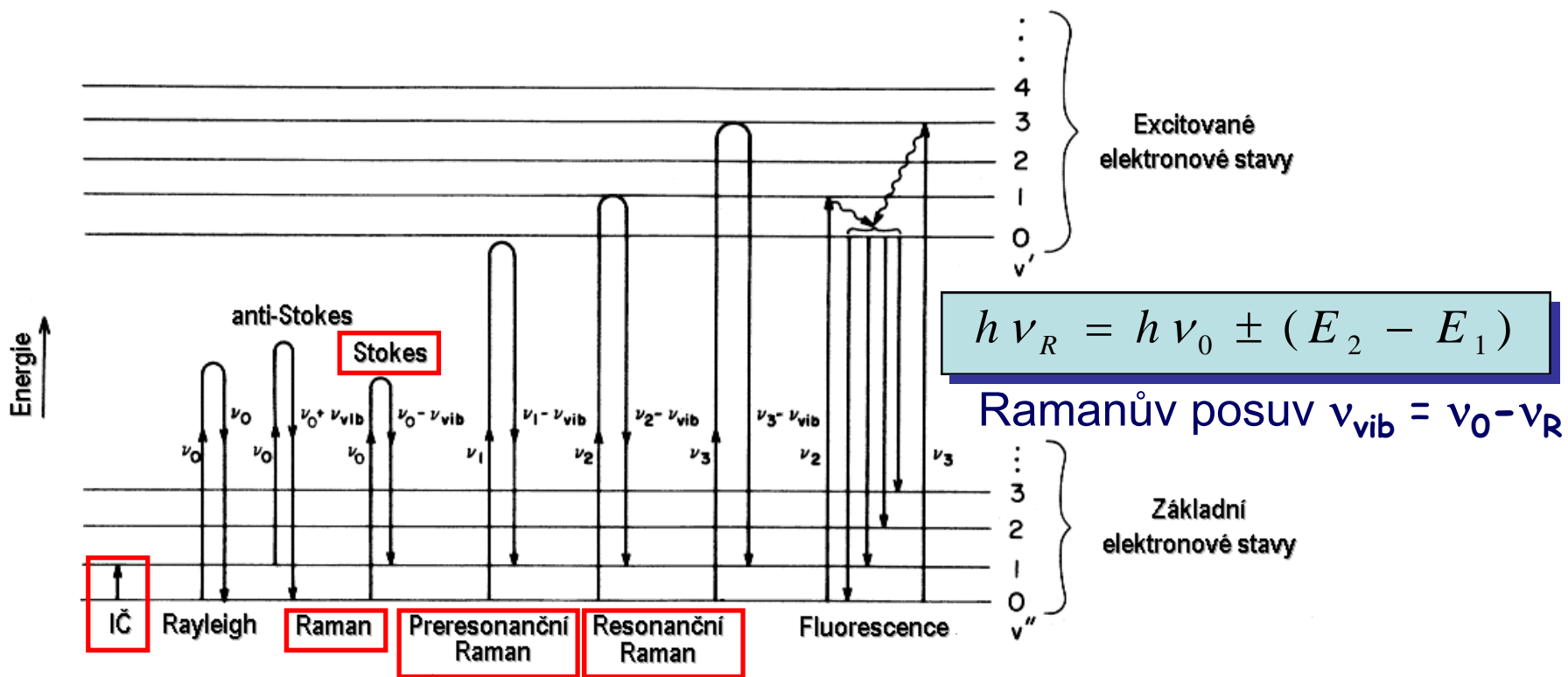
vibrace aktivní v IČ spektru nejsou aktivní v Ramanově spektru a vice versa (tedy komplementarita IČ a Ramana)



frekvence vibrace

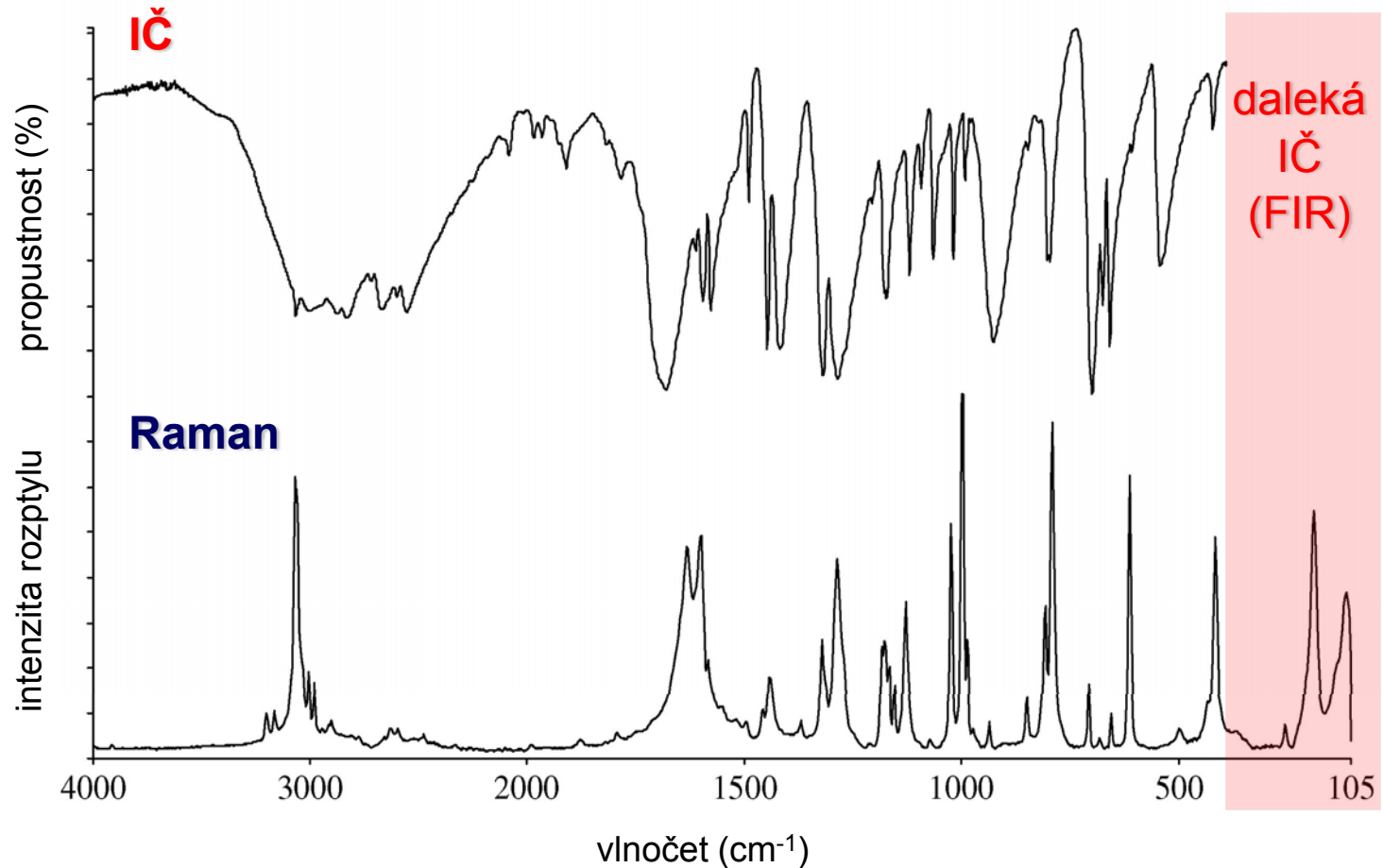
$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{f}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

f – silová konstanta (síla vazby)
 μ – redukovaná hmotnost



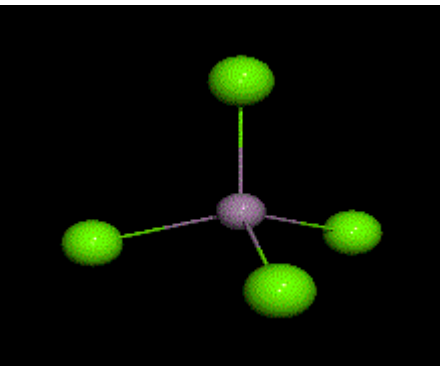
$$\left(\frac{\partial \bar{\mu}}{\partial Q_k} \right) \neq 0 \Rightarrow \text{vibrace aktivní v IČ spektru (změna dipólového momentu)}$$

$$\left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_k} \right) \neq 0 \Rightarrow \text{vibrace aktivní v Ramanově spektru (změna polarizovatelnosti)}$$

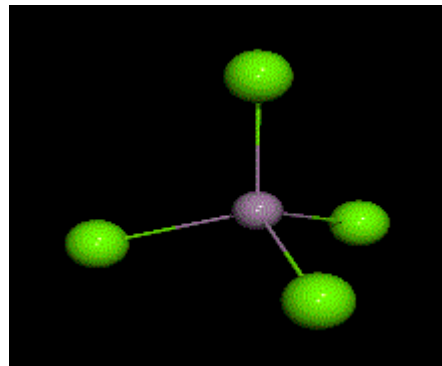


Infračervené absorpční a Ramanovo spektrum kyseliny benzoové

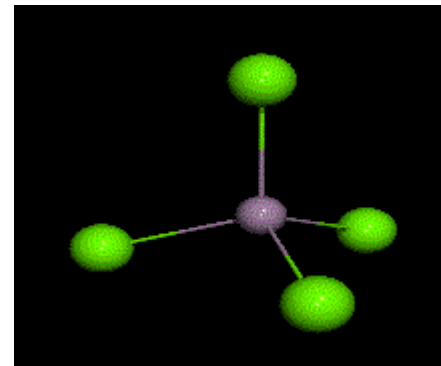
Jednoduché molekuly – symetrie a vibrace (příklad CCl_4)



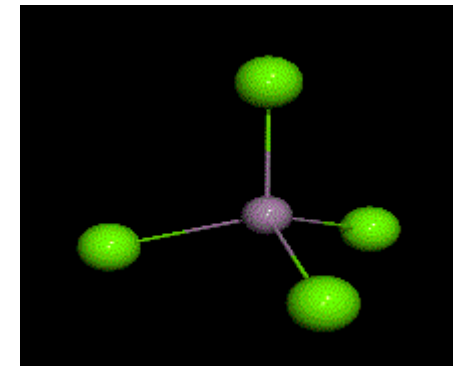
ν_2 214 cm^{-1}
2x degenerovaná



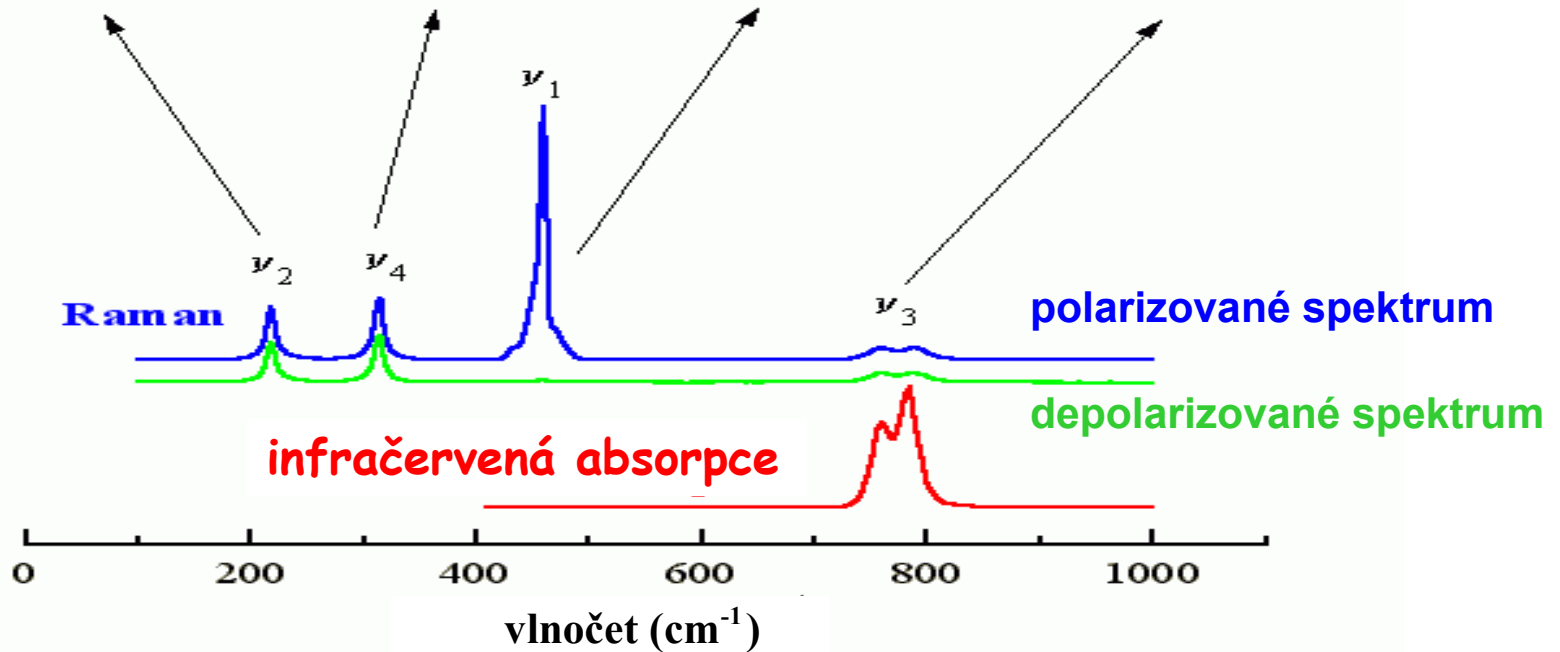
ν_4 313 cm^{-1}
3x degenerovaná



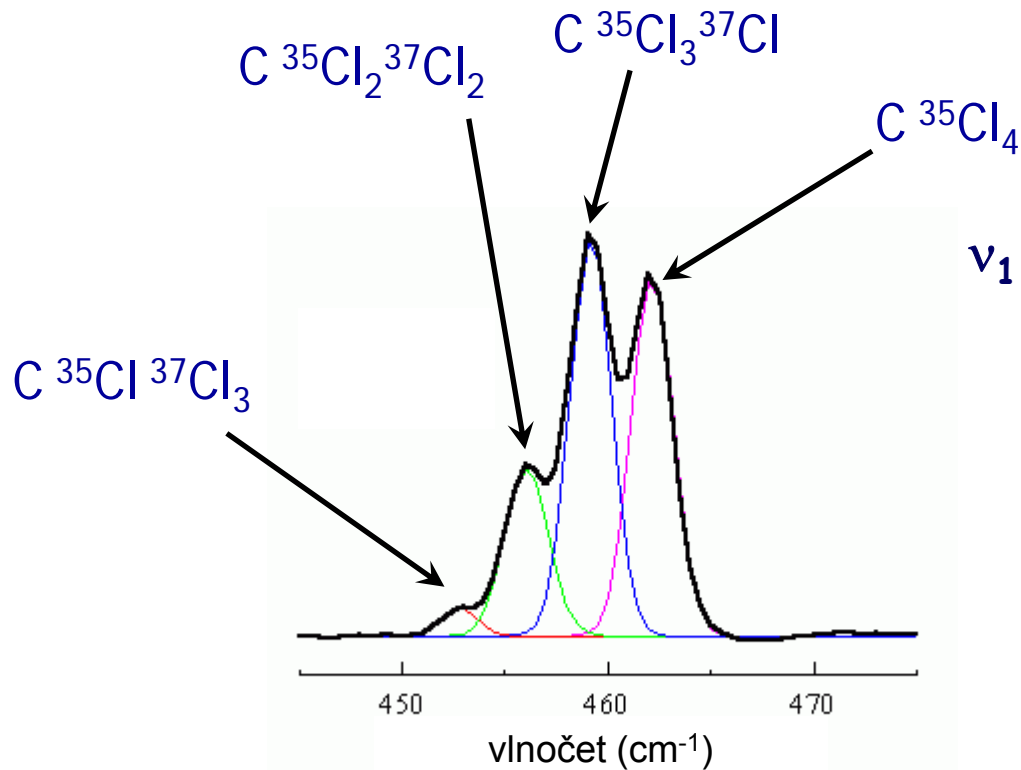
ν_1 460 cm^{-1}
plně symetrická



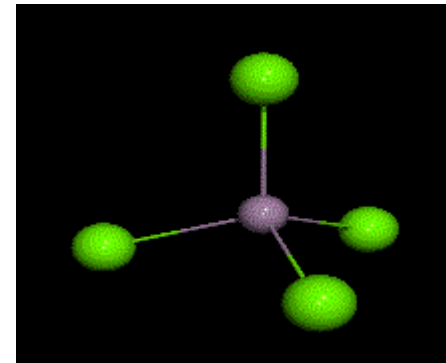
ν_3 780 cm^{-1}
3x degenerovaná



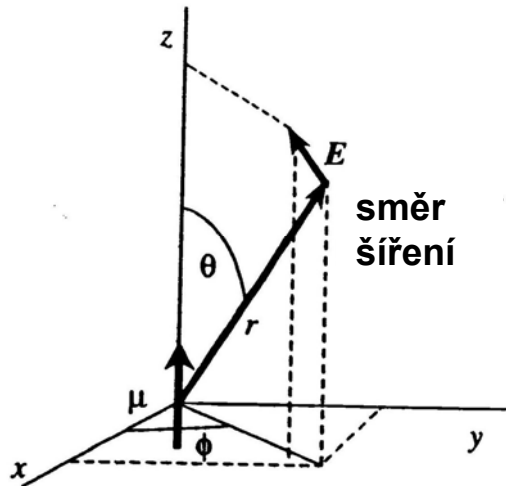
Detailní pohled na ν_1 pás v Ramanově spektru CCl_4



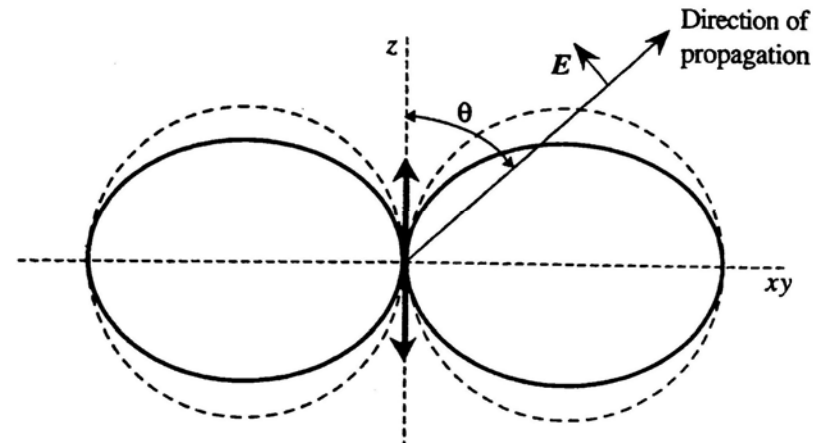
ν_1 - symetrická valenční vibrace



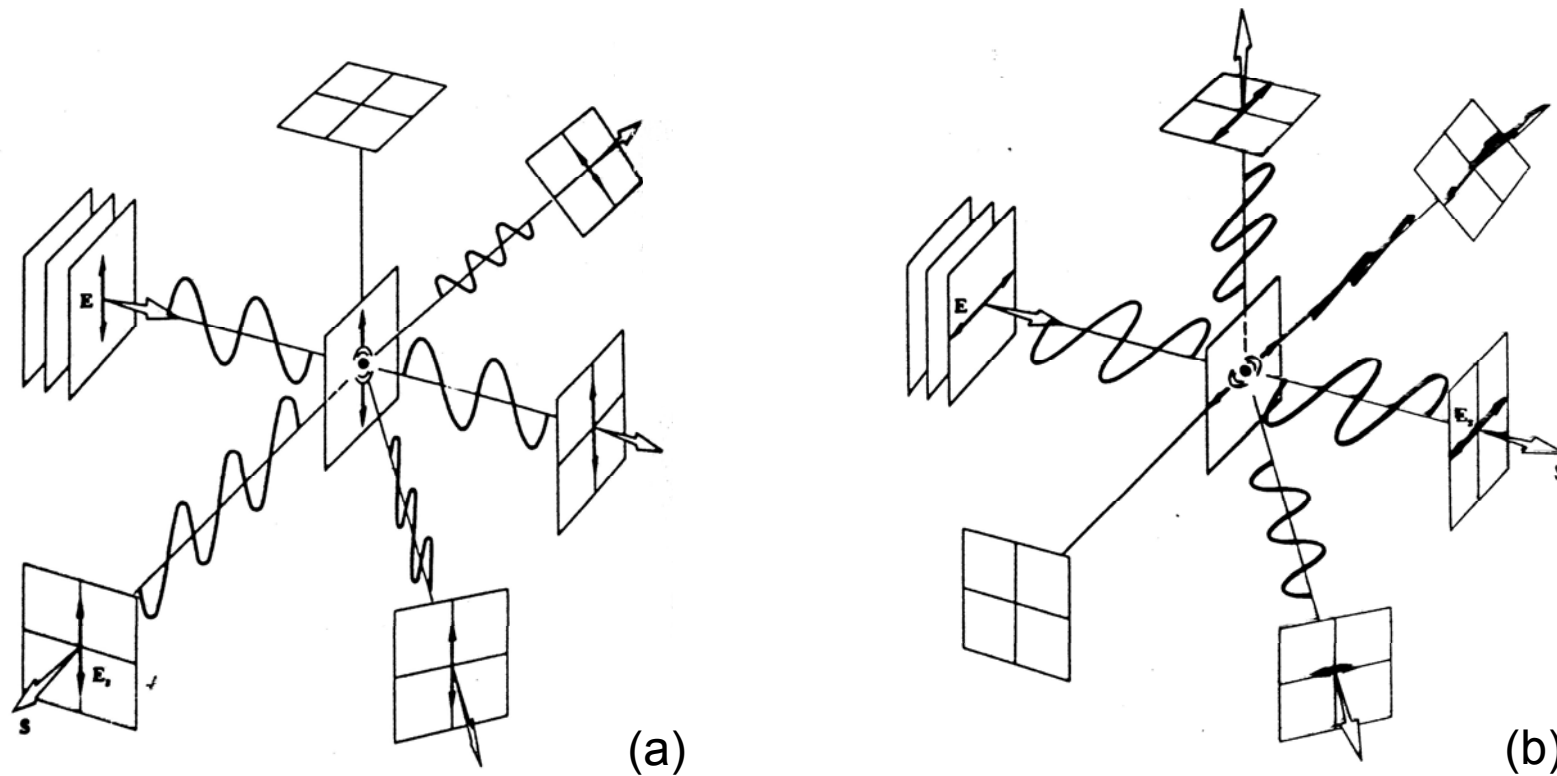
Izotopické štěpení díky existenci dvou stabilních izotopů ^{35}Cl a ^{37}Cl (jednotlivé komponenty odpovídají různému zastoupení těchto dvou izotopů v molekule CCl_4)



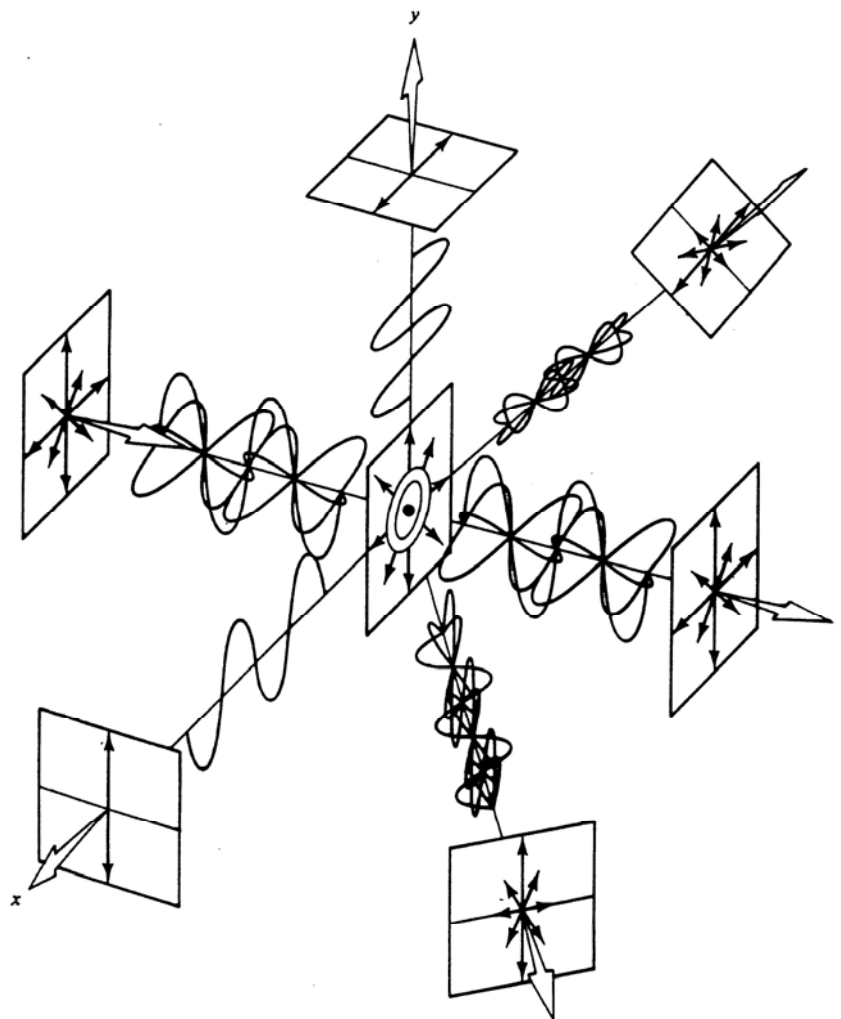
Oscilující elektrický dipól



Úhlové rozdělení amplitudy E (---) a zářivosti I (—) oscilujícího elektrického dipólu.



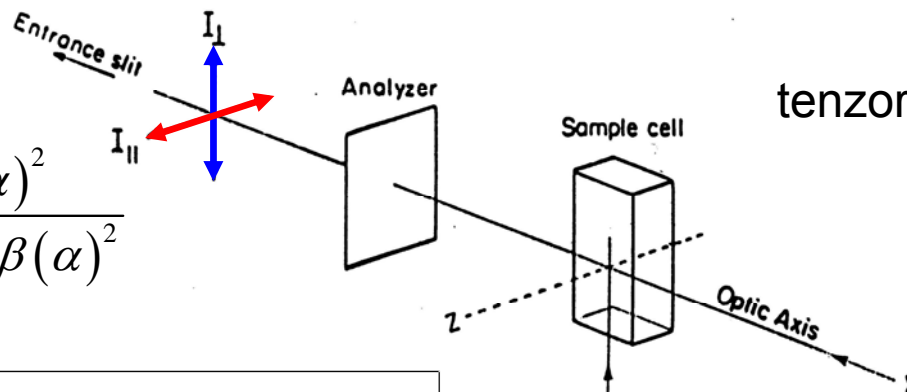
Rozptyl lineárně polarizovaného světla molekulou



Rozptyl nepolarizovaného světla molekulou

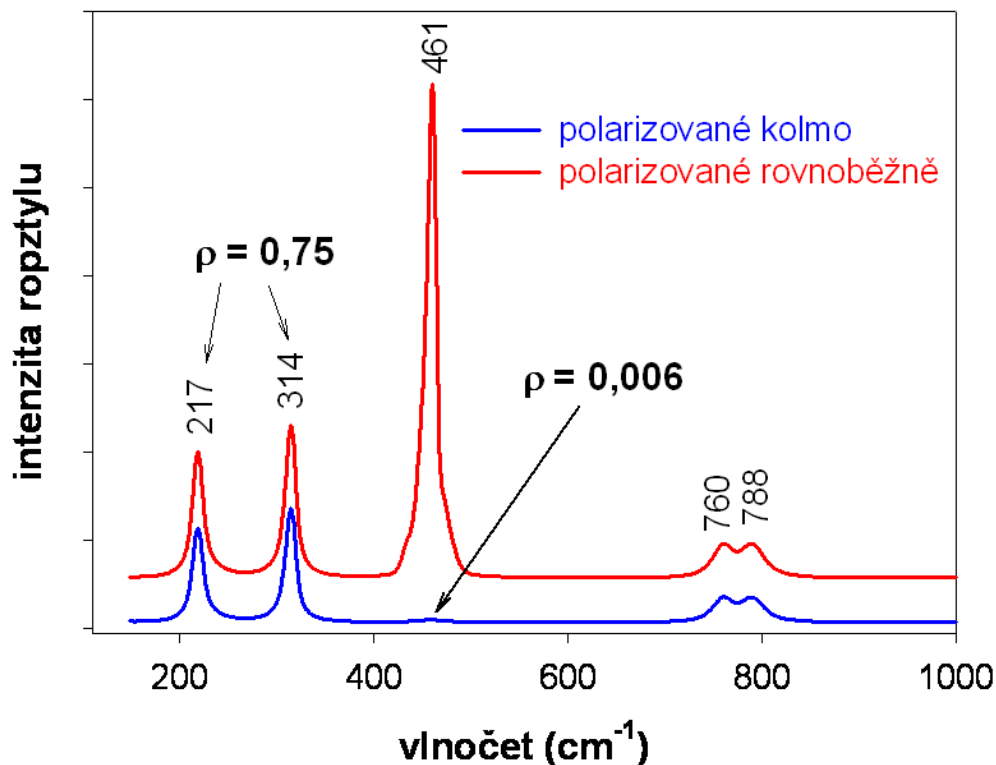
Depolarizační poměr

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} = \frac{3\beta(\alpha)^2}{45\alpha^2 + 4\beta(\alpha)^2}$$



tenzor polarizovatelnosti

$$\vec{\mu} = \vec{\alpha} \vec{E}$$



izotropní invariant

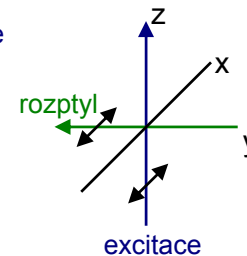
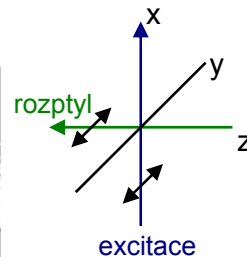
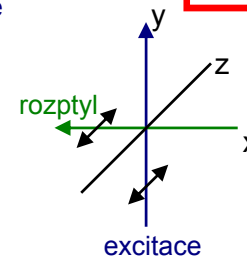
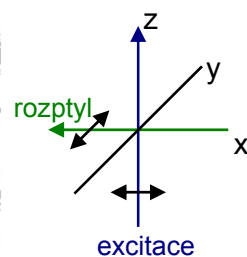
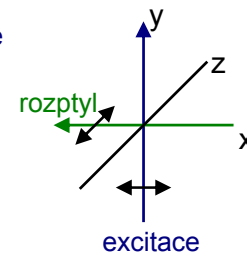
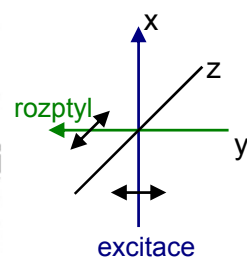
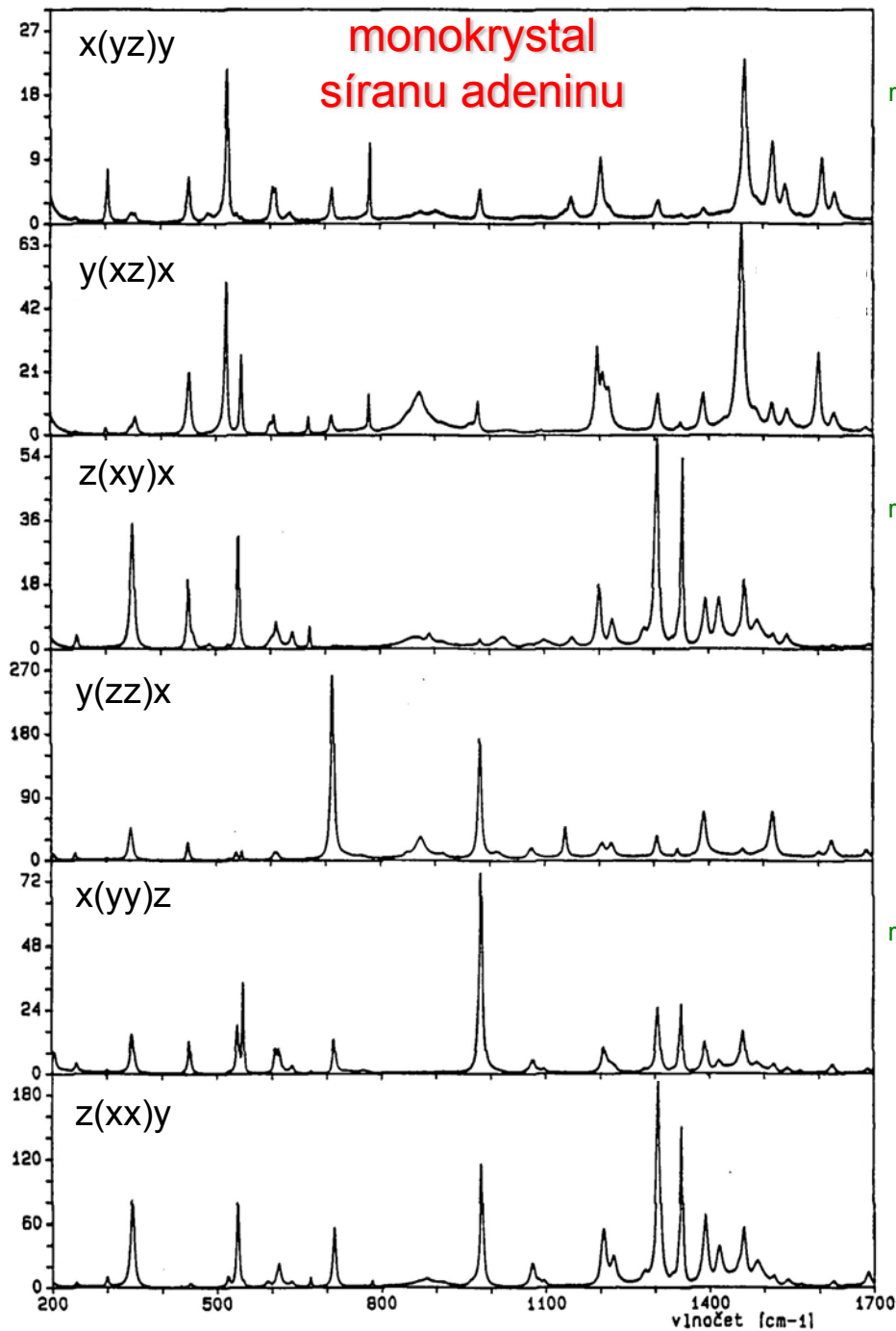
$$\alpha = \frac{1}{3} \alpha_{\alpha\alpha}$$

$$\beta(\alpha)^2 = \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta} \alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha} \alpha_{\beta\beta})$$

anizotropní invariant

Totální spektrum

$$I_{tot} = I_{\parallel} + I_{\perp} = 45\alpha^2 + 7\beta(\alpha)^2$$

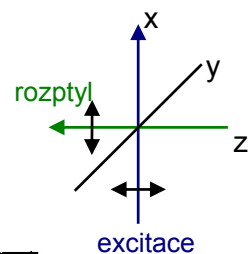
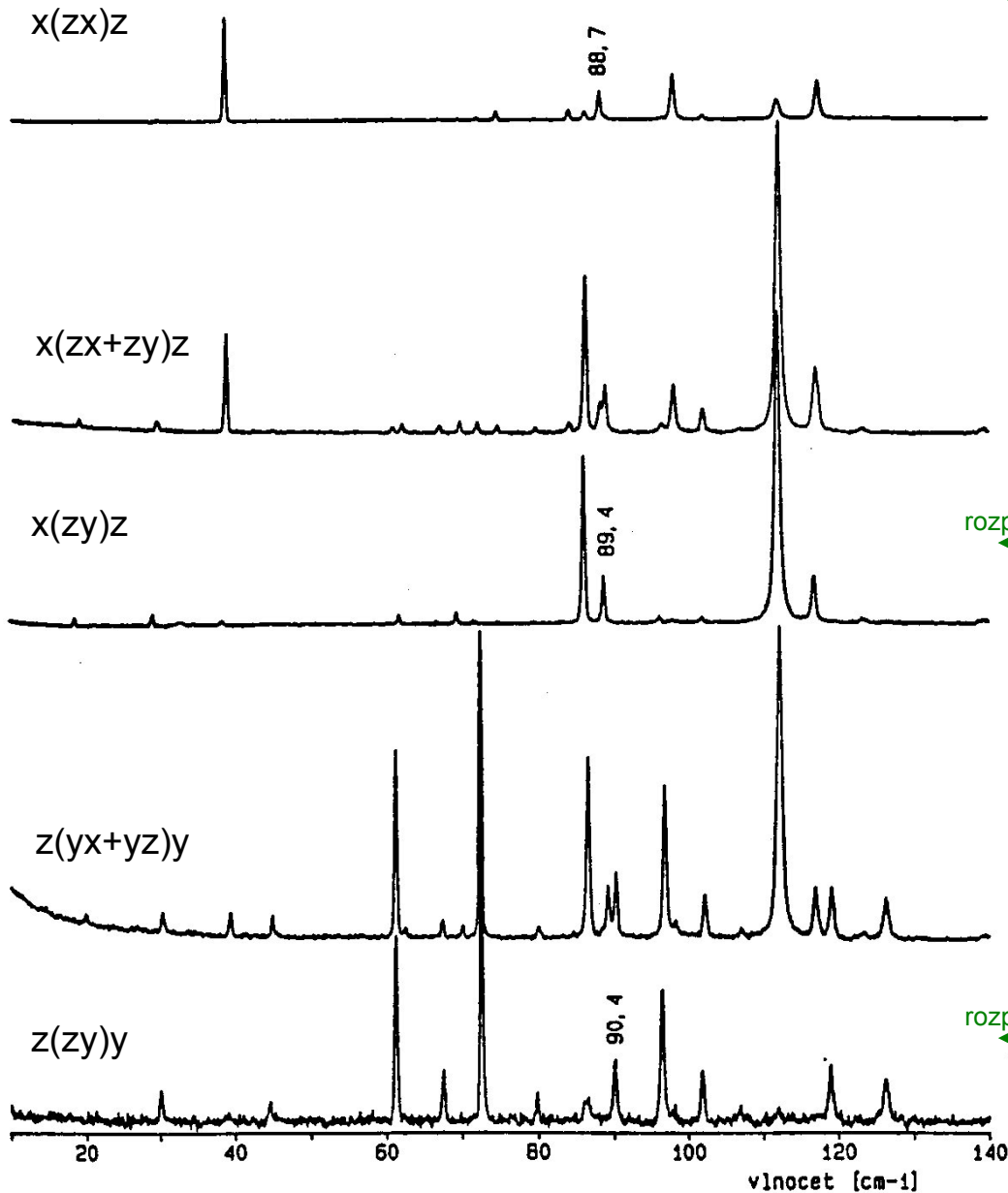


Polarizovaná Ramanova spektra orthorombického monokrystalu

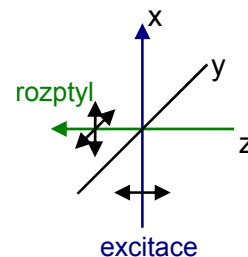
Portova notace
 $x(yy)z$

T=300K
oblast vnitro-
molekulárních
vibrací

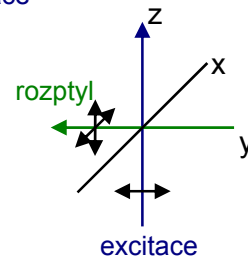
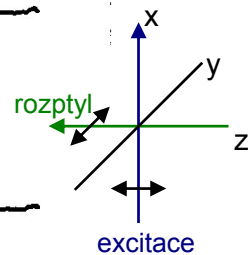
monokrystal síranu adeninu



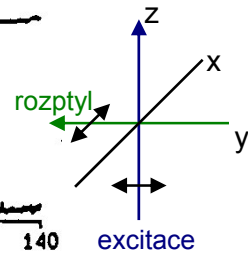
Polarizovaná Ramanova spektra orthorombického monokrystalu



bez analyzátoru



bez analyzátoru



T=10K
nizkofrekvenční oblast
(mezimolekulární vibrace)

Zákony zachování momentu hybnosti a energie vyžadují

$$\vec{k}_i - \vec{k}_s = \vec{K}$$
$$\omega_i - \omega_s = \pm\Omega$$

Máme-li dobře definovaný dopadající svazek (ω_i, \vec{k}_i) , z měření frekvence a momentu rozptýleného záření (ω_s, \vec{k}_s) získáme informaci o studovaném systému (Ω, \vec{K})

VIS záření $\Rightarrow |\vec{k}| = \frac{2\pi}{\lambda} = \begin{cases} 1,57 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} & \text{pro } \lambda = 400 \text{ nm} \\ 0,79 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} & \text{pro } \lambda = 800 \text{ nm} \end{cases}$,

a tedy $\max |\vec{K}| = 2|\vec{k}_i| \sim 2 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$ pro $\vec{k}_s = -\vec{k}_i$

což je mnohem méně než $1/a$ kde a je meziatomová vzdálenost

V pevných látkách bude tedy studium pomocí rozptylu světla omezeno prakticky na střed Brillouinovy zóny $\left\langle \mathbf{0}, \frac{\pi}{a} \right\rangle$. Jestliže $a \sim 1 \text{ nm}$, potom $\frac{\pi}{a} \sim 10^7 \text{ cm}^{-1}$.

Metodami rozptylu světla tedy nelze studovat disperzní závislosti v širokém oboru $|\vec{K}|$, ale vlastně jen v oblasti $|\vec{K}| \rightarrow \mathbf{0}$.

Table 1. The range of energy and momentum parameters in a number of scattering experiments

Radiation	Wavelength (Å)	Momentum (\AA^{-1})	Energy (eV)	Energy transfer (eV)
Neutrons	0.2–10	5–0.1	0.1–0.002	0.1–0.002
Electrons	0.01–100	100–0.01	$\sim 5 \times 10^4$ –0.1	Wide
X-ray	1	1	$\sim 10^4$	Wide
Visible light				
Raman	5×10^3	2×10^{-4}	3	0.5 – 5×10^{-4}
Brillouin	5×10^3	2×10^{-4}	3	10^{-8} – 10^{-6}
Rayleigh linewidth	5×10^3	2×10^{-4}	3	10^{-8} – 10^{-14}

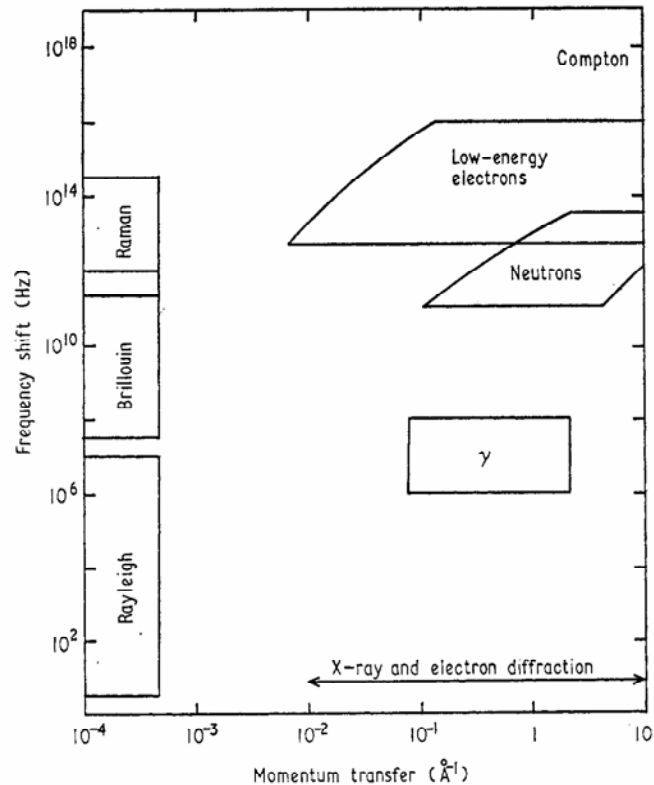
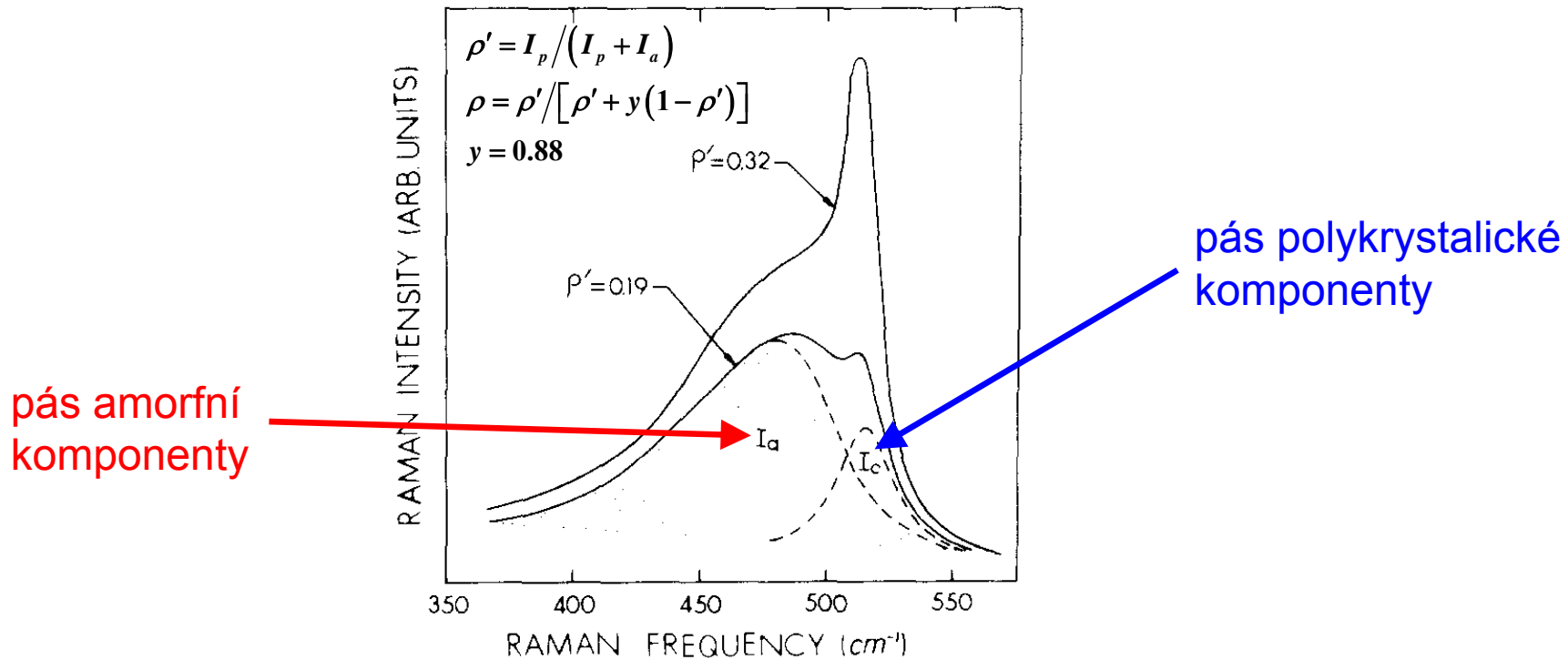


Figure 2. The regions of frequency–momentum space covered by several scattering techniques.



Dvoufázový systém - mikrokrystalický křemík v amorfni matrici

Tsu et al. Appl. Phys. Lett. 40, 534 (1982)

- ✓ strukturní informaci lze získat v relativně krátkém čase (proto nachází využití například v proteomice)
- ✓ neomezuje se pouze na statický obrázek (citlivost ke změnám, možnost dynamických studií)
- ✓ velikost studovaných molekul a povaha okolního prostředí nepředstavují žádné omezení (a nebo jen výjimečně)
- ✓ je to mimořádně vhodná metoda pro zkoumání vztahu mezi **strukturou a funkcí biomolekul**

- **RS a IČ jsou nedestruktivní metody** (možnost testování biologické aktivity po skončení měření).
- **Aplikovatelné na vzorky libovolné morfologie** (roztoky vodné i nevodné, suspenze, precipitáty, gely, vrstvy, vlákna, prášky, monokrystaly, ...). Pro biomolekuly lze tak ověřit nakolik se shoduje či naopak odlišuje jejich struktura v krystalu a v roztoku.
- **Nenáročné na objem vzorku** (cca 10 ml pro konvenční RS, 20 ml pro IČ).
- **Rychlá časová škála absorpce i rozptylu ($\approx 10^{-15}$ s)** - využití vibrační spektroskopie pro časově rozlišené studie procesů, které nejsou přístupné pomocí fluorescence či NMR.
- **Existence rozsáhlé databáze IČ a Ramanových spekter** (včetně přiřazení pásů jednotlivým vibracím a známých strukturně-spektrálních korelací).

Specifické výhody Ramanovy spektroskopie

- Voda představuje ideální rozpouštědlo pro Ramanovu spektroskopii (na rozdíl od IČ).
- Intenzivní pásy v Ramanových spektrech pocházejí od vibrací, při kterých dochází k velké změně polarizovatelnosti (např. aromatické molekuly).
- Relativně snadné měření i v oblasti nízkých vlnočtů (pod 400 cm^{-1} , daleká IČ oblast) v jediném experimentu se základní oblastí
- Selektivní rezonanční zesílení (tzv. rezonanční Ramanův jev).
- Povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS)
(design SERS aktivního povrchu spadá do oblasti nanotechnologií)

- Spektrální rozlišení je sice vyšší než v elektronových spektrech, ale nižší ve srovnání s NMR. Nedostatečné rozlišení může být částečně kompenzováno chemickou (izotopická záměna) nebo biologickou (bodová mutace) modifikací.
- Jsou potřeba relativně vysoké koncentrace vzorku ($\approx 10\text{-}100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) byť v malých objemech.
- Jak H_2O tak i D_2O nejsou ideálním rozpouštědlem pro IČ spektroskopii (na rozdíl od Ramanova rozptylu).
- Ramanův jev (nepružný rozptyl světla) je ze své podstaty slabý jev (ve srovnání s absorpcí nebo emisí světla). Je tedy nutná značná čistota vzorků a péče při manipulaci s nimi (velmi vadí fluorescence příměsí).