

Co je ve zkumavce? alias úvod do spektroskopických metod



5 minut?



Co je ve zkumavce?

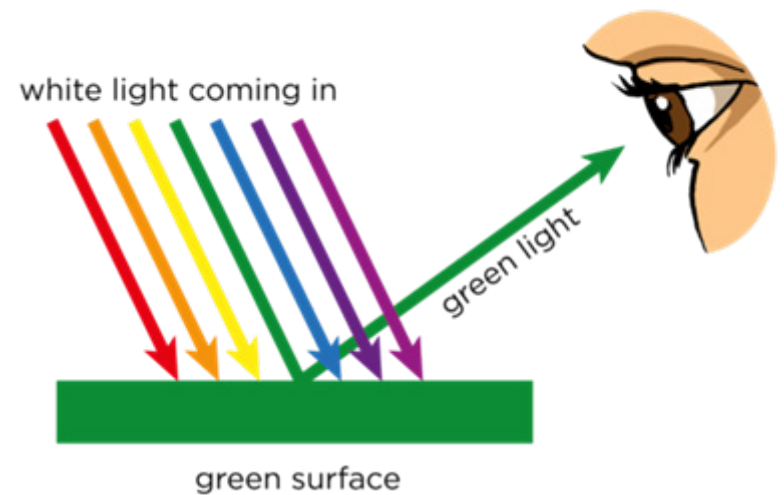


- Na základě chemických reakcí
- Měření pH

Co je ve zkumavce?

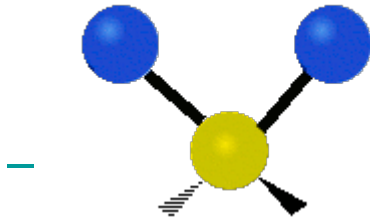


- Na základě chemických reakcí
- Měření pH
- Každá látka absorbuje

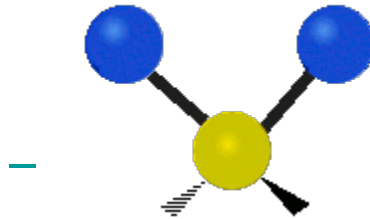


Vibrate molekul

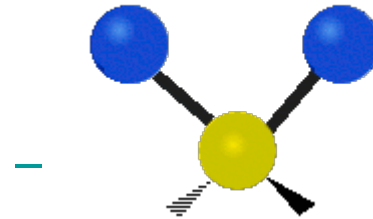
Symmetrical stretching



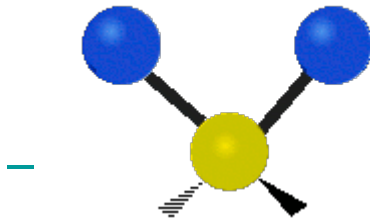
Asymmetrical stretching



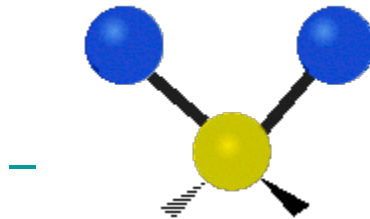
Scissoring (Bending)



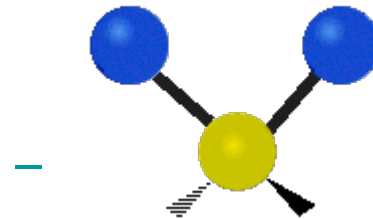
Rocking

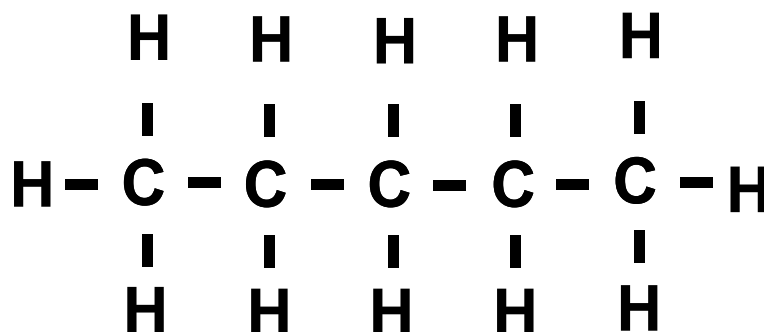


Wagging



Twisting

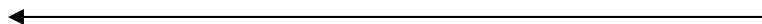
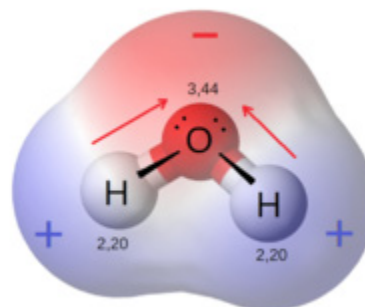
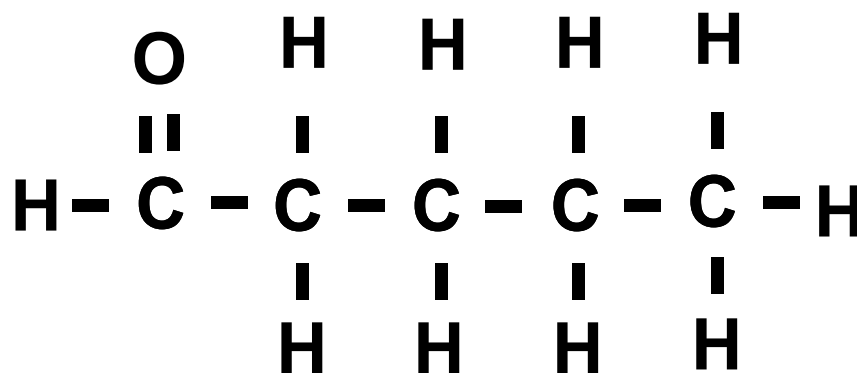




- změny energie vibrací jsou cítit až na vzdálenost 5ti molekul

- stejné symetrické molekuly

- Více elektronegovní molekuly...větší posun



Elektrony taženy tímto směrem

Dvouatomová molekula

Vibrací biatomické molekuly chápeme periodickou změnu mezijaderné vzdálenosti. Při klasickém popisu jde o oscilátor tvořený dvěma hmotnými body na pružině.



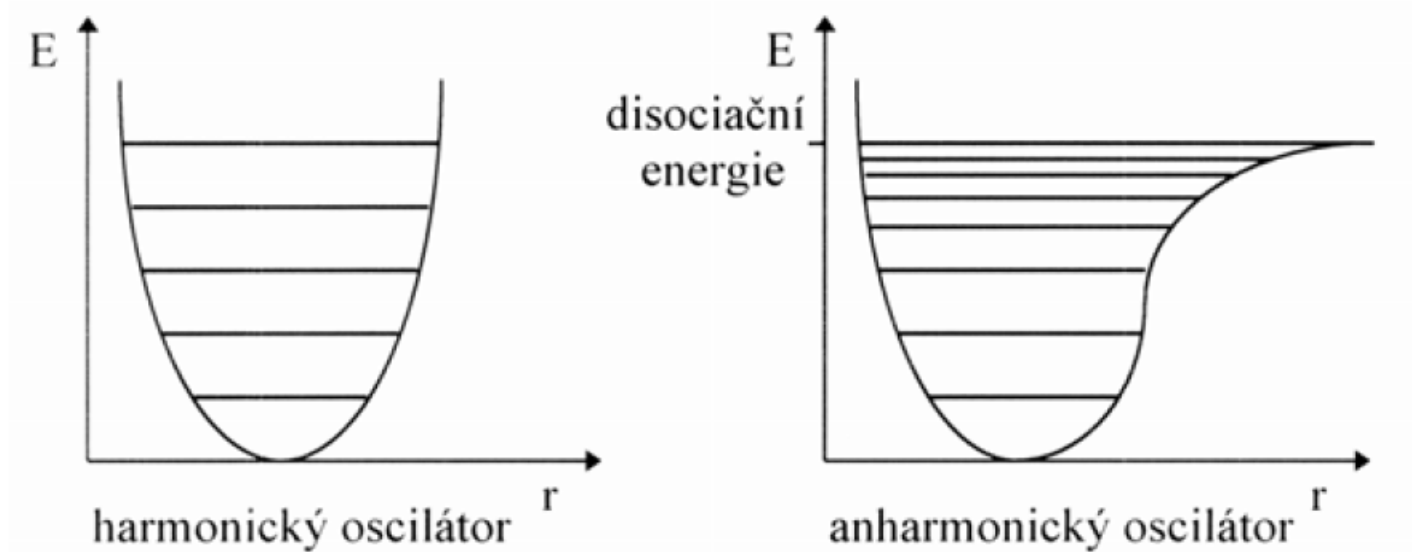
Pro jeho frekvenci platí

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}},$$

kde μ je redukovaná hmotnost a k je silová konstanta

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B}$$

Frekvence vibrace biatomické molekuly tedy závisí na síle poutající atomy, tj. na typu chemické vazby, a na druhu (hmotnosti) vibrujících atomů. Při vibraci dochází k vychýlení atomů z rovnovážné polohy. Potenciální energie v případě harmonického oscilátoru je kvadratickou funkcí této výchylky. Grafickým znázorněním této vzdálenosti je parabola s minimem v rovnovážném stavu systému.



Při kvantově-mechanickém popisu v aproximaci harmonického oscilátoru (*obr. 1*) je jeho energie kvantována a nabývá hodnot

$$E = h\nu \left(n + \frac{1}{2} \right),$$

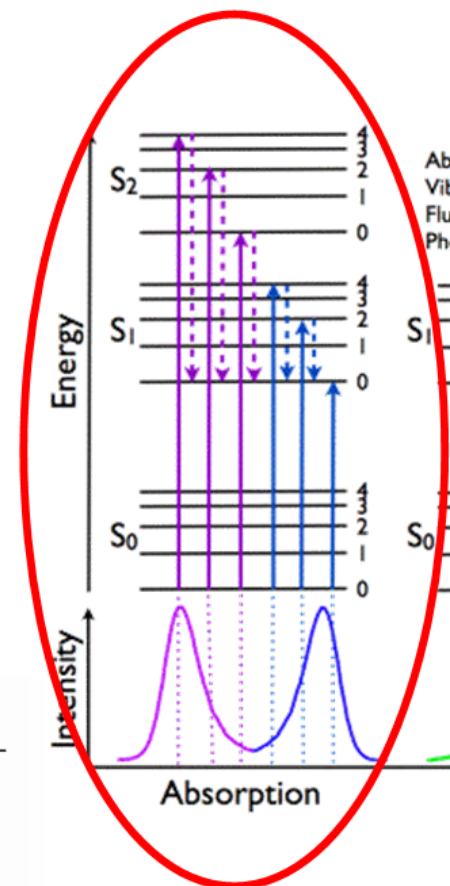
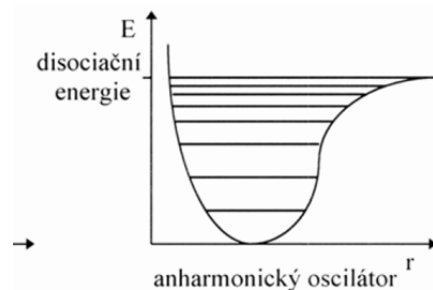
kde ν je frekvence oscilátoru a n je vibrační kvantové číslo. Pro rozdíl energetických hladin harmonického oscilátoru platí

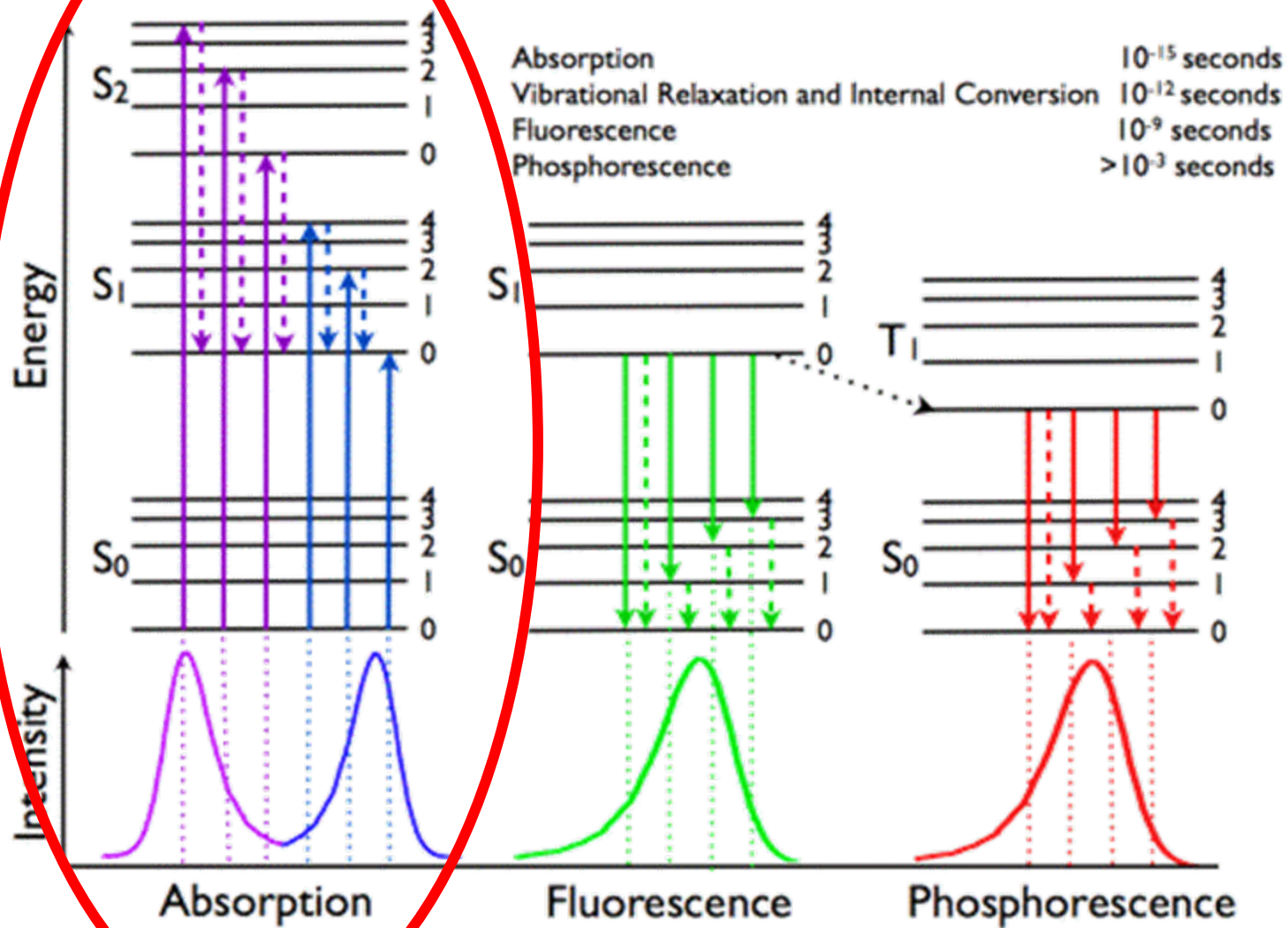
$$\Delta E = h\nu.$$

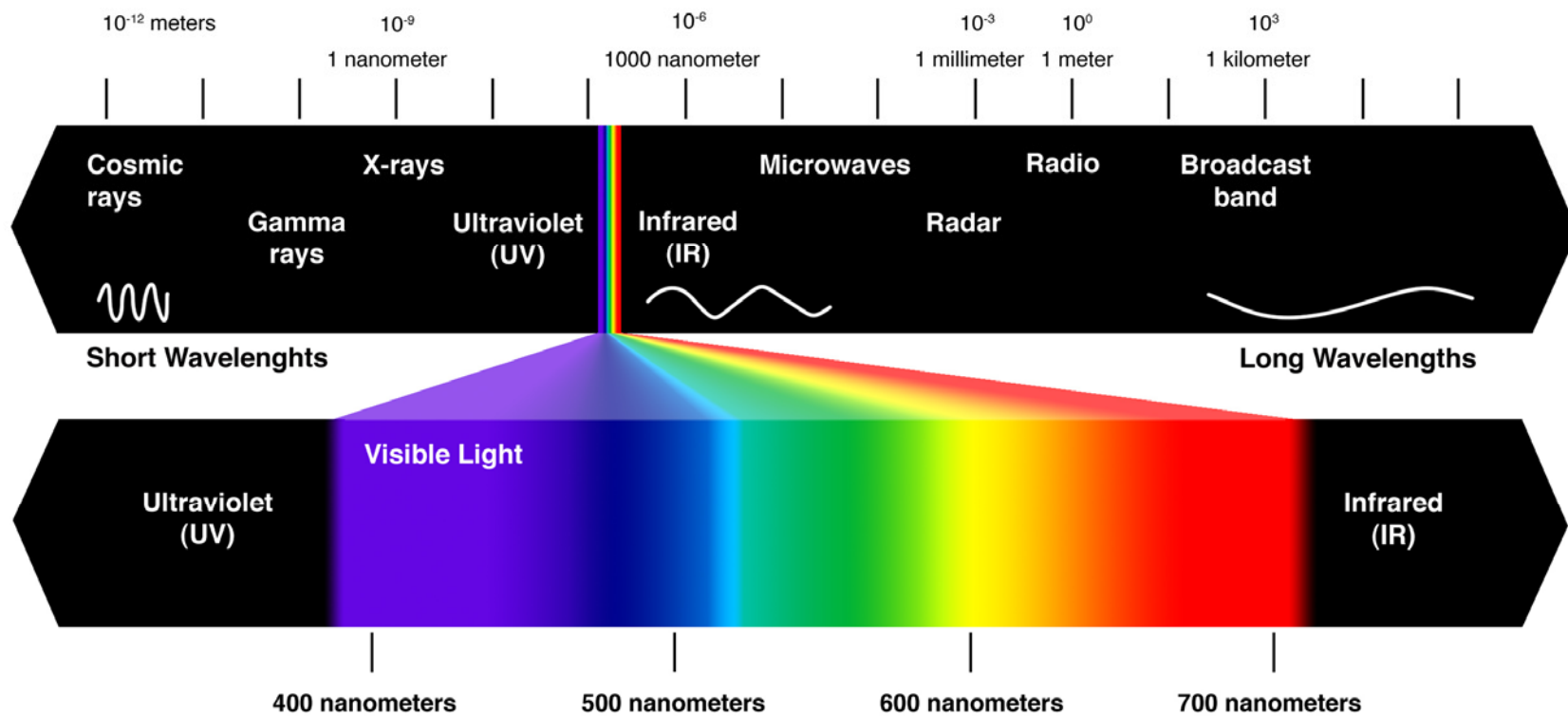
V aproximaci harmonického oscilátoru jsou možné pouze vibrační přechody, při nichž se vibrační kvantové číslo n mění o jedničku ($\Delta n = 1$), tj. možné jsou pouze přechody mezi sousedními vibračními hladinami.

Frekvence absorbovaného záření se musí rovnat frekvenci vibrace molekuly. Absorpcí energie se zvýší amplituda vibrací, frekvence však zůstává nezměněna. Frekvence, které odpovídají přechodům mezi základním a prvním excitovaným stavem, se nazývají *základní (fundamentální)*. Protože většina molekul je za normální teploty v tomto základním vibračním stavu, jsou tyto přechody nejpravděpodobnější.

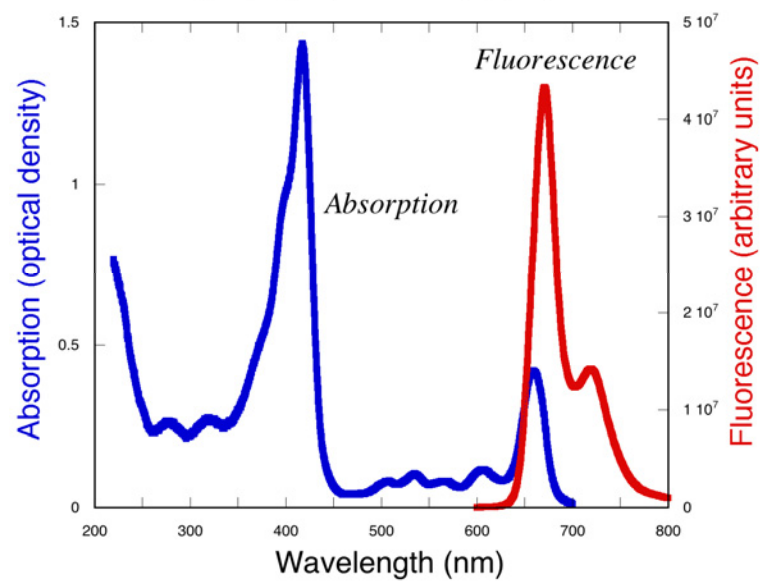
Důsledkem anharmonicity vibrací reálné molekuly je existence přechodů $\Delta n = 2, 3, \dots$ přechody s $\Delta n = 2, 3, \dots$ se označují jako *vyšší harmonické (overtony)*. Tyto frekvence jsou přibližně násobkem fundamentální frekvence (jsou poněkud menší, protože energetické hladiny se s růstem vibračního kvantového čísla zhušťují). Pravděpodobnost těchto přechodů je však daleko menší, a proto je menší také jejich intenzita.

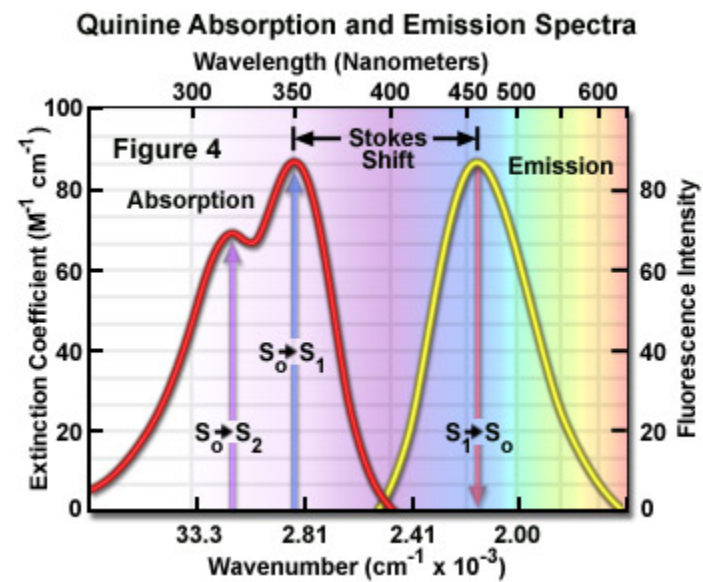
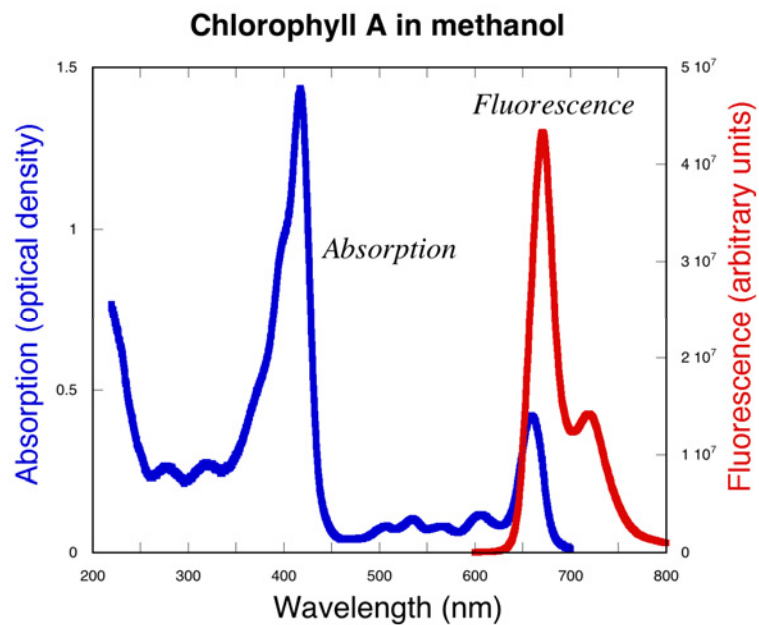






Chlorophyll A in methanol



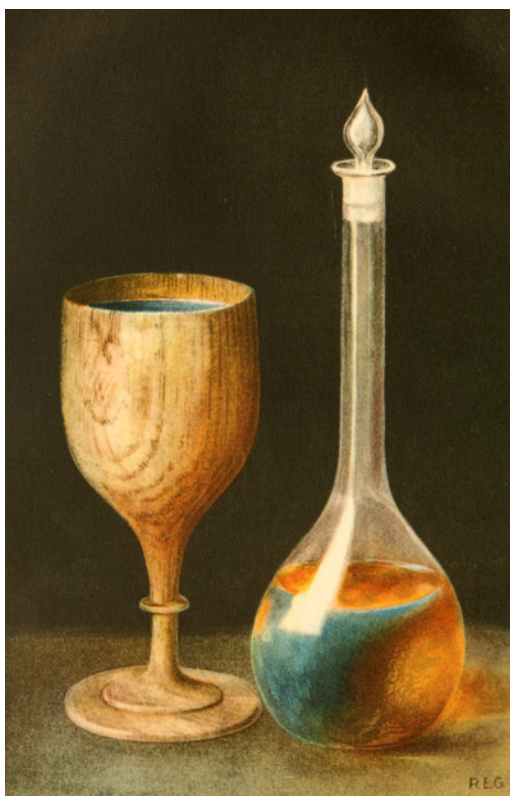


Luminiscence

J. Karafiát Broučci (1876)

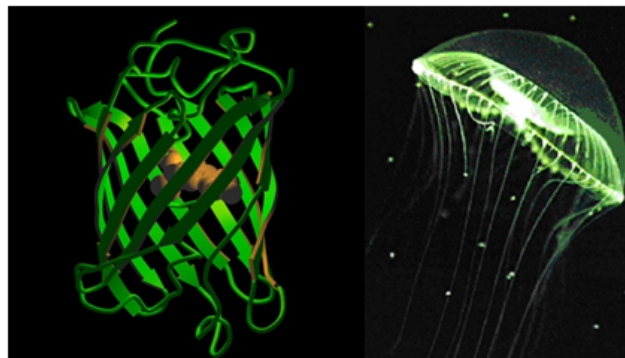
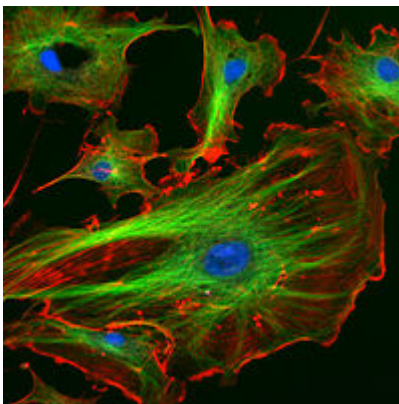


Světluška větší (*Lampyris noctiluca*) Světlušky svítí díky bioluminiscenci. Je to následek chemických reakcí v živých buňkách a tkáních – tyto procesy se nazývají chemoluminiscence. Při jednom z těchto procesů se luciferin odbourává enzymem luciferázou, energie při tom uvolněná je vyzářena ve formě světla. Proces neprodukuje žádné teplo, a proto je velmi efektivní - 90% vložené energie je přeměněné na světelnou energii.



matlaline

Lignum nephriticum cup made from the wood of the narra tree (*Pterocarpus indicus*)
1560



Left :
Green Fluorescence
Protein (GFP) 3D
Structure

Right :
Jellyfish *Aequorea
victoria*. GFP from
this organism

Luminiscence je spontánní (samovolné) záření (obvykle) pevných nebo kapalných látek, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úrovní jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti při dané teplotě, přitom toto záření má určitou dobu doznívání, tedy trvá i po skončení budícího účinku.

Podle druhu excitace existuje více druhů luminiscence, např.

Fotoluminiscence – luminiscence je vyvolána elektromagnetickým zářením
(např. v případě zářivky)

Elektroluminiscence – luminiscence je vyvolána elektrickým polem
(např. u luminiscenční dioda, reklamní panely, nouzové osvětlení)

Katodoluminiscence – luminiscence je vyvolána dopadajícími elektrony
(např. stínítko televizní obrazovky)

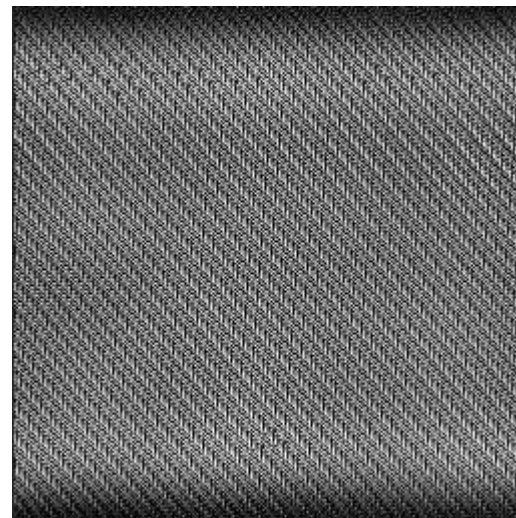
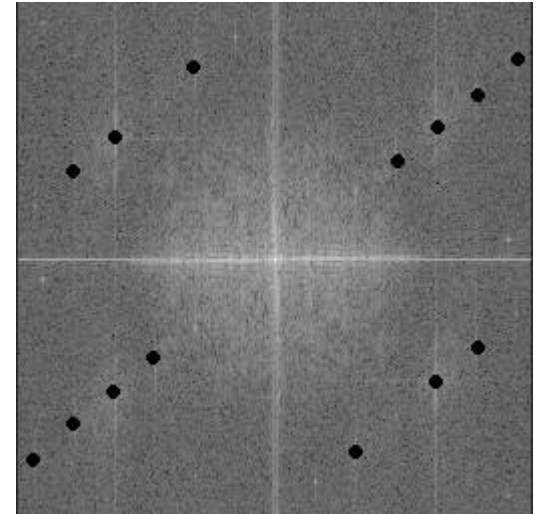
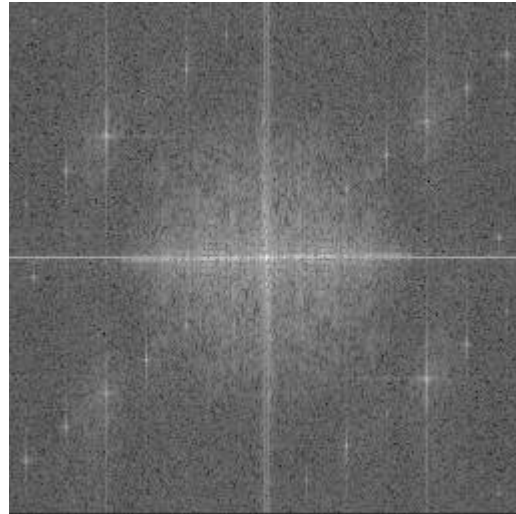
Chemoluminiscence – luminiscence je vyvolána chemickou reakcí
(patří sem i bioluminiscence, kdy je emise světelného záření vytvořena živými organismy)

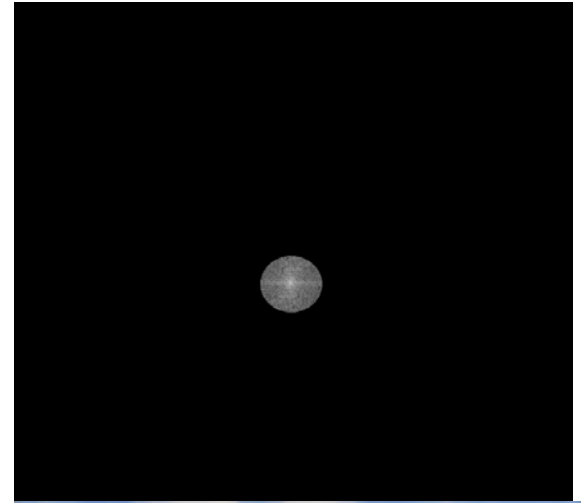
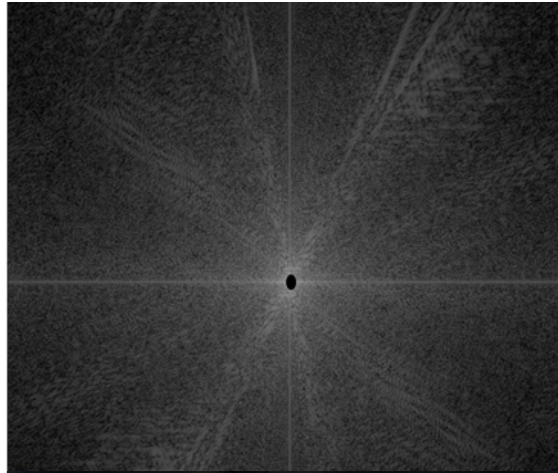
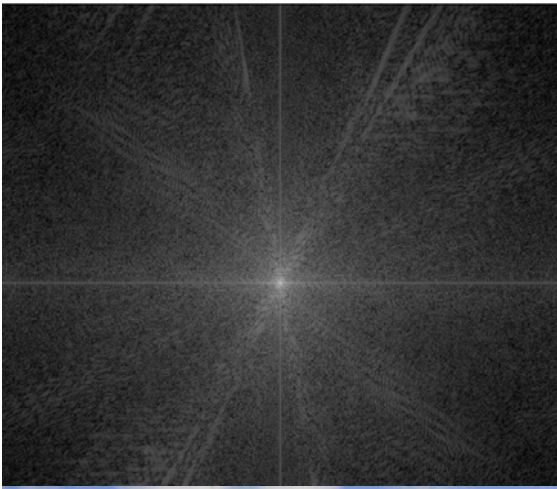
Termoluminiscence – luminiscence je vyvolána vzrůstem teploty po předchozím dodání energie

Radioluminiscence – luminiscence je vyvolána působením jaderného záření

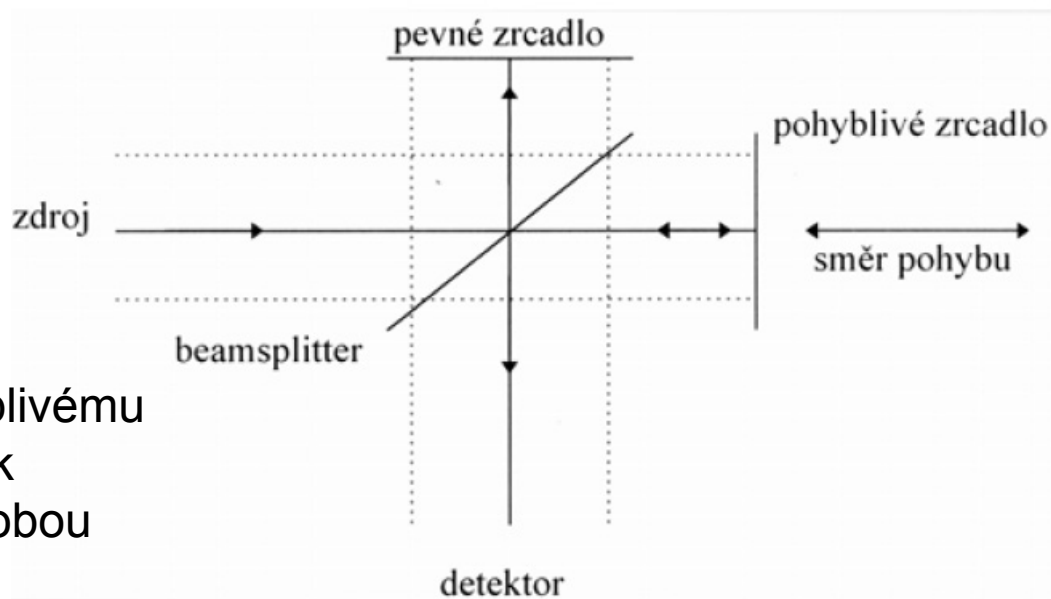
Triboluminiscence – luminiscence je vyvolána působením tlaku

Furier transformation





Srdcem FT spektrometru je Michelsonův interferometr, jehož schéma je uvedeno na obr. 4. Záření ze zdroje přichází na polopropustný dělič paprsků (beamsplitter), který jednu polovinu paprsků propustí k pohyblivému zrcadlu, druhá se odráží směrem k pevnému zrcadlu. Paprsky se od obou vzájemně kolmých zrcadel zpětně odrážejí a na děliči paprsků se podle polohy pohyblivého zrcadla



Obr. 4. Schéma Michelsonova interferometru

bud' sčítají, nebo odčítají. Je-li optická dráha paprsků v obou ramenech přístroje stejná, dojde pro všechny vlnové délky ke konstruktivní interferenci. Toho se užívá k určení této polohy. Při různé optické dráze v obou ramenech dojde pro vlny s různými vlnovými délkami k interferenci bud' konstruktivní, nebo destruktivní. Na výstupu interferometru měříme celkovou intenzitu prošlého záření, tzv. *interferogram*. Tato hodnota je funkcí rozdílu optických drah v obou ramenech.

Pro určení rozdílu optických drah v obou ramenech slouží laser s úzkou spektrální šířkou vyzařování. Jeho paprsek též prochází interferometrem a je snímán fotodiodou.

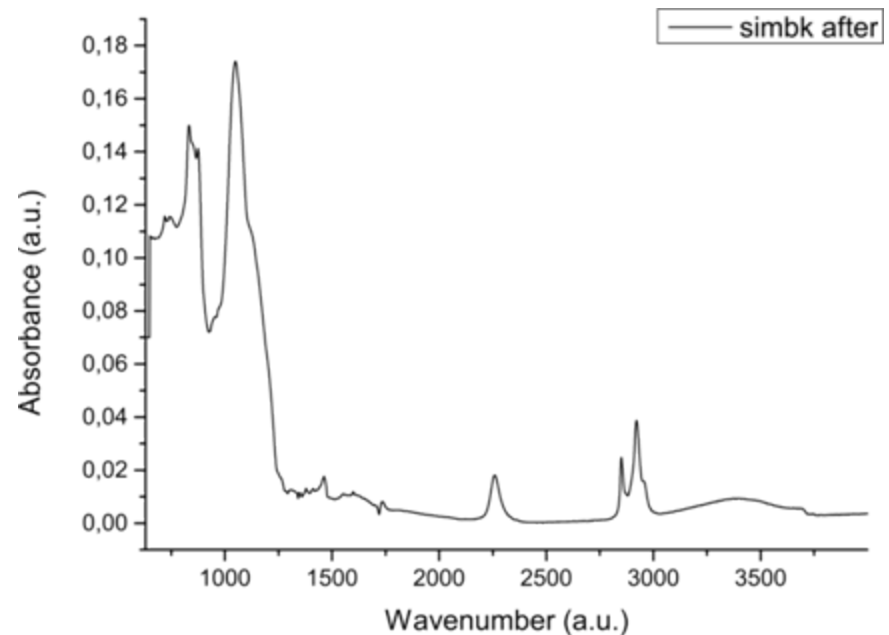
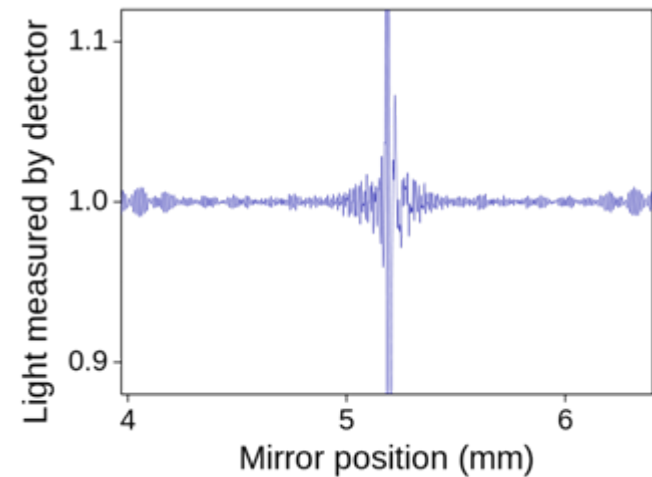
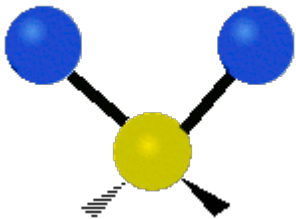
FTIR

Fourier transform infrared spectroscopy

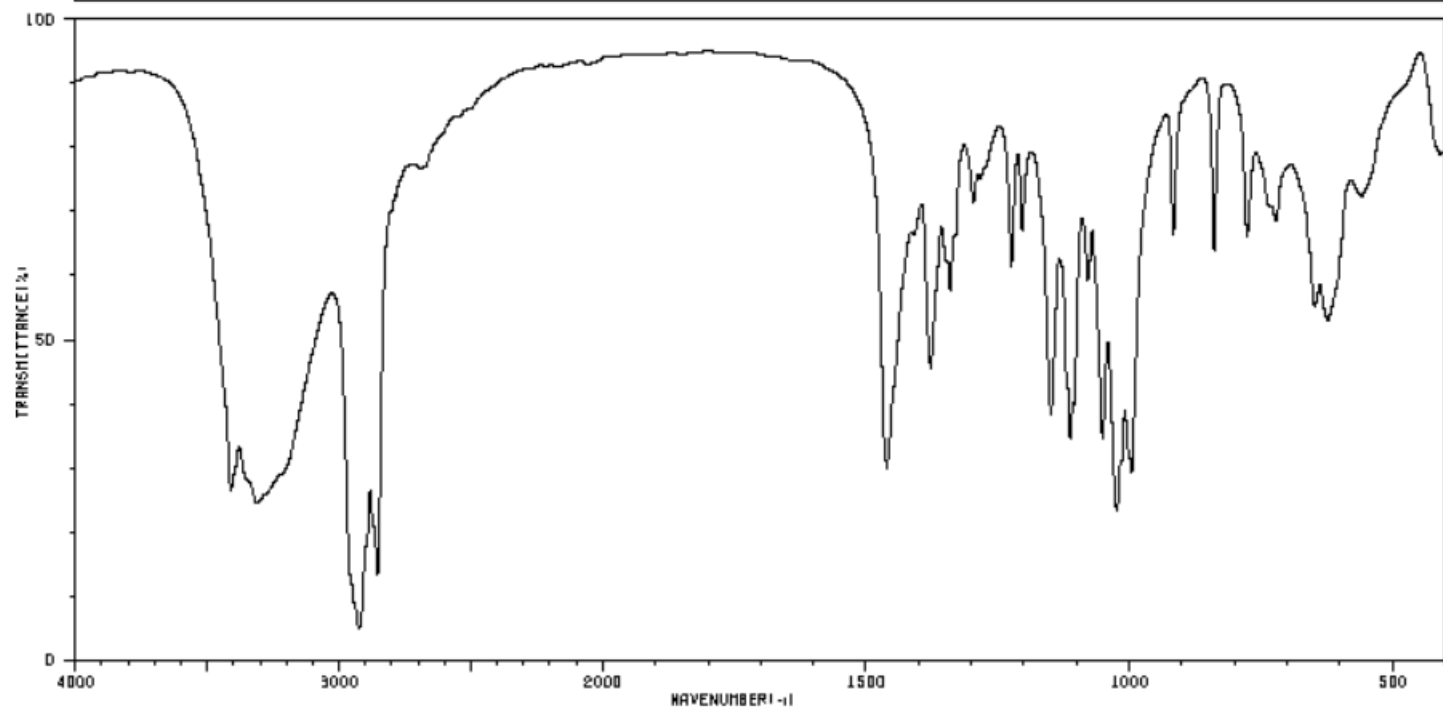
Interferogram patří do délkové domény.

Fourier transform (FT) invertuje tuto dimenzi, a tedy FT interferogram

Patří do reciproké délkové domény, tj. vlnočet. Spektrální rozlišení bývá 0.25 cm^{-1} .

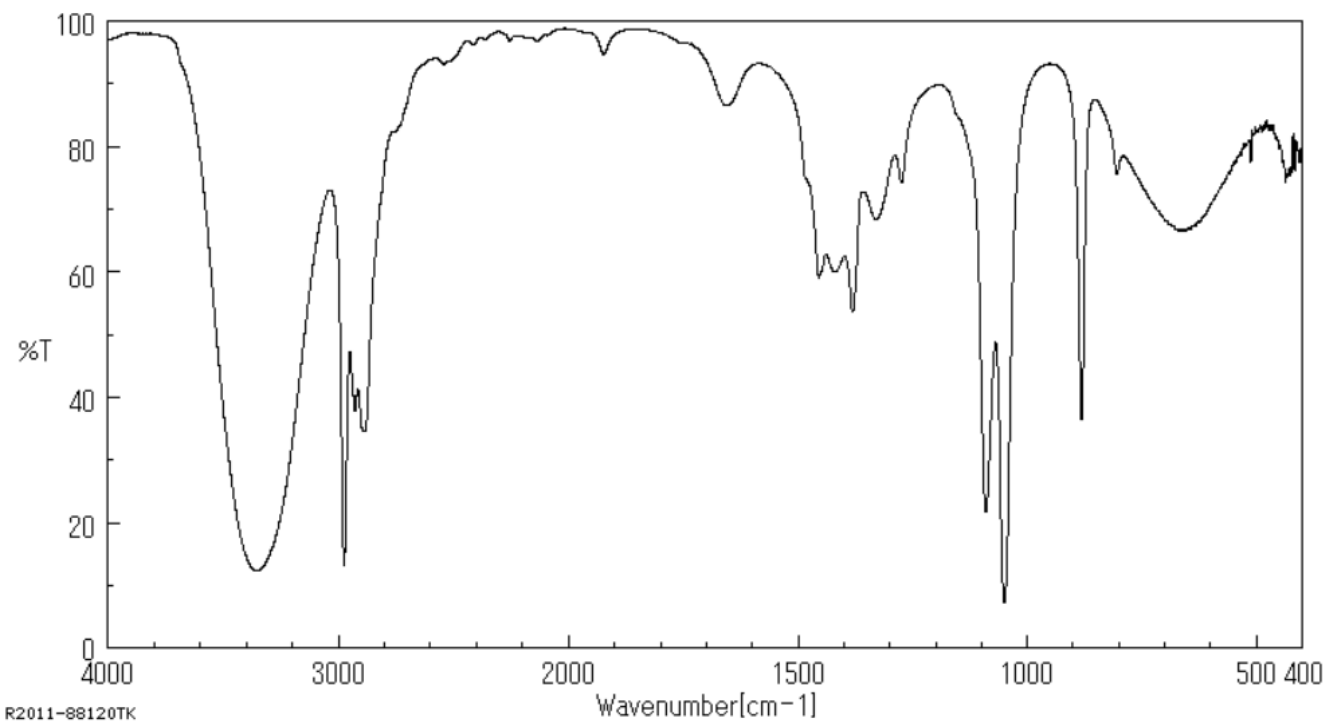


HIT-NO=4995	SCORE= ()	SDBS-NO=11521	IR-NIDA-70131 : NUJOL MULL
D-GLUCOSE			
<chem>C6H12O6</chem>			

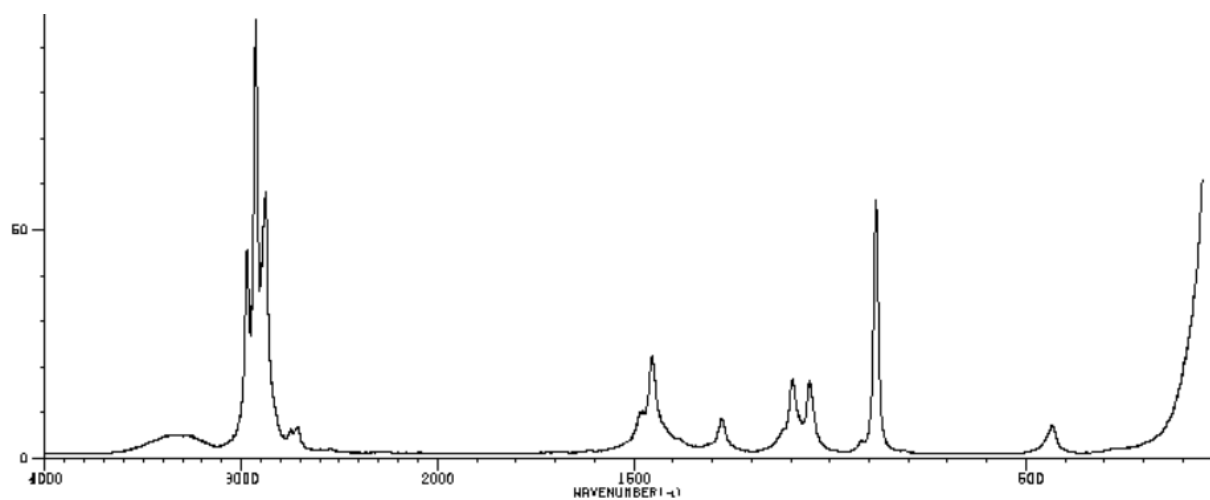


3411	26	1341	66	1105	38	839	62	660	70	
3311	23	1296	68	1079	57	777	64			
2924	4	1283	72	1051	35	733	68			
2854	12	1226	68	1024	22	728	68			
1460	28	1204	64	1015	29	722	66			
1378	43	1149	37	996	26	648	53			
1347	60	1112	39	916	64	623	50			

Ethanol
IC



Raman



ETHYL ALCOHOL
SDBSNO = 1300

C_2H_5O

RH-01-00016 : 4880A.200M.LIQUID

Podmínka aktivity v Ramanově spektru – musí dojít ke změně polarizovatelnosti α neboli ke změně rozložení elektronové hustoty (intenzita pásu je úměrná druhé mocnině polarizovatelnosti)

Podmínka aktivity v IČ – musí dojít ke změně dipólmomentu μ (intenzita pásu je úměrná druhé mocnině změny dipólového momenty)

Co nám dá Raman?

- identifikace na základě porovnání otisku prstu („fingerprint“) s knihovnou
- trojrozměrná struktura, informace o mezimolekulárních interakcích, dynamika systému
- Ramanovo spektrum je jednodušší než IČ, nemá vibrace vyššího řádu
- na rozdíl od IČ může studovat některé anorganické materiály (uhlík, křemín, těžké kovy) a symetrické disulfidické vazby u proteinů

Raman spectroscopy

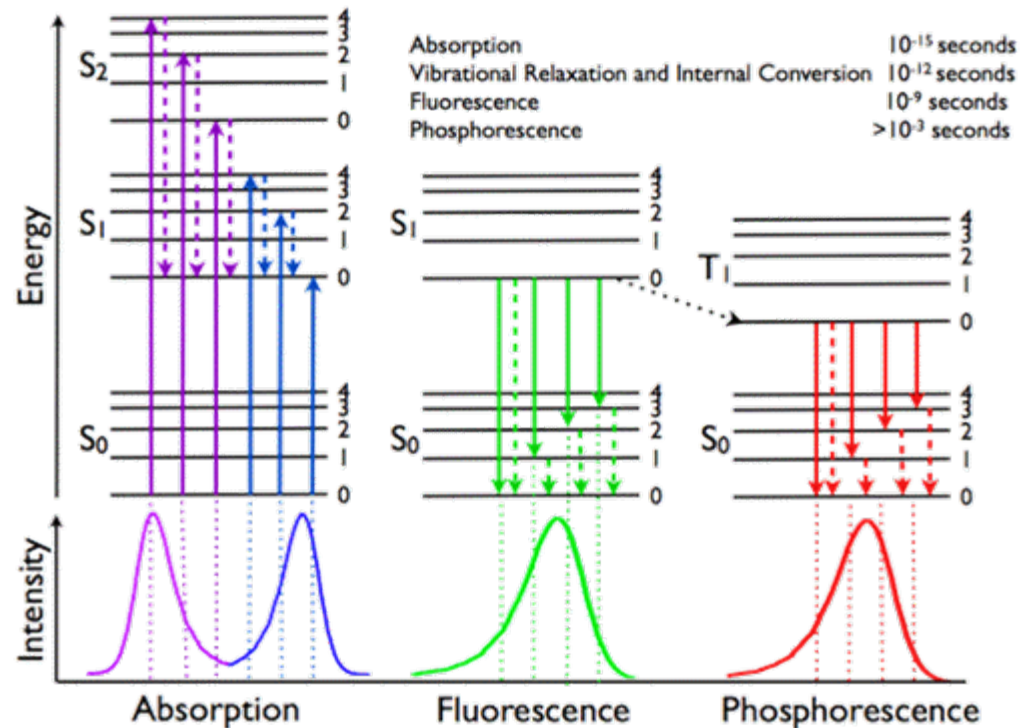
Ramanova spektroskopie je do značné míry doplňkovou metodou k infračervené spektroskopii. Je skoro pravidlem, že pásy intenzivní v Ramanových spektrech jsou v infračervených spektrech slabé a naopak, protože:

Vibrace, u kterých se vibrací mění polarizovatelnost, mají pásy v Ramanových spektrech.

Vibrace, které mění dipól molekuly, mají pásy v infračervených spektrech.

Výhody – není destruktivní,
analýzy in-situ a in-vitro
vhodné pro biologické aplikace

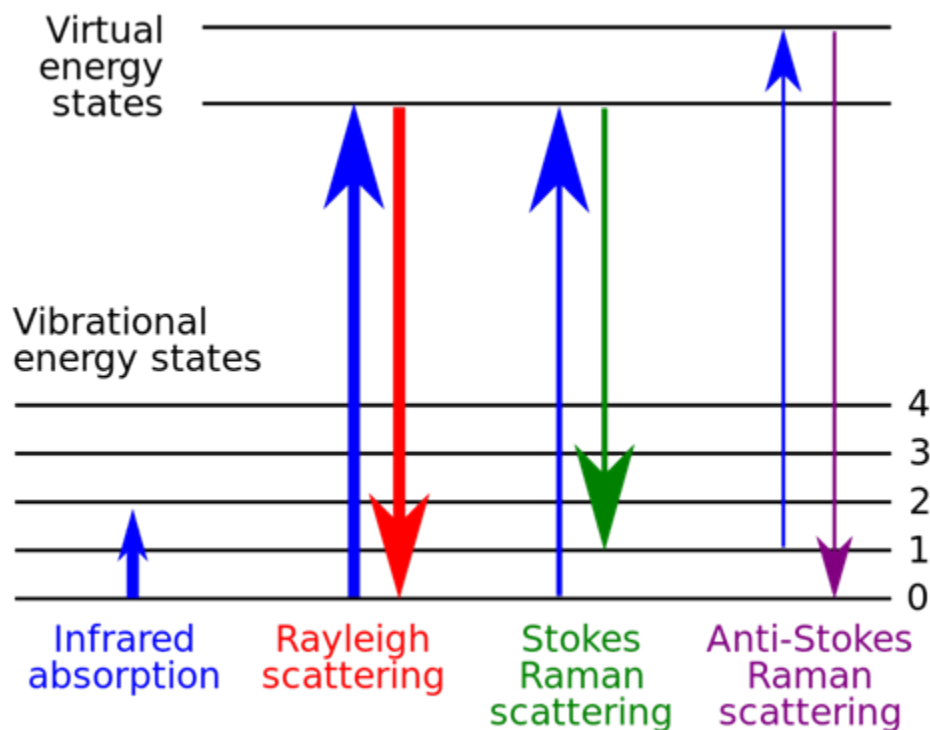
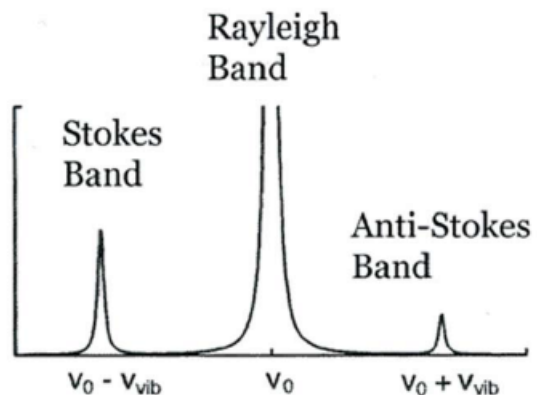
Nevýhody – málo intenzivní
třeba zesílit, pouze 1 z 10^8
fotonů je rozptýlen
Ramanovým efektem



Nejčastěji laserový paprsek excituje elektron v základním stavu do virtuálního stavu, a při návratu z virtuálního stavu zpět se vyzáří foton se stejnou vlnovou délkou, jakou měl původní foton - tzv. Rayleighův rozptyl, který nenesou žádnou analytickou informaci.

Pokud se elektron po excitaci do virtuálního stavu vrátí do vyšší kvantové hladiny, než z které byl předchozí elektron vyražen, vyzáří se foton s větší vlnovou délkou – tzv. Stokesovy fotony. Naopak, pokud se elektron původně nenacházel v základním stavu, ale na vyšší hladině a vrací se na základní hladinu, vyzáří se foton s menší vlnovou délkou – tzv. Anti-Stokesovy fotony.

Posuny frekvencí u Stokesových a Anti-Stokesových fotonů od frekvence použitého laserového zdroje pak nesou analytickou informaci o rozdílech jednotlivých kvantových hlad



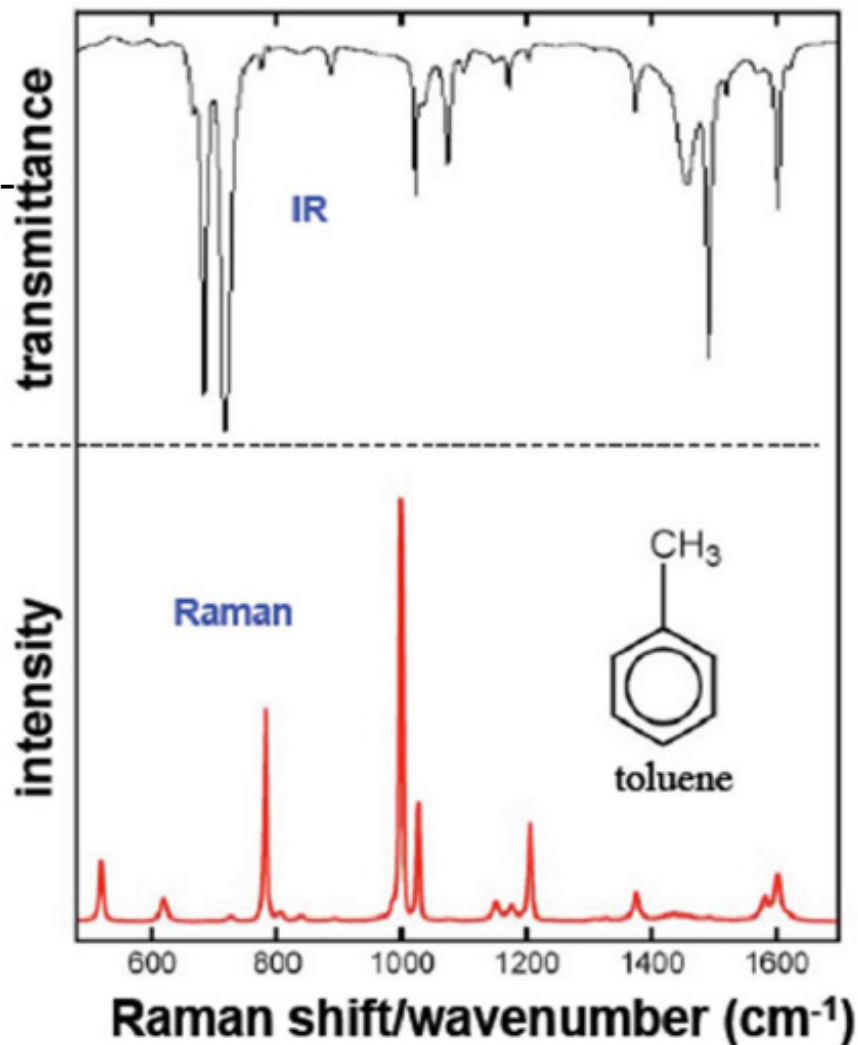
Polární vazba - obvykle aktivní v IČ

Nepolární vazba v symetrické molekule - absorbuje málo v IČ, ale výrazně v Ramanově spektru

Molekuly s nízkou symetrií – vibrační pásy pozorovatelné v obou typech spekter, ale s různou intenzitou

Molekuly s vysokou symetrií – komplementární informace z obou typů spekter

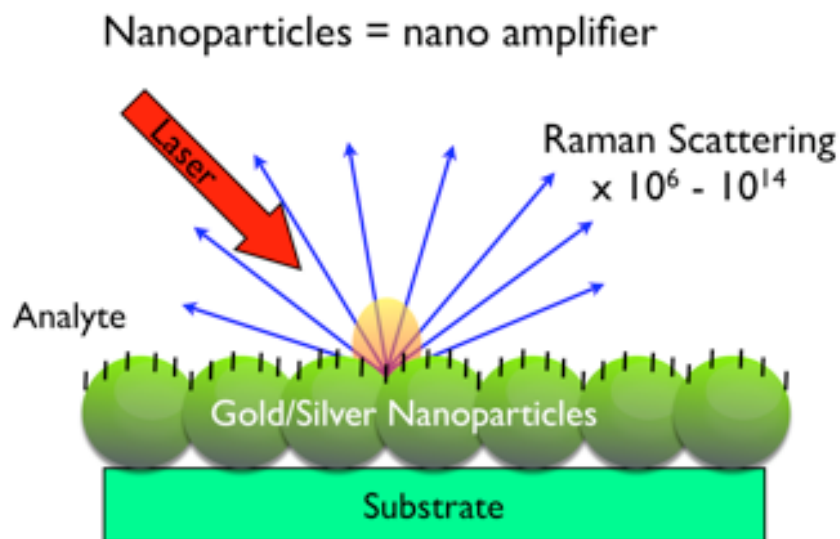
Plně symetrické vibrace – aktivní v Ramanově spektru, inaktivní v IČ



Povrchem dochází k zesílení Ramanova signálu $10^3 - 10^6$ násobně – základní princip **povrchem zesílené Ramanovy spektrometrie (Surface Enhanced Raman Spectrometry, SERS)**

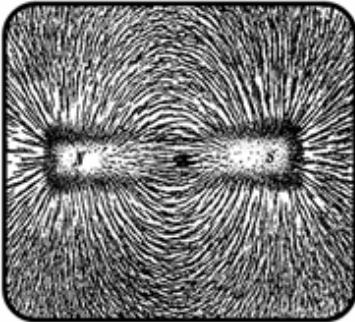
Přesný mechanismus zesilovacího efektu SERS stále není objasněn. Existují dvě teorie a jejich mechanismus se značně liší, ale rozlišit je experimentálně je značně složité. Elektromagnetická teorie nabízí vysvětlení v existenci lokalizovaných povrchových plasmonu, zatímco chemie nabízí vysvětlení ve formaci chemických komplexů schopných přenosu energie.

SERS může fungovat jak v koloidních roztocích, preferenčně se používá pro měření kapalin nanesených na nano-vrstvu (zlato, stříbro) a pak jsme schopni měřit velice malé množství.





Nukleární - znamená, že jde o metodu týkající se jader atomů (jádro, Lat. nucleus)
Nejedná se o metodu využívající ionizační záření!

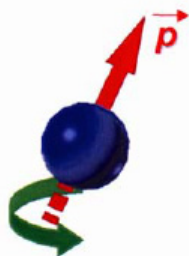


Magnetická – pro provedení je nezbytné generovat velmi silné magnetické pole, metoda využívá magnetických vlastností jader



Rezonance - „ohlas“ jader nacházejících se v magnetickém poli na vnější energetický podnět v podobě elektromagnetického záření o určité frekvenci

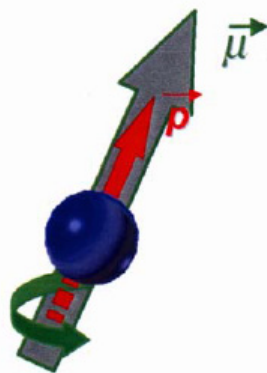
Spin a magnetický moment atomových jader



$$p = h/2\pi * \sqrt{I(I+1)}$$

Spin – forma úhlového momentu, která však nevzniká v důsledku rotace, ale je vnitřní vlastností samotných mikročastic

- ➔ **Úhlový moment $\vec{p}$** je vektor rovnoběžný s osou rotace
- ➔ Nukleony (proton a neutron) mají spin obdobně jako elektron
- ➔ Atomové jádro má rovněž spin, který je dán kombinací spinů protonů a neutronů
- ➔ Velikost úhlového momentu je dána **spinovým kvantovým číslem I**



$$\vec{\mu} = \gamma \vec{p}$$

Jaderný magnetický moment $\vec{\mu}$ – vzniká jako důsledek spinu a náboje atomového jádra (rotující nabitá částice generuje dipolární magnetický moment)

- ➔ Magnetický moment a spinový úhlový moment jsou přímo úměrné
- ➔ Konstanta úměrnosti – magnetogyrický (gyromagnetický) poměr γ - je konstanta daná magnetickými vlastnostmi jádra a je pro každé jádro charakteristická
- ➔ Vektor magnetického momentu je rovnoběžný s vektorem úhlového momentu

Spin a magnetický moment atomových jader

1. Protonové (Z) i neutronové (N) číslo je sudé

$$I = 0 \Rightarrow \mu = 0 \Rightarrow \text{NMR neaktivní nuklidy } (^{16}\text{O}, ^{12}\text{C}, ^{32}\text{S})$$

2. Protonové (Z) nebo neutronové číslo (N) je sudé a druhé liché

$$I = 1/2, 3/2, 5/2, 7/2 \dots \Rightarrow \mu \neq 0 \Rightarrow \text{NMR aktivní nuklidy}$$

a) $I = 1/2 \Rightarrow \mu \neq 0, e.Q = 0 \Rightarrow$ NMR aktivní, nekvadrupolová jádra
jádra ideální pro NMR experimenty $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{119}\text{Sn} \dots$

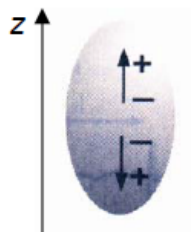
b) $I > 1/2 \Rightarrow \mu \neq 0, e.Q \neq 0 \Rightarrow$ NMR aktivní, kvadrupolová jádra
komplikované NMR experimenty $^7\text{Li}, ^{11}\text{B}, ^{33}\text{S}, ^{17}\text{O} \dots$

a) Nekvadrupolová jádra

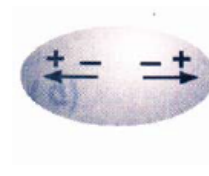


$$I = 1/2$$
$$eQ = 0$$

b) Kvadrupolová jádra



$$I \geq 1$$
$$eQ > 0$$



$$I \geq 1$$
$$eQ < 0$$

eQ = kvadrupolový moment e = jednotkový náboj Q = míra odlišnosti sférického a nesférického rozložení náboje

Spin a magnetický moment atomových jader

1. Protonové (Z) i neutronové (N) číslo je sudé

$$I = 0 \Rightarrow \mu = 0 \Rightarrow \text{NMR neaktivní nuklidy } (^{16}\text{O}, ^{12}\text{C}, ^{32}\text{S})$$

2. Protonové (Z) nebo neutronové číslo (N) je sudé a druhé liché

$$I = 1/2, 3/2, 5/2, 7/2 \dots \Rightarrow \mu \neq 0 \Rightarrow \text{NMR aktivní nuklidy}$$

a) $I = 1/2 \Rightarrow \mu \neq 0, e.Q = 0 \Rightarrow \text{NMR aktivní, nekvadrupolová jádra}$
jádra ideální pro NMR experimenty $^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{119}\text{Sn} \dots$

b) $I > 1/2 \Rightarrow \mu \neq 0, e.Q \neq 0 \Rightarrow \text{NMR aktivní, kvadrupolová jádra}$
komplikované NMR experimenty $^7\text{Li}, ^{11}\text{B}, ^{33}\text{S}, ^{17}\text{O} \dots$

3. Protonové (Z) i Neutronové (N) číslo je liché

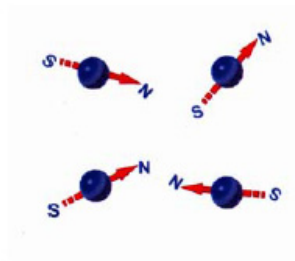
$$I > 1, (2), 3 \dots \Rightarrow \mu \neq 0, e.Q \neq 0 \Rightarrow \text{NMR aktivní, kvadrupolová jádra}$$

komplikované NMR experimenty $^2\text{H}, ^6\text{Li}, ^{14}\text{N}, \dots$

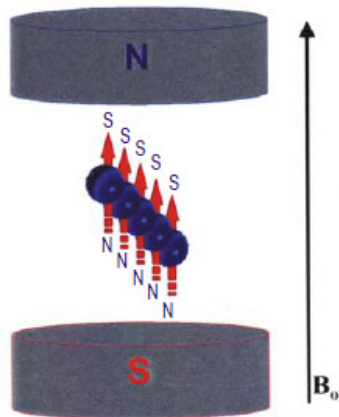
◆ 63 prvků má alespoň jeden NMR aktivní izotop !!!

◆ Zcela NMR neaktivní jsou pouze čtyři prvky Ar, Tc, Ce, Pm

Atomové jádro v magnetickém poli



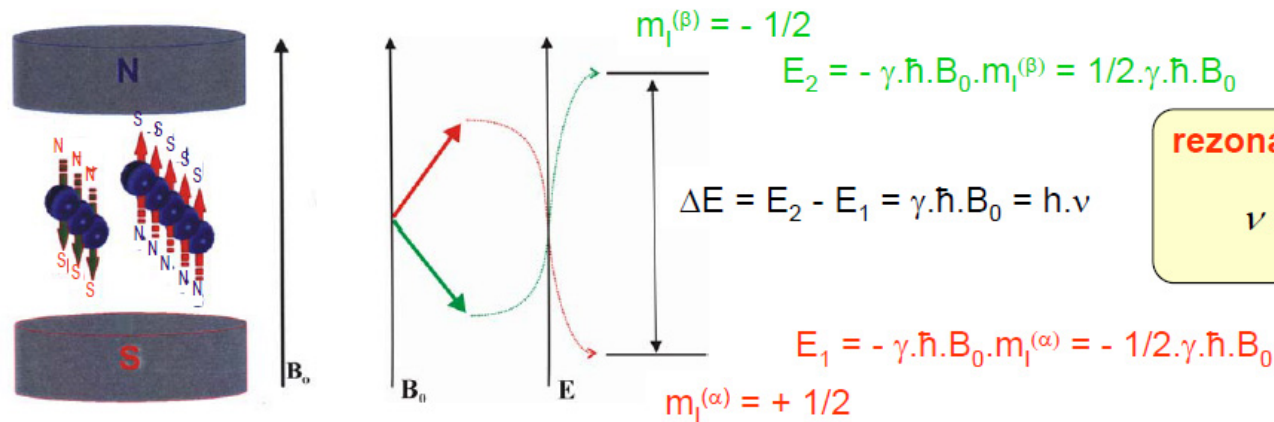
Jaderné spiny mimo magnetické pole nemají žádnou orientaci



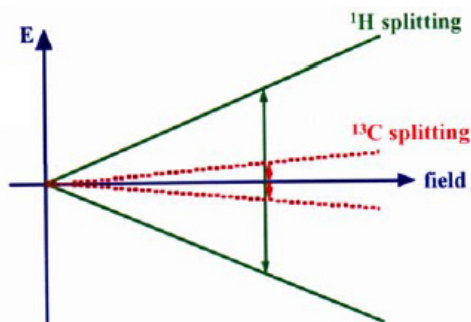
- ➡ V magnetickém poli se jaderné spiny orientují podle vektoru magnetické indukce
- ➡ Jaderný spin je kvantován = Jsou povoleny pouze některé orientace
- ➡ Počet možných orientací je dán spinovým kvantovým číslem $(2I + 1)$

Atomové jádro v magnetickém poli

$I = 1/2$ (^1H , proton)



Každé orientaci jaderného spinu odpovídá diskretní energetická hladina



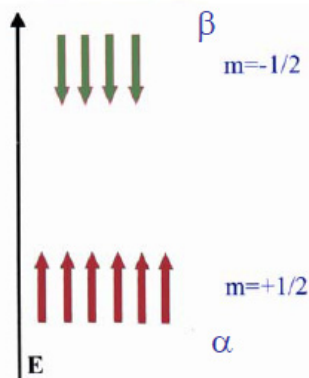
Velikost Zeemanova štěpení závisí na :

- Typu jádra (γ)
- Síle magnetického pole



Při dané intenzitě magnetického pole má ^1H vyšší rezonanční frekvenci a je citlivější než ^{13}C

Citlivost NMR spektroskopie



Energie tepelného pohybu $k \cdot T \cong \Delta E$



Boltzmannovo rozdělení

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\frac{\Delta E}{kT}}$$

N_{α} = populace jader na energeticky nižší hladině

N_{β} = populace jader na energeticky vyšší hladině

k = Boltzmannova konstanta

T = termodynamická teplota

✦ ΔE je velice malé $\Rightarrow$ Boltzmannovo rozdělení dává pouze velice malý rozdíl populací

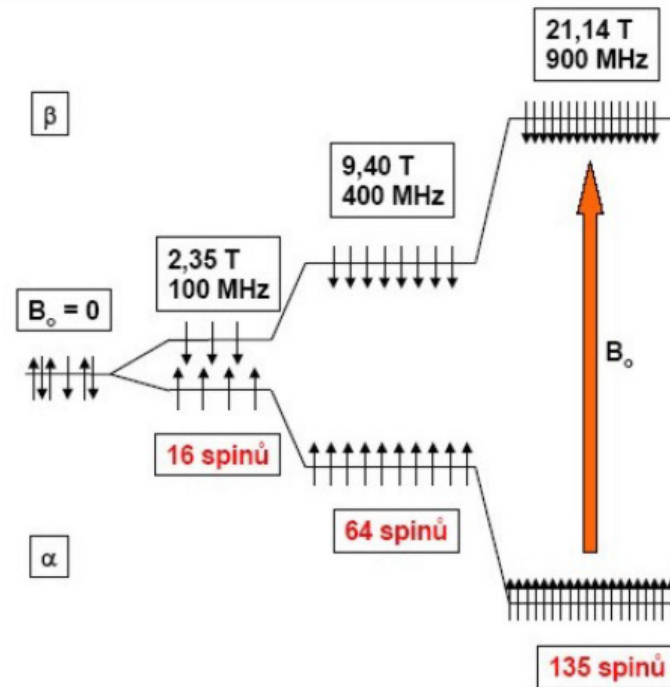


^1H , $\nu = 100 \text{ MHz}$ ($B_0 = 2,349 \text{ T}$), $T = 300 \text{ K}$

$$N_{\alpha} / N_{\beta} = 1,000016$$

Citlivost NMR spektroskopie

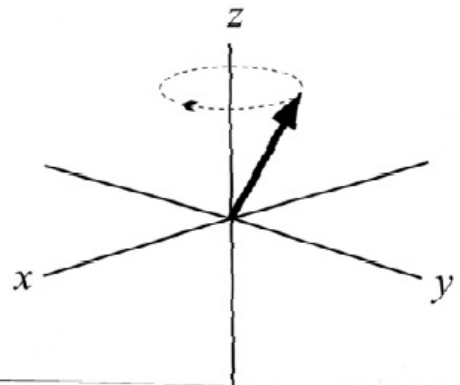
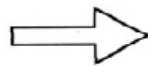
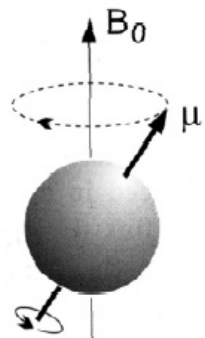
Je-li stav β obsazen 10^6 spinů, stav α je obsazen 10^6 spinů + přebytek



- Rozdíl populací (citlivost NMR spektroskopie) se zvyšuje s intenzitou vnějšího magnetického pole B_0
- Rozdíl populací (citlivost NMR spektroskopie) rovněž závisí na typu jádra (γ)

Citlivost NMR spektroskopie je velice nízká !!!!

Larmorova frekvence



Úhlová rychlost

$$\omega = -\gamma B_0 \text{ rad.s}^{-1}$$

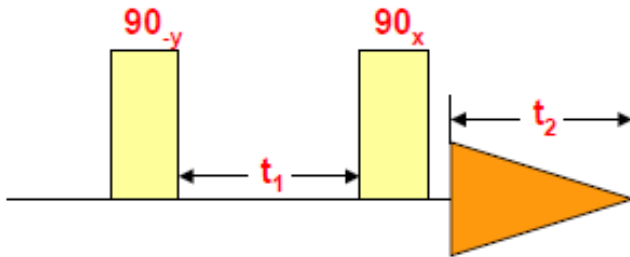
Frekvence

$$\nu = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \text{ Hz}$$

- ✦ Vektory indukce vnějšího magnetického pole B_0 a jaderného magnetického momentu μ nejsou rovnoběžné
- ✦ Vektor jaderného magnetického momentu μ vykonává “precesní” pohyb kolem vektoru vnějšího magnetického pole B_0 - *Larmorova precese*
- ✦ Vektor μ se pohybuje po povrchu kužele kolem vektoru B_0 = pohyb gyroskopu v gravitačním poli Země
- ✦ **Larmorova frekvence = rezonanční frekvence příslušného jádra**
- ✦ Směr precesního pohybu je dán znaménkem gyromagnetického poměru γ
 $\gamma > 0$ pohyb ve směru hodinových ručiček , $\gamma < 0$ proti směru hodinových ručiček

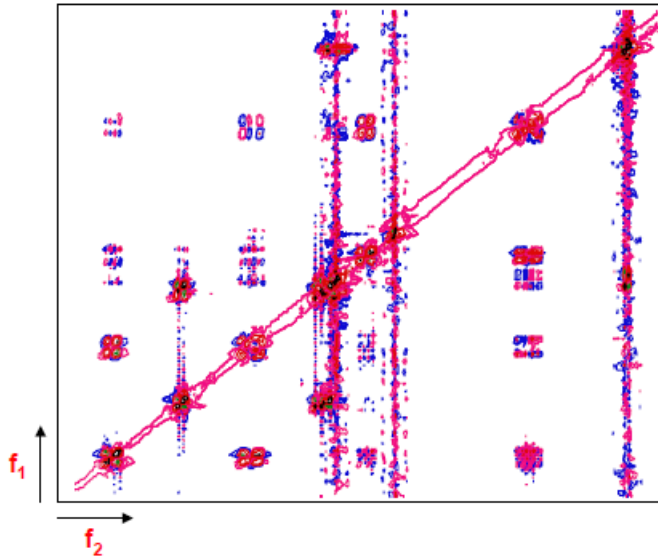
2D experiment

- Základní pulsní sekvence **COSY** experimentu obsahuje pouze dva pulsy oddělené proměnnou časovou periodou t_1 (vývojová perioda):



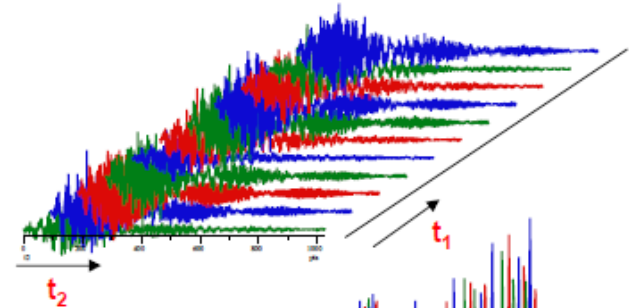
2D experiment - COSY (reálná data)

- Contour-plot** se záznamem všech *krospiků*:

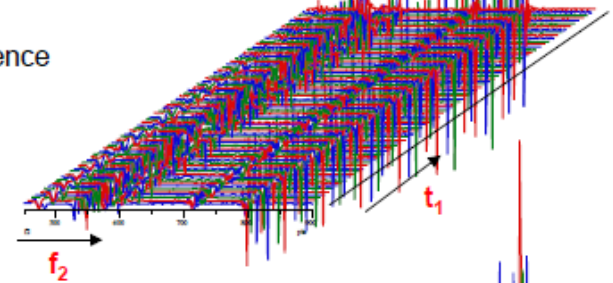


2D experiment - COSY (reálná data)

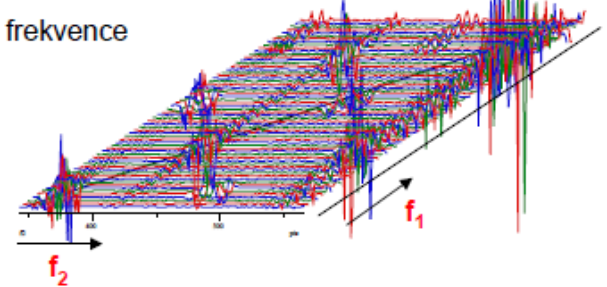
čas - čas

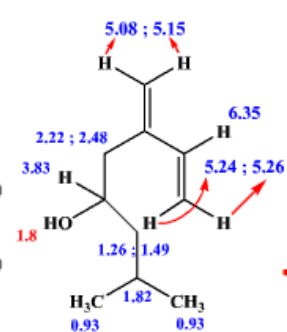
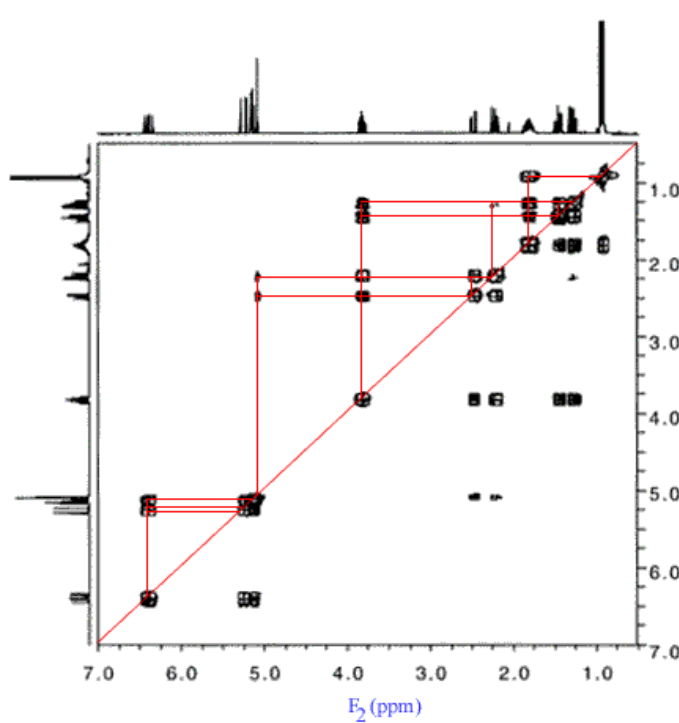


čas - frekvence

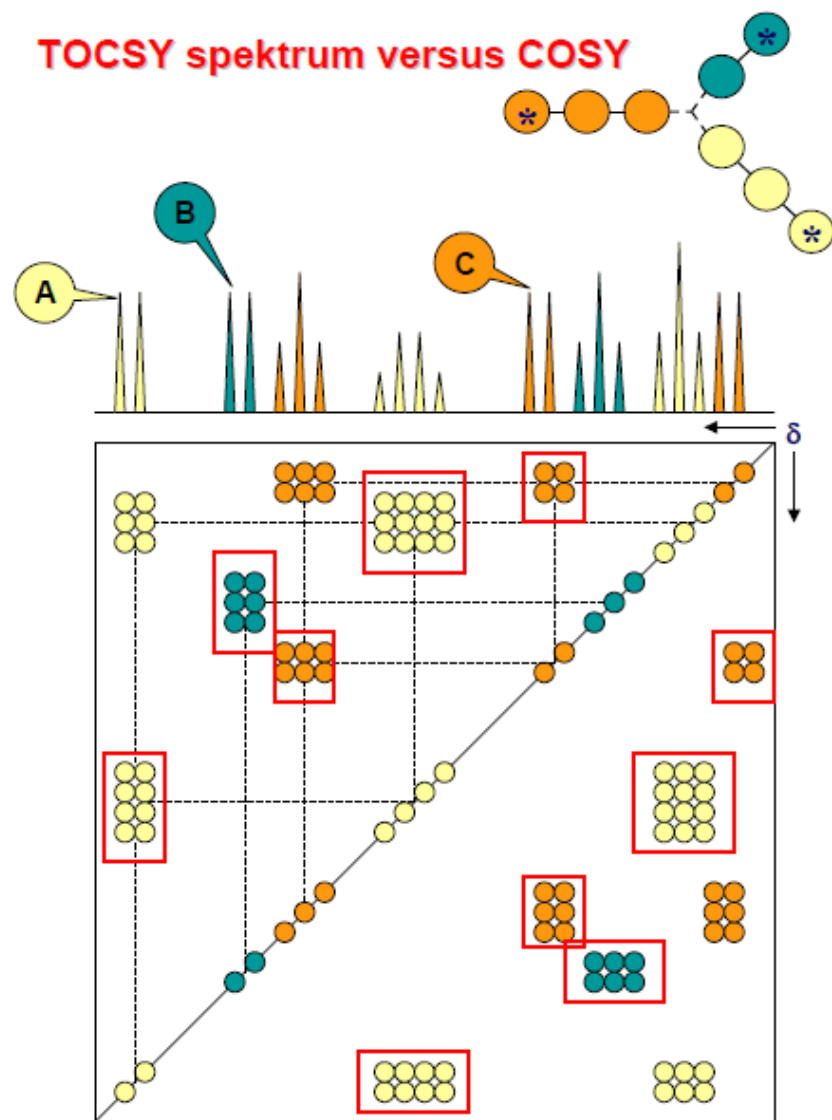


frekvence - frekvence





TOCSY spektrum versus COSY



Protein folding technology

Joachim Pietzsch

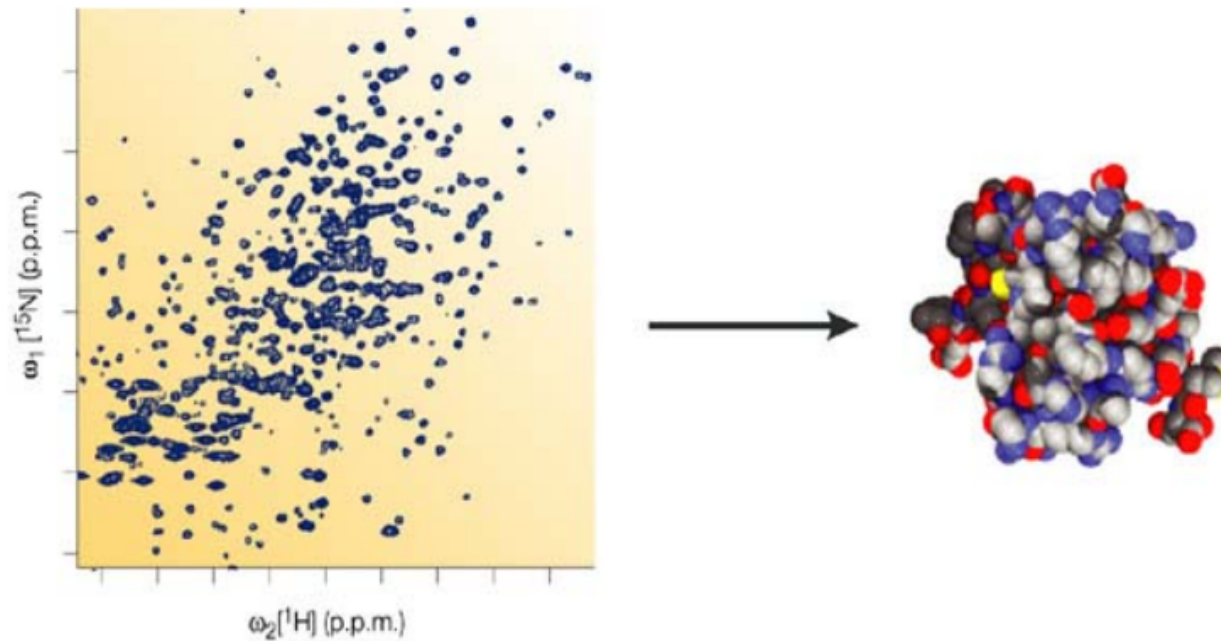
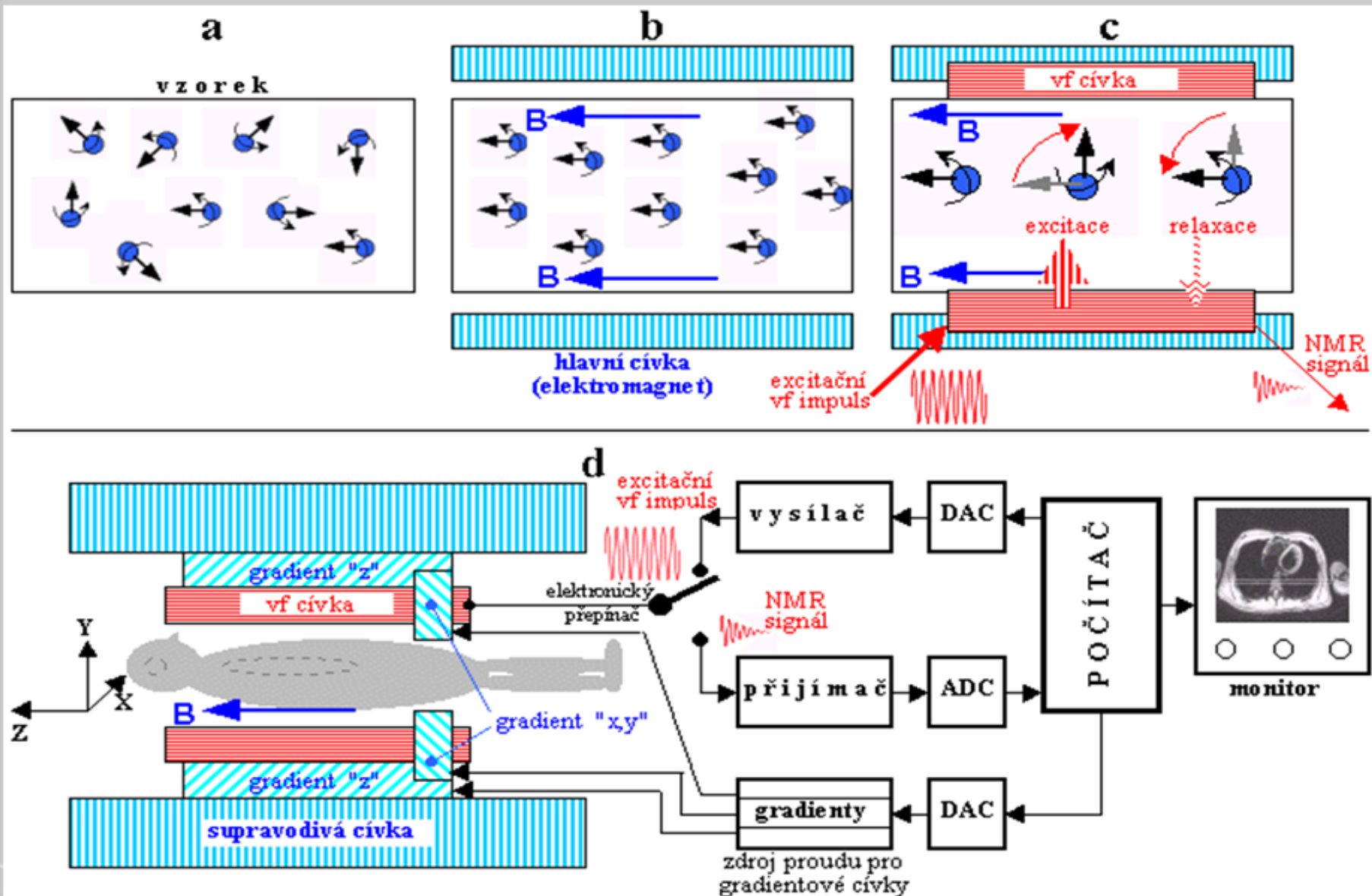


Figure 3 | Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and protein structure determination.

An example of the complex pattern obtained from NMR spectroscopy (left), which correlates the nitrogen atoms (^{15}N ; vertical axis) of amide groups with the hydrogen atoms (^1H ; horizontal axis) in a protein. A complex series of measurements that correlate other nuclei (carbon $\leftrightarrow$ hydrogen, hydrogen $\leftrightarrow$ hydrogen), calculations and deductions allows the structure of the protein to be derived (right).

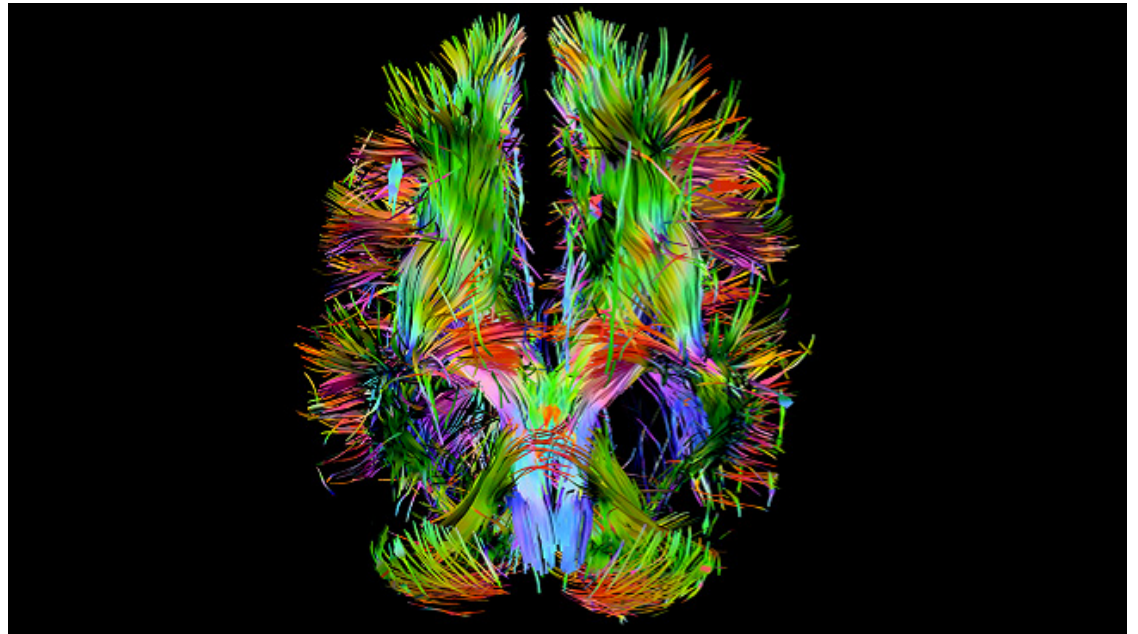
❖ schéma NMR tomografu



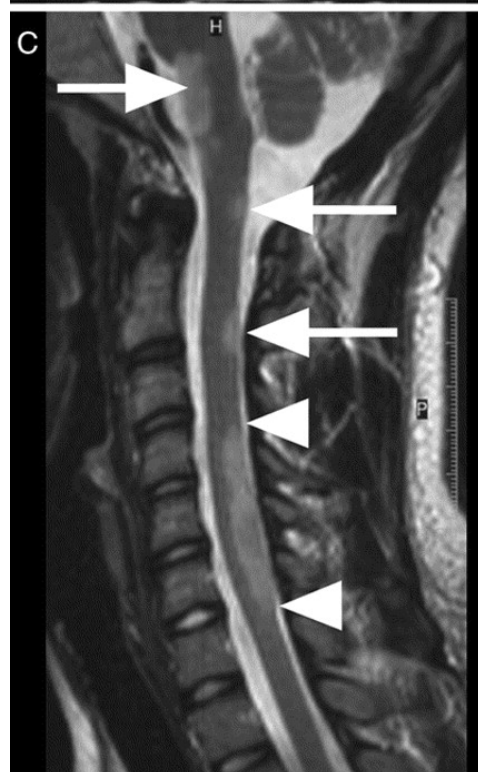
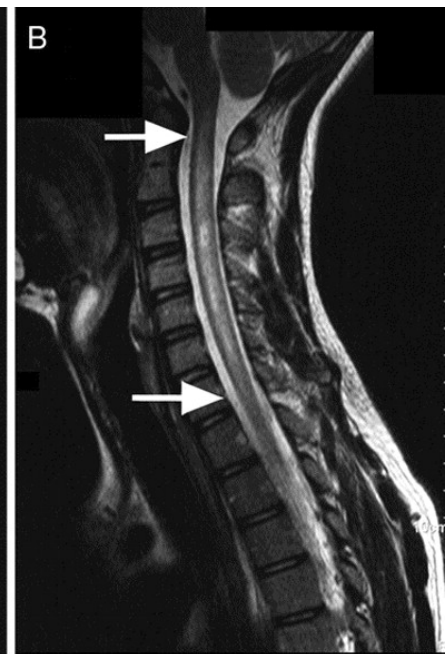
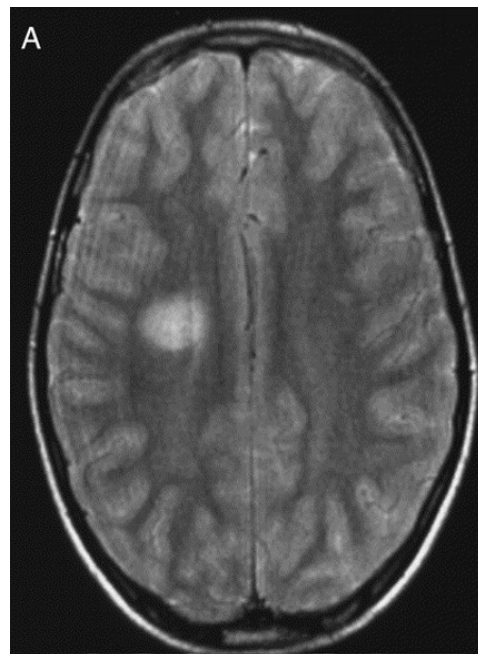
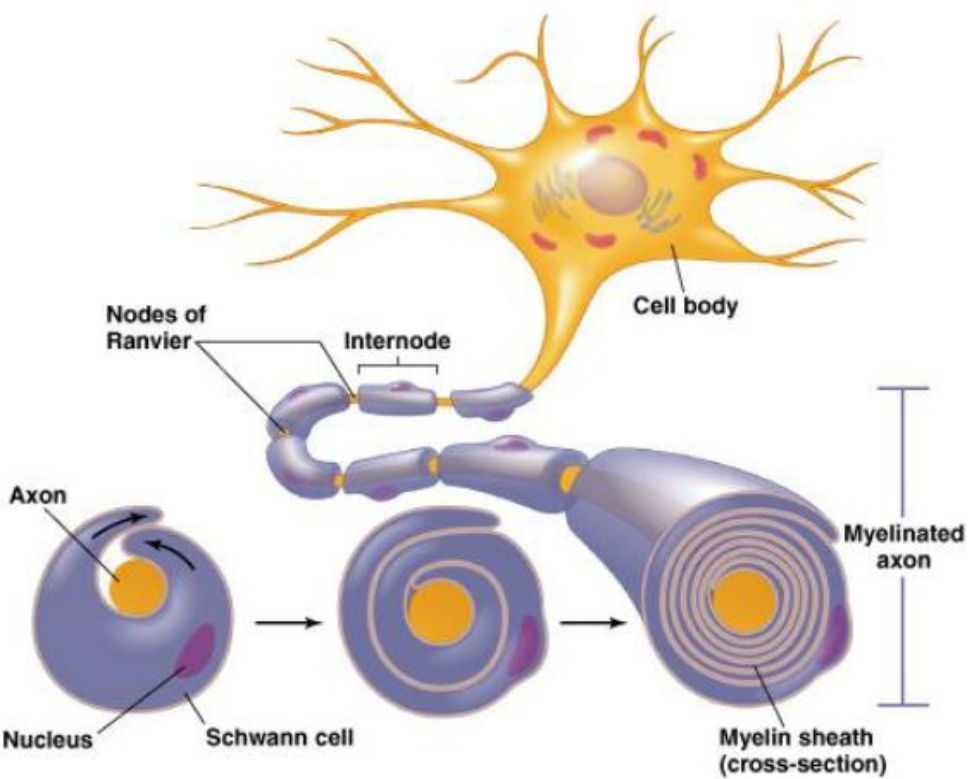
Using MRI, doctors and scientists are able to grossly visualize organs and tissues. This black-and-white MRI image displays tissues high in water and fat content in white and those low in water and fat in black.



Diffusion tensor imaging (DTI), a variation of MRI, tracks the movement of water molecules along nerve cell connections revealing the brain's pathways. The image shows fiber tracts in the adult human brain



Demyelination MRI





DANGER



STRONG MAGNETIC FIELD

Magnet is always on.

Notify the MRI technologist or radiologist if:

- 1) You have any metallic, electronic or magnetic implants or devices in your body**
- 2) You have been exposed to metal shavings from operations like grinding or sawing as part of your occupation**
- 3) You have metal embedded in your body due to injury**
- 4) You have any object which may contain metal or metallic parts (cell phones, scissors, watches, hearing aids, tools or keys)**

Failure to follow these instructions could result in serious injury or death.

