



Evropský sociální fond
Praha & EU: Investujeme do vaší budoucnosti

9. Detekce a identifikace aktivních složek a pomocných látek – **Ramanova spektrometrie**

Vadym Prokopec

Vadym.Prokopec@vscht.cz

9. Detekce a identifikace aktivních složek a pomocných látek – Ramanova spektrometrie
10. Spektrální metody pro identifikaci a kvantifikaci – NIR spektrometrie
11. Metody molekulové spektrometrie pro kvantitativní analýzu léčiv
12. NMR spektrometrie při analýze roztoků
13. Kvantitativní NMR spektrometrie
14. Hmotnostní spektrometrie pro identifikaci farmaceutických látek

Ramanova spektrometrie



Sir Chandrasekhara Venkata Raman
1888 – 1970

Nobel Cena za fyziku 1930

A New Type of Secondary Radiation

C. V. Raman and K. S. Krishnan, *Nature*, 121(3048), 501, March 31, 1928

The experiments we have made have confirmed this anticipation, and shown that in every case in which light is scattered by the molecules in dust-free liquids or gases, the diffuse radiation of the ordinary kind, having the same wave-length as the incident beam, is accompanied by a modified scattered radiation of degraded frequency.

Úvod k Ramanově spektroskopii



Důležitá jména

- **Adolf Gustav Stephan Smekal – 1923** – (základní vzdělání – Brno a Olomouc) předpověď jevu – modulace monochromatického záření vnitřními frekvencemi molekuly
- **Leonid Isaakovič Mandelštam a Grigorij Samuilovič Landsberg** – podrobnější teorie a experimenty s rtuťovou výbojkou a krystalem Landsberg G.S., Mandelstam L.I.; Naturwissenschaften 16, (1928) 557.
- **Georg Placzek** (nar. v Brně) – teorie Ramanova rozptylu, Placzek G.; Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt v Handbuch der Radiologie (Marx E., editor) 2 Auflage, Vol. VI, Part II, Leipzig, Germany 1934.
- **Gerhard Herzberg** - Molecular Spectra and Molecular Structure Vol. 1 Diatomic Molecules, Van Nostrand, New York, USA 1939., Vol. 2 Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules, 1945.



Úvod k Ramanově spektroskopii



1923 – Inelastic light scattering is predicted by A. Smekal

1928 – Landsberg and Mandelstam see unexpected frequency shifts in scattering from quartz

1928 – C.V. Raman and K.S. Krishnan see “feeble fluorescence” from neat solvents

1930 – C.V. Raman wins Nobel Prize in Physics

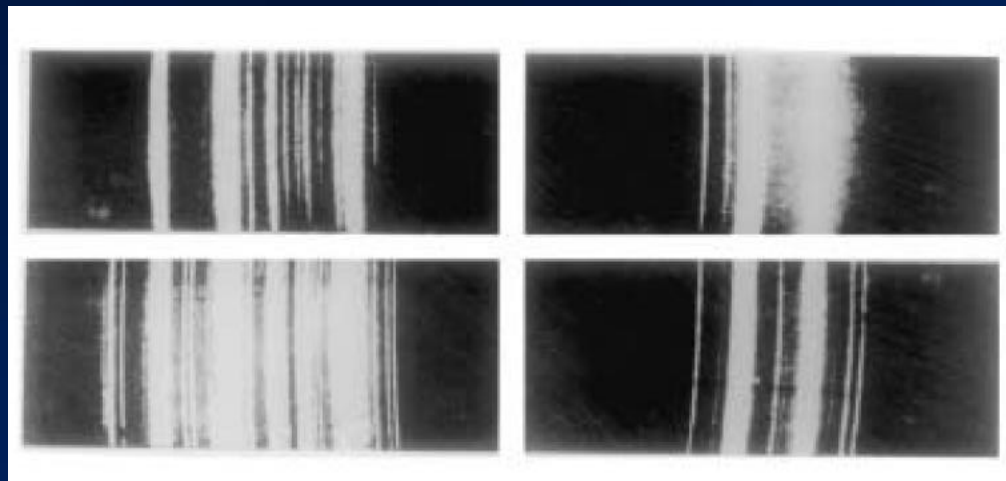
1961 – Invention of laser makes Raman experiments reasonable

1977 – Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is discovered

1997 – Single molecule SERS is possible

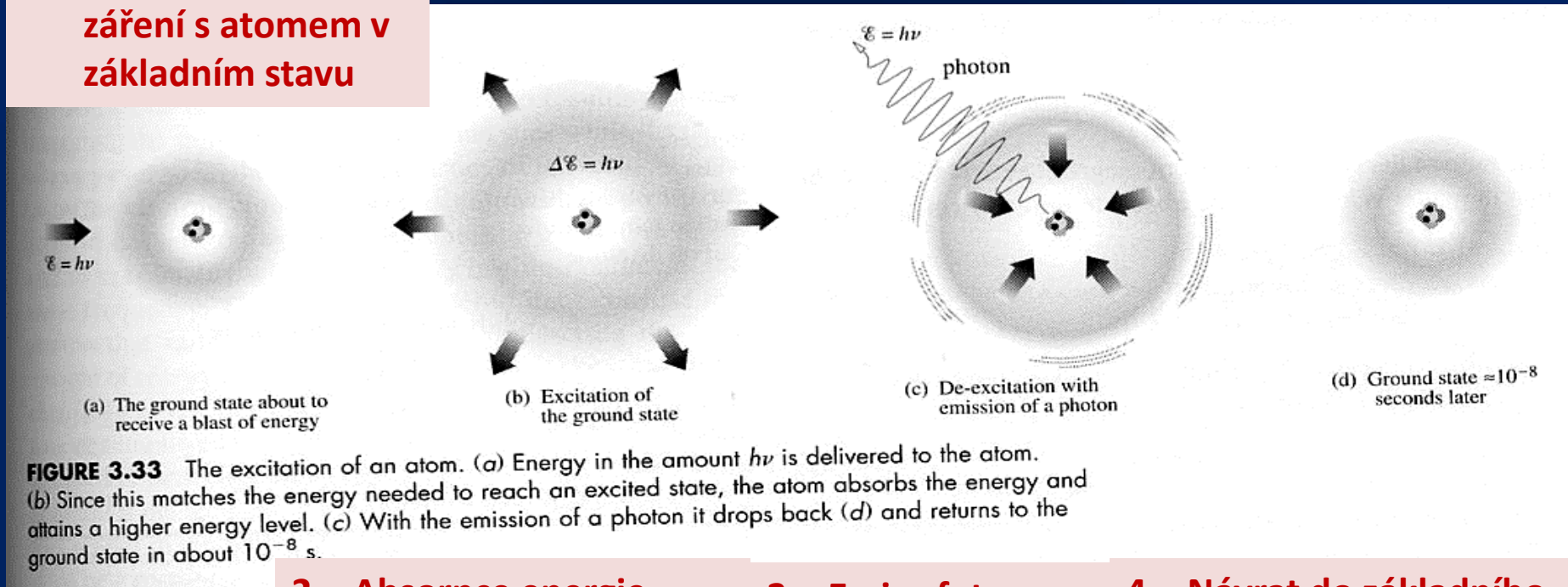
Filtrované spektrum
Hg výbojky

Rozptyl C_6H_6



Rayleighův rozptyl – popis děje

1. Interakce fotonu záření s atomem v základním stavu



2. Absorpce energie fotonu a přechod do excitovaného stavu

3. Emise fotonu o stejné energii

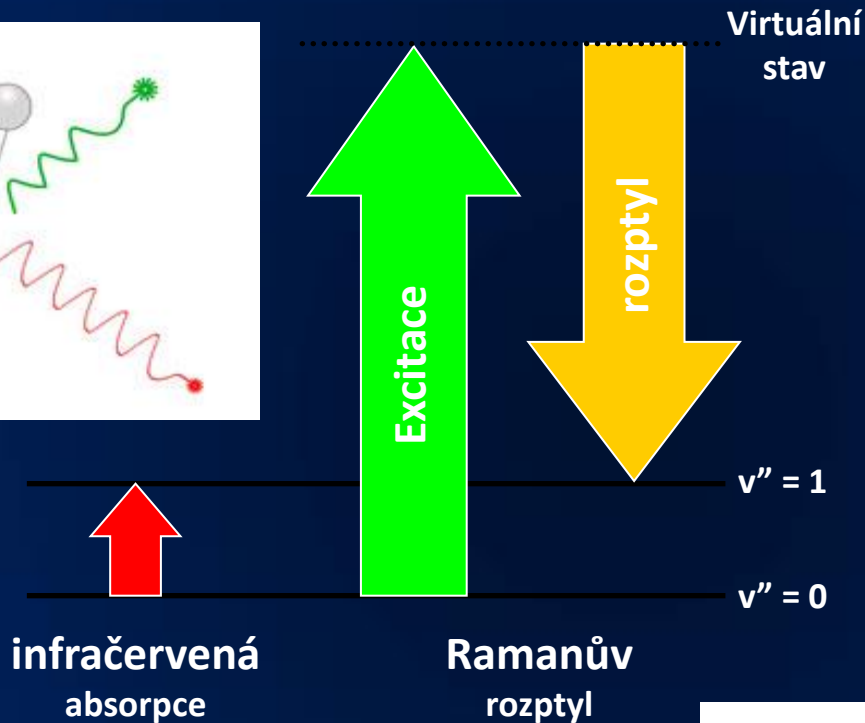
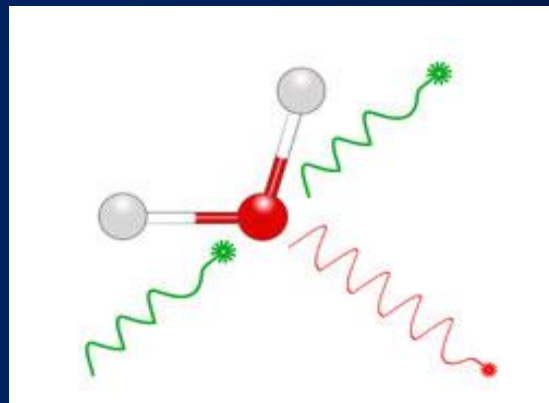
4. Návrat do základního stavu, celý proces trvá 10^{-8} s

- Elastický rozptyl (λ se nemění)
- Náhodný směr emise fotonu
- Zanedbatelné ztráty energie

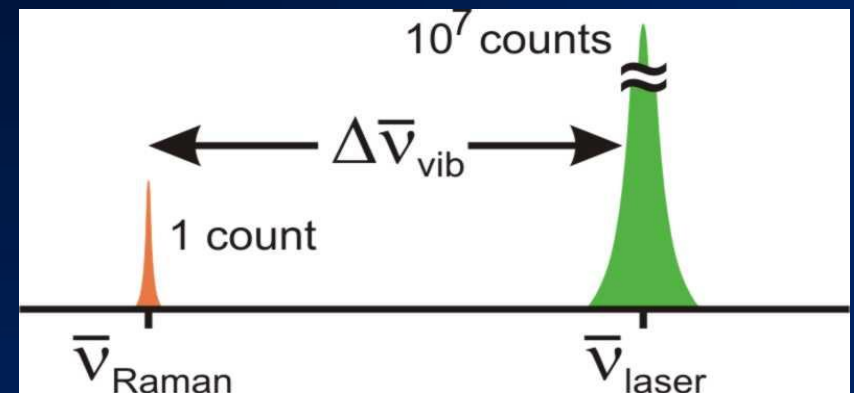
$$(E_{sc})_{\theta} = \frac{8\pi^4 (\alpha')^2 (1 + \cos^2 \theta) E_0}{\lambda^4 d^2}$$

Energetické přechody

1 z 10^7 fotonů je rozptýleno neelasticky



Rotační Ramanova spek.
Vibrační Ramanova spek.



Teoretický základ Ramanova jevu v klasickém přiblížení

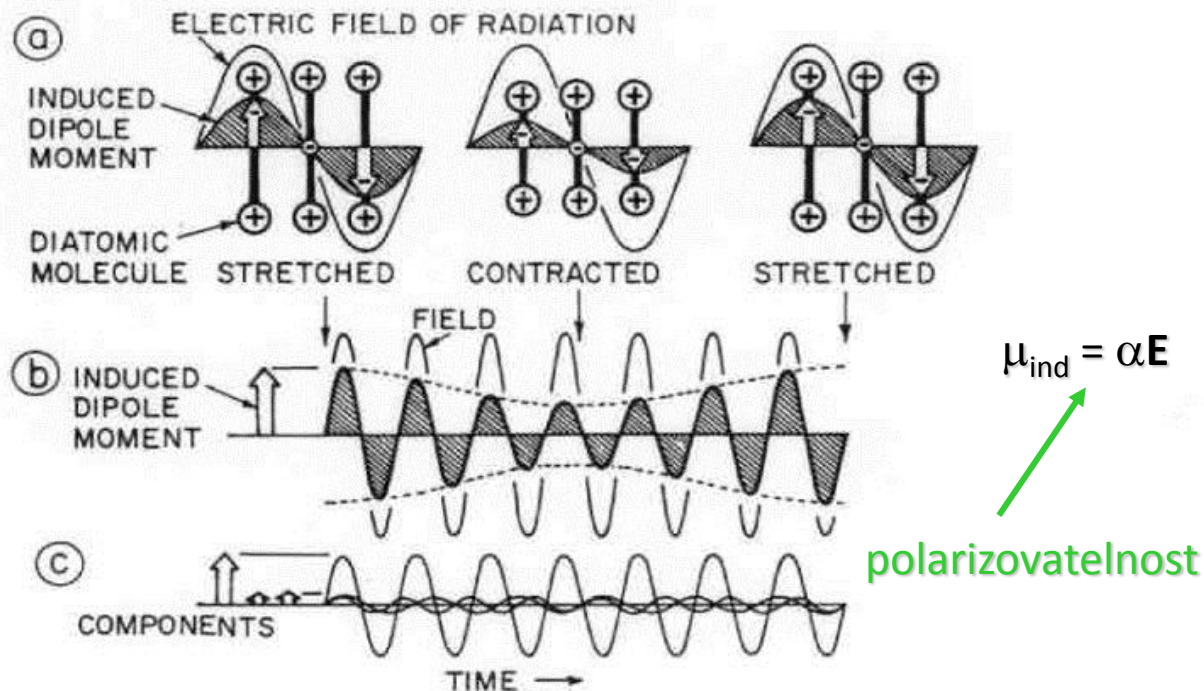
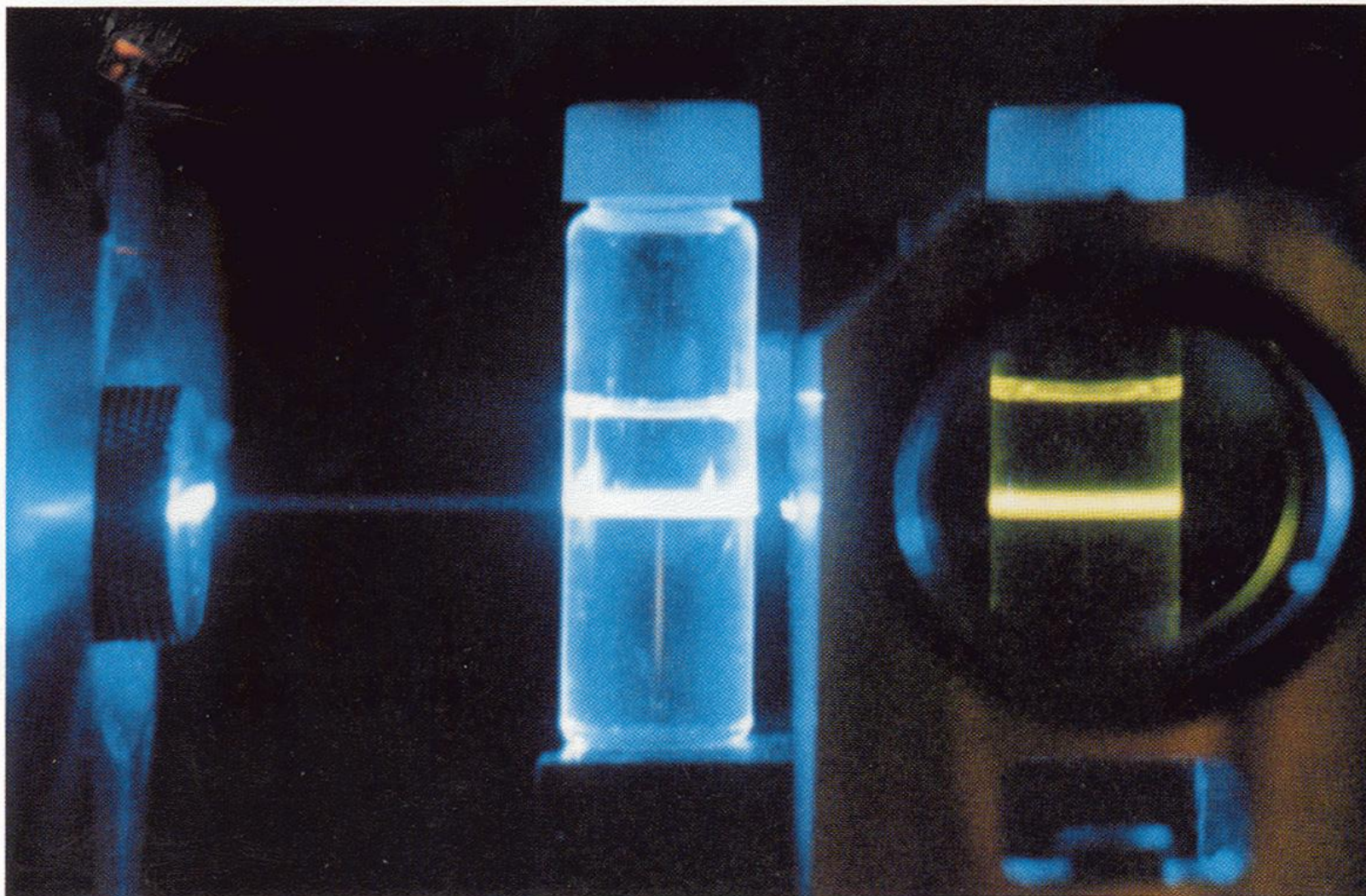


FIG. 1.32. Classical theory for the origin of the Raman effect. In (a) we see a diatomic molecule where “+” represents protons and “-” represents the center of gravity of the electrons. The electrons are displaced by the external field of the photon and an induced dipole moment is generated which changes when the bond length changes during the molecular vibration. The induced dipole moment is plotted in (b) as an amplitude modulated wave with steady amplitude components shown in (c) from which scattered radiation is generated.

Pozorování Ramanova rozptylu



Raman scattering visible to the unaided eye, from a 488 nm laser beam passing through liquid cyclohexane. Left vial exhibits mostly Rayleigh scattering which obscures much weaker Raman scattering. Right vial is viewed through a 488 nm band rejection filter, which permits observation of longer wavelength Raman scattering.

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

Podstata Ramanova jevu

ROZPTYL ZÁŘENÍ

- rozptýlený foton má odlišnou energii oproti dopadajícímu

zářivý **dvoufotonový přechod**

mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly,
jejichž energie jsou E_1 a E_2 ,

vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření
o frekvenci $\nu_0 > |E_2 - E_1| / h$,

provázený vyzářením rozptýleného fotonu
o energii $h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1)$,

kde $h\nu_{\text{vib}} = E_2 - E_1$

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

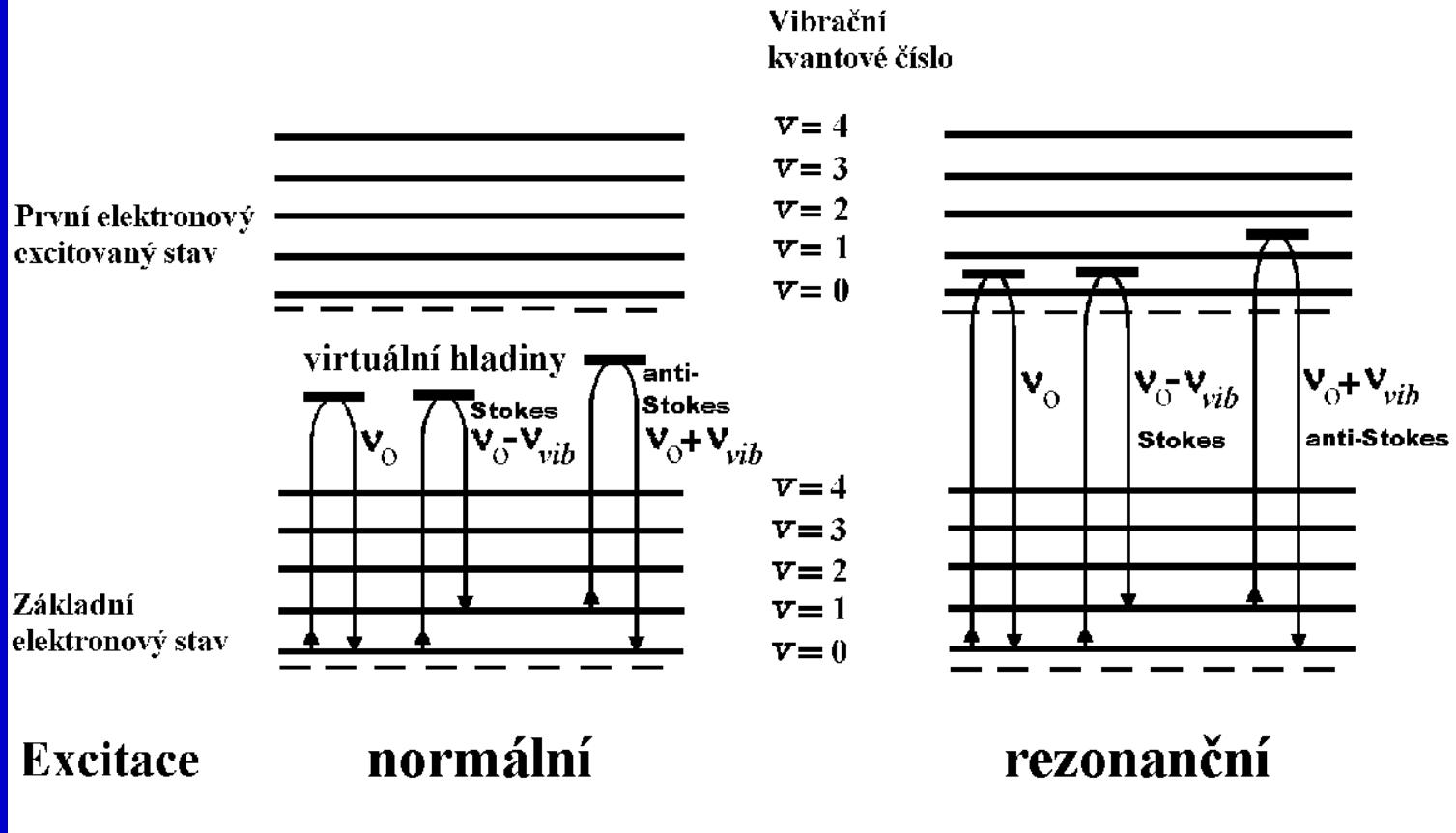


Schéma dvoufotonových přechodů
 Ramanův a Rayleighův rozptyl při excitaci normální a rezonanční

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

Základní výběrové pravidlo

Ramanova rozptylu

změna **polarizovatelnosti** během vibračního pohybu

$$p = \alpha E \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q} q E \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib}) t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib}) t] \}$$

$$\frac{\partial \alpha}{\partial q} \neq 0$$

Ramanova Spektroskopie – srovnání s IR

Komplementární metoda k IR

- záření o určité frekvenci je rozptýleno molekulou s níž interaguje, dochází ke změně frekvence dopadajícího záření
- změny frekvence odpovídají vibračnímu přechodu v molekule → souvislost s infračervenou absorpcí.
- Spektrum Ramanova rozptylu doplňuje infračervené absorpční spektrum z hlediska informací o struktuře molekuly
- mechanismy obou jevů jsou odlišné

Srovnání Raman & IR:

IR

- Vibrační módy
- Změna dipólového momentu



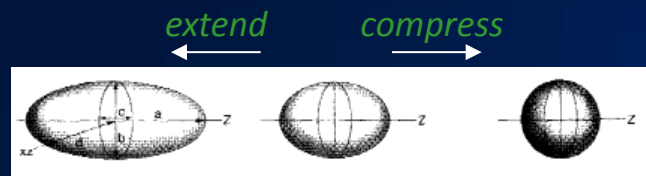
- Přechod do excitovaného

vibračního stavu

- Antisymetrické vibrace(active)

Raman

- Vibrační módy
Změna polarizovatelnosti



krátkodobá distorze elektronového oblaku

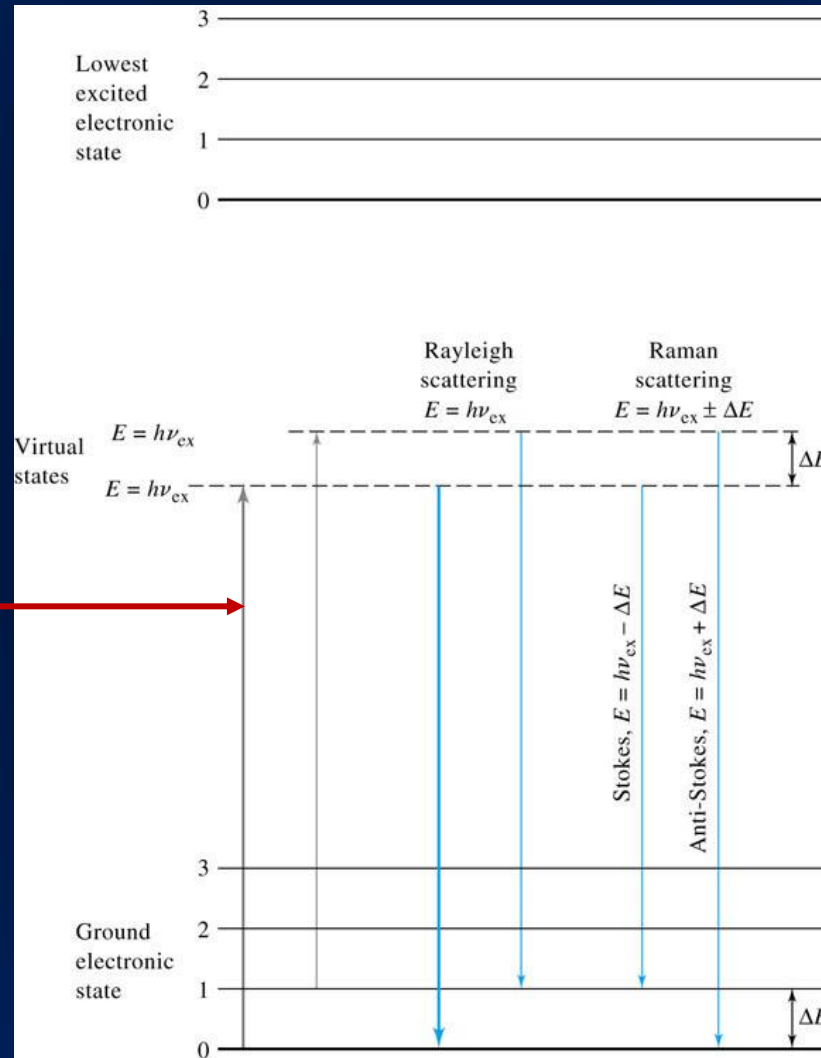
v okolí chemické vazby

- symetrické vibrace (active)

Základní principy Ramanova jevu:

- rozptyl záření molekulami vzorku ve všech směrech v prostoru v důsledku absorpce fotonu a přechodu do virtuálního stavu s následnou reemisí

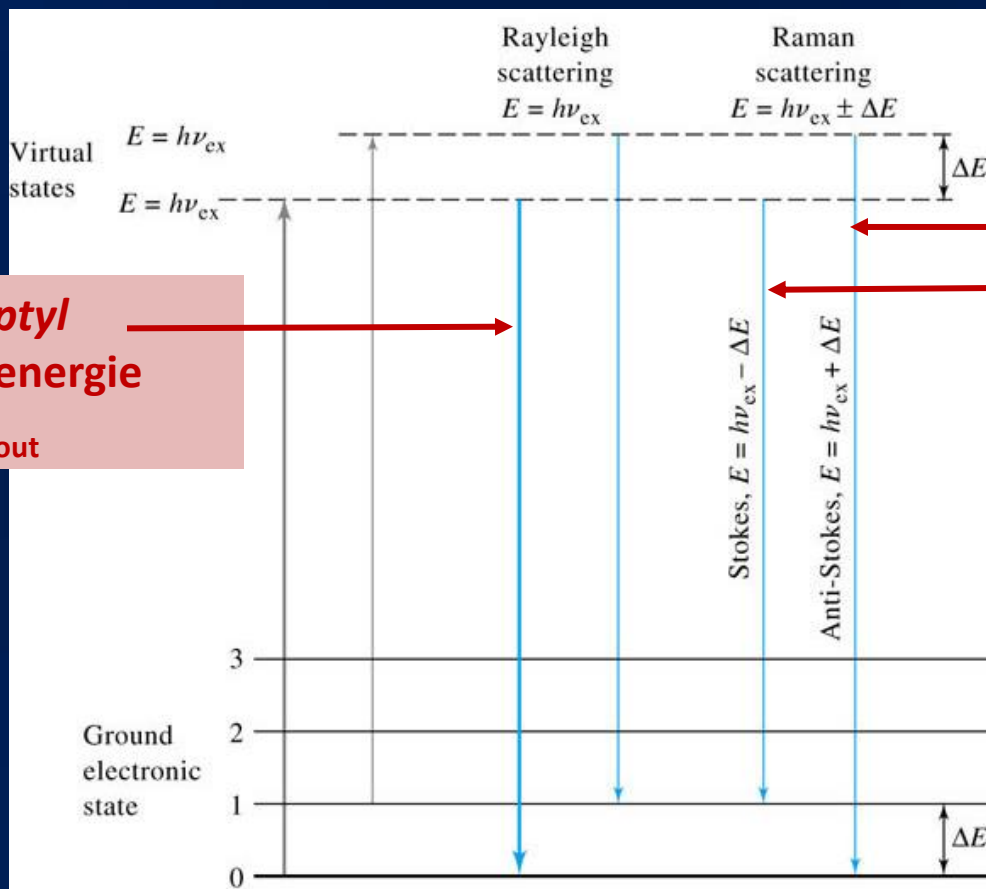
energie absorbovaná molekulou od fotonu není kvantována



✌ Nedochází ke změně elektronového stavu

✌ Libovolný počet virtuálních stavů

- some scattered emissions occur at the same energy while others return in a different state

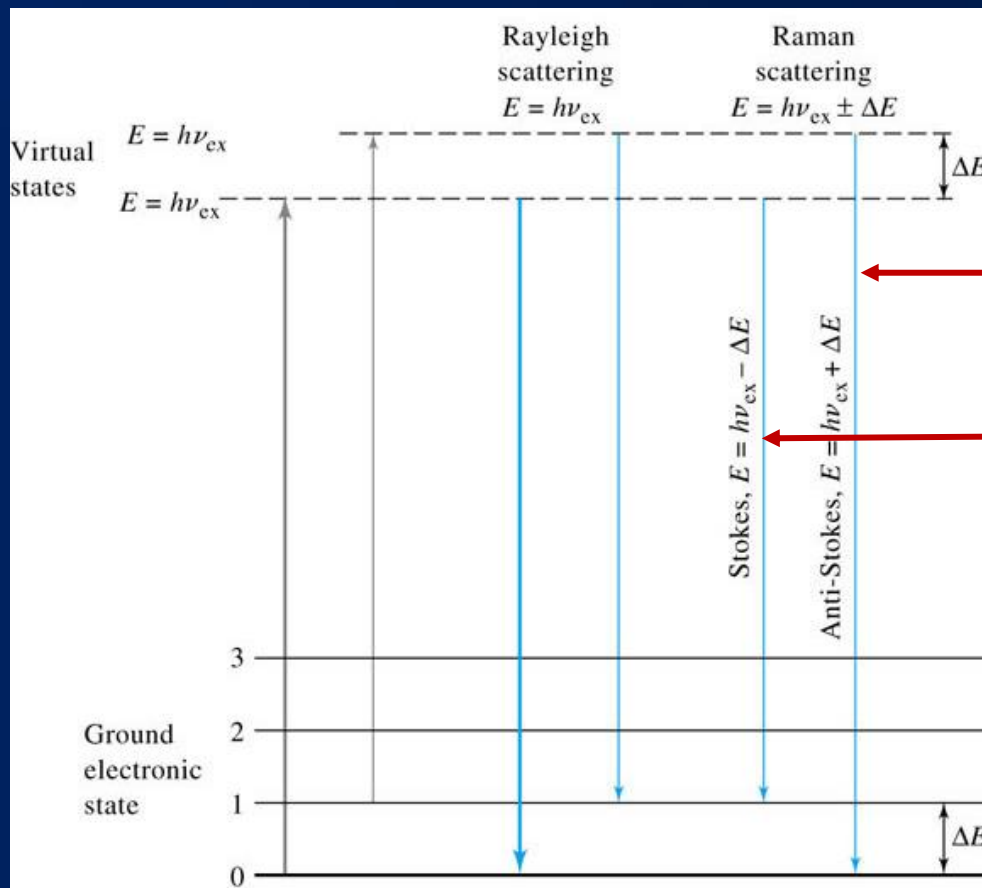


Rayleighův rozptyl
Nulová změna energie
 $h\nu_{in} = h\nu_{out}$

Ramanův rozptyl
Změna energetické hladiny
 $h\nu_{in} \neq h\nu_{out}$

Elastický rozptyl: interakce fotonu s molekulou není doprovázená změnou energie
Neelastic rozptyl: při interakci fotonu s molekulou dochází k energetickým změnám

Dva typy přechodů v Ramanově rozptylu

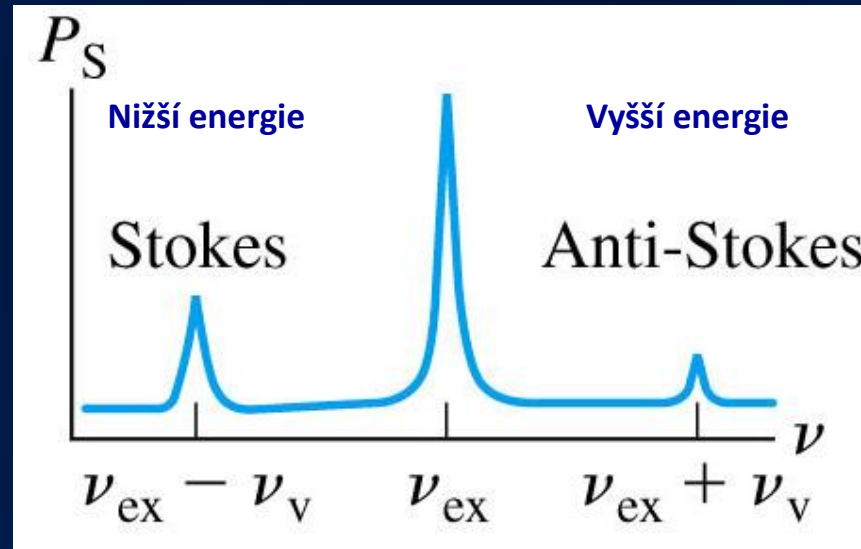
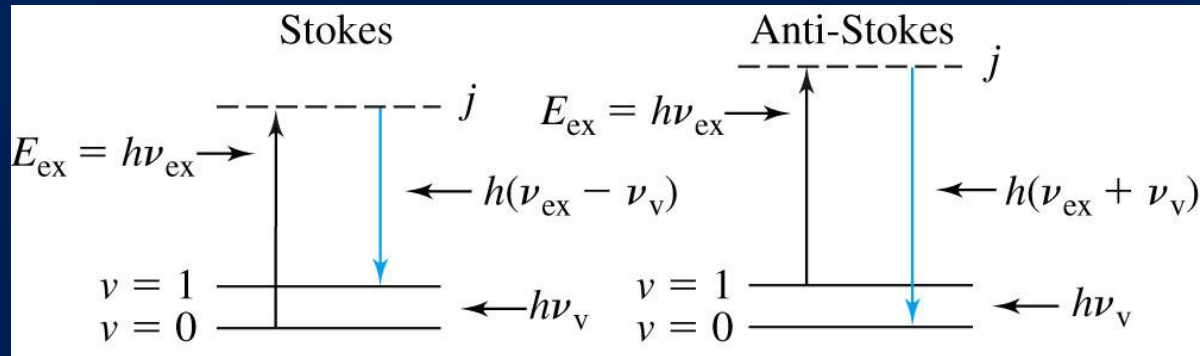


Anti-Stokes: $E = h\nu + \Delta E$

Stokes: $E = h\nu - \Delta E$

ΔE – energie odpovídající přechodu ze základního vibračního stavu do prvního excitovaného – IR absorbce

Výsledné Ramanovo spektrum



Probability of Emission $\propto$ Observed Intensity

Raleigh scattering $\gg$ Stokes $\gg$ anti-Stokes

difference in population of energy levels of vibrational transitions

Intensity of Raman lines are 0.001% intensity of the source

Aktivní vibrační módy v Ramanu:

- nutná změna polarizovatelnosti molekuly během vibrace
- polarizovatelnost souvisí s prostorovou distribucí elektronového oblaku



příklad:



$\text{O} = \text{C} = \text{O}$ IR inactive

Raman active



$\text{O} = \text{C} = \text{O}$ IR active

Raman inactive

IR & Raman jsou komplementární metody. Některé vibrace jsou aktivní jak v Ramanově tak i v IR spektru (SO₂ – nelineární molekula)

Obecně:

V IR jsou více aktivní polární funkční skupiny (R-OH, -C=O, atd.)

V Ramanu vyniknou např. vibrace aromatického kruhu a skeletární vibrace alifatického řetězce (C=C, -CH₂-, atd.)

- Raman does not “see” many common polar solvents can use with aqueous samples – advantage over IR

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

Vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na
tom, zda je studujeme infračervenou
nebo Ramanovou spektroskopií,

avšak intenzity spektrálních linií
budou pro obě spektroskopické techniky
zřetelně odlišné.

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

V Ramanově spektru je intenzita pásů
úměrná

druhé mocnině změny polarizovatelnosti

během vibračního pohybu

$$(\delta\alpha/\delta q)^2,$$

zatímco v infračerveném spektru

je úměrná

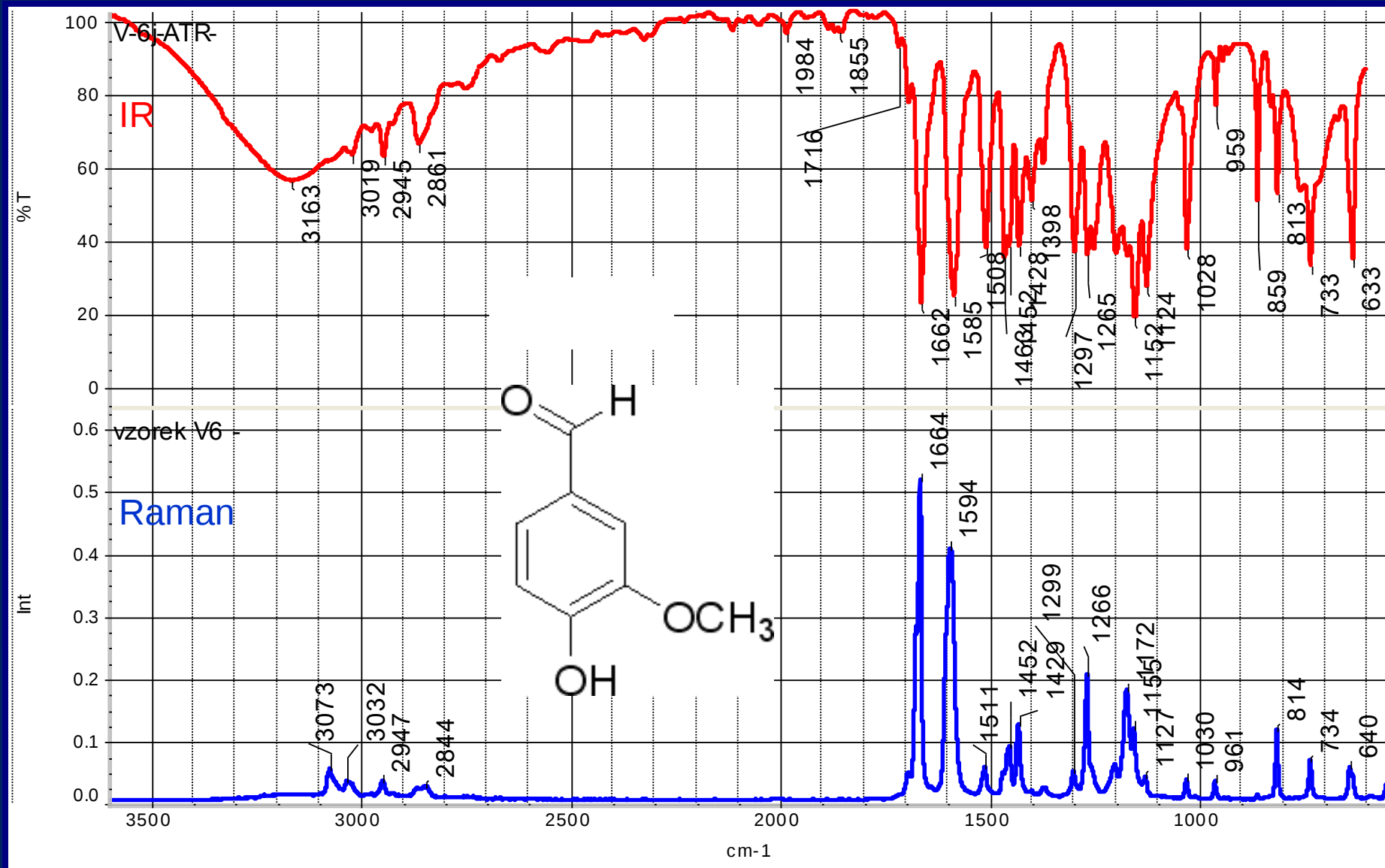
druhé mocnině změny dipólového momentu.

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

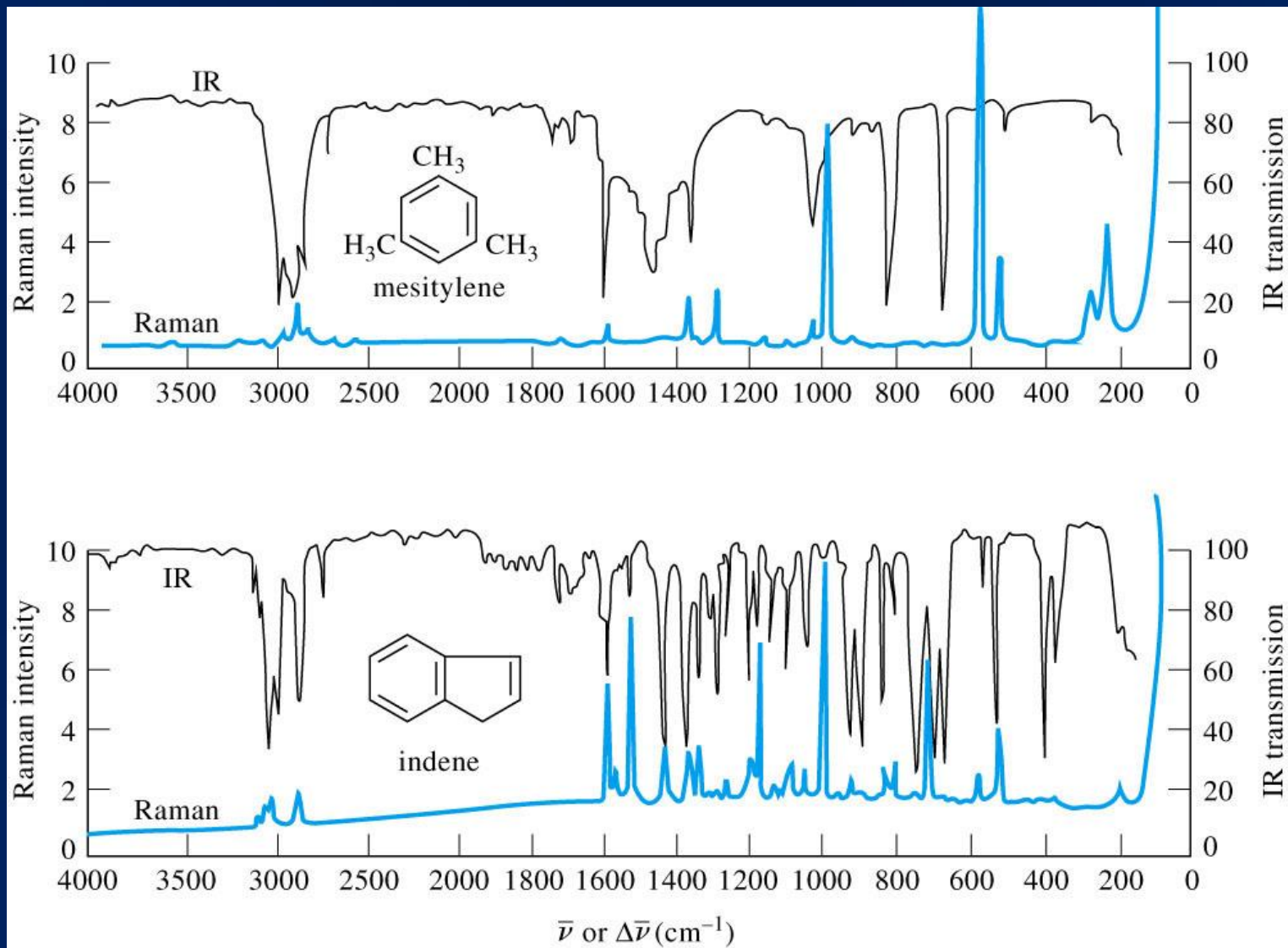
Vztah intenzity pásů
- možnost měření teploty vzorku

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_{\text{vib}}}{\nu_0 - \nu_{\text{vib}}} \right)^4 e^{-\frac{h \nu_{\text{vib}}}{k T}}$$

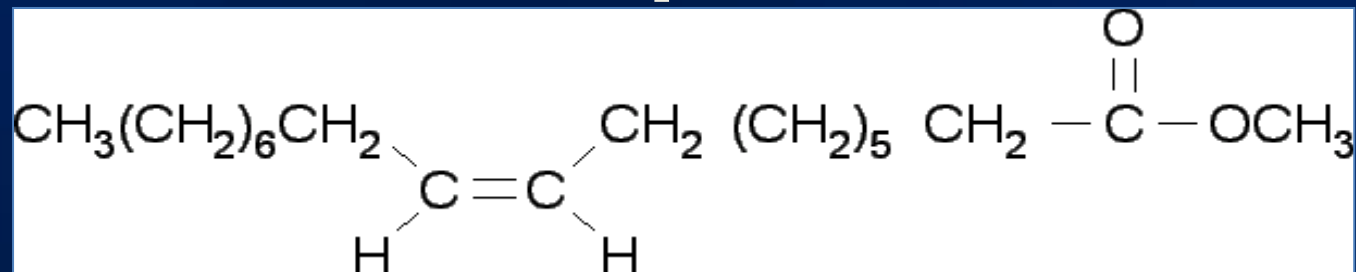
IČ vs Ramanova spektrometrie



IČ vs Ramanova spektrometrie



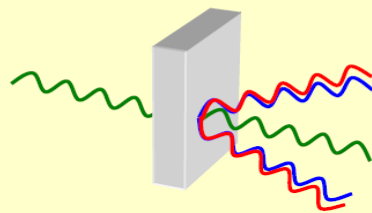
IČ vs Ramanova spektrometrie



IR



Raman



FTIR

Raman

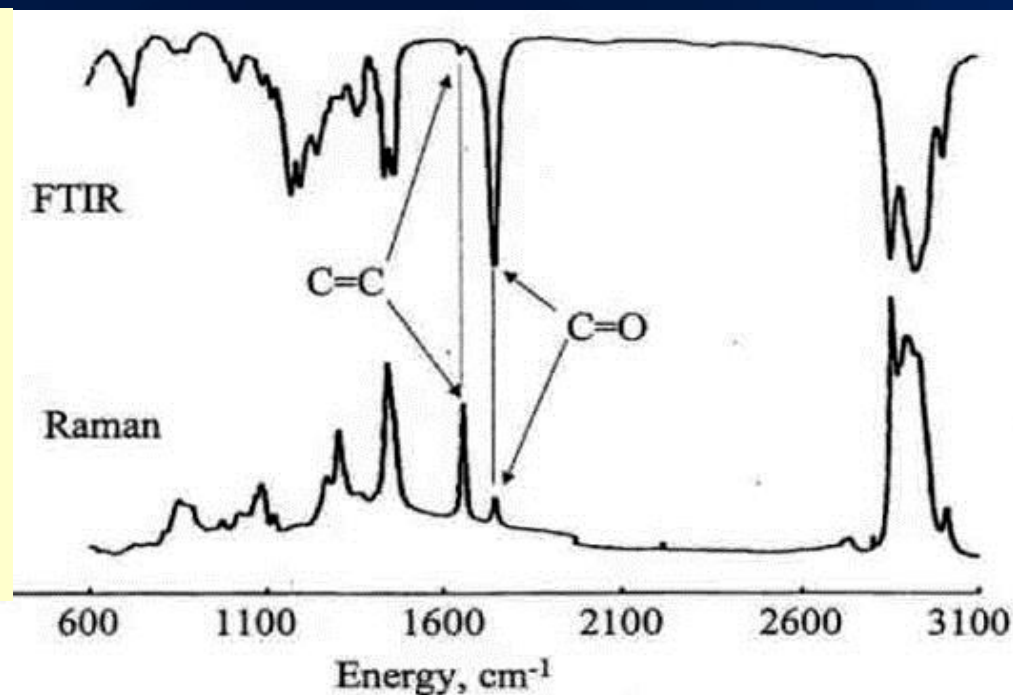


Figure 2.2. FTIR (upper) transmission and Raman scattering (lower) of oleic acid methyl ester.

Výhody Ramanovy spektrometrie oproti IR

Lze použít vodu jako rozpouštědlo

Vhodné pro měření biologických vzorků v nativním stavu

Ačkoli podstatou Ramanova jevu jsou vibrační přechody při infračervených frekvencích, k měření spektra lze použít viditelnou excitaci (nebo NIR)

=> Využití skla – skleněné optické prvky, cely, optická vlákna

Jen malá pravděpodobnost overtonů a kombinačních pásů => méně překryvů pásů ve spektrech.

Totálně symetrické vibrace jsou pozorovatelné

Ramanova intenzita je úměrná koncentraci vzorku a výkonu laseru.

Experimentální výhody

- **možnost měření ve vodném prostředí**
 - ↳ nízká intenzita Ramanova rozptylu pro vodu
 - ↳ používané optické materiály nejsou citlivé na vlhkost
- **možnost měření ve skleněných nádobách**
 - ↳ měření v uzavřených ampulích - např. pod vakuem
- **snadné využití skelné vláknové optiky**
- **minimální požadavky na úpravu pevných vzorků**
- **intenzivní pásy -C=C-, -N=N-, -S-S- a dalších symetrických vibrací**

Výhody IR oproti Ramanu

Jednodušší a levnější instrumentace.

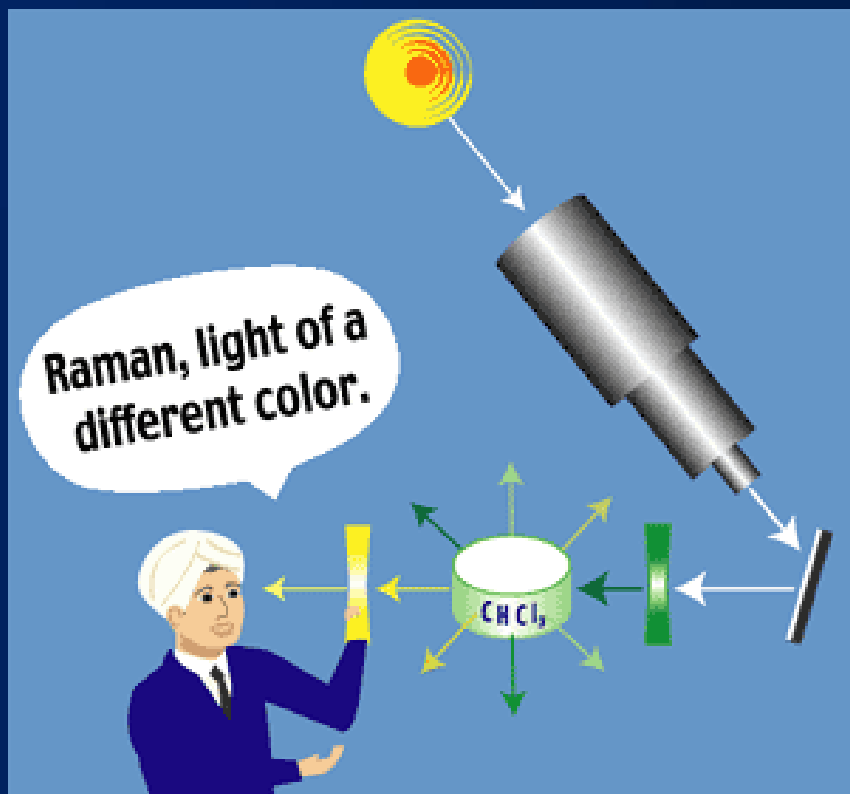
Měření spekter je méně závislé na absolutní konfiguraci přístroje
vzhledem k měření relativního poměru intenzit

Nižší detekční limit než v (normálním) Ramanu

Riziko fluorescenčního pozadí.

Užitečná pro měření vibrací funkčních skupin s velmi nízkou
polarizovatelností (e.g. C–F, C–Cl).

Ramanova spektrometrie - instrumentace



Zdroj záření

- Slunce a filtry
- rtuťová výbojka
- **LASERY**

- monochromatické
- koherentní

Detekce světla

- oči
- fotografické desky

- fotonásobiče
- **CCD čipy**

Instrumentace

Lasery pro excitaci Ramanova jevu

<u>TYP laseru</u>	<u>vlnová délka [nm]</u>
He-Ne	632,8
Ar ⁺	514,5
Ar ⁺	488,0
Ar ⁺	457,9
Kr ⁺	568,2
Kr ⁺	647,1
Kr ⁺	676,4
Kr ⁺	752,6
Nd-YAG	1064
Nd-YAG - 2f	532
diodové	780, 785 - NIR
barvivové	360 - 750 - UV, vis

Instrumentace- dva základní typy spektrometrů

Disperzní

- Separace jednotlivých vlnových délek záření během měření spektra – použití difrakční mřížky
- Viditelná excitace
- CCD detektor
- Vyšší intenzita Ramanova rozptylu ($\sim 1/\lambda^4$)
- Větší riziko fluorescenčního pozadí
- Spektrální rozlišení je dáno parametry mřížky – nejlépe pro každou excitaci jinou mřížku
- Rozsah excitačních vlnových délek je omezen parametry CCD Detektoru – max 780-785 nm

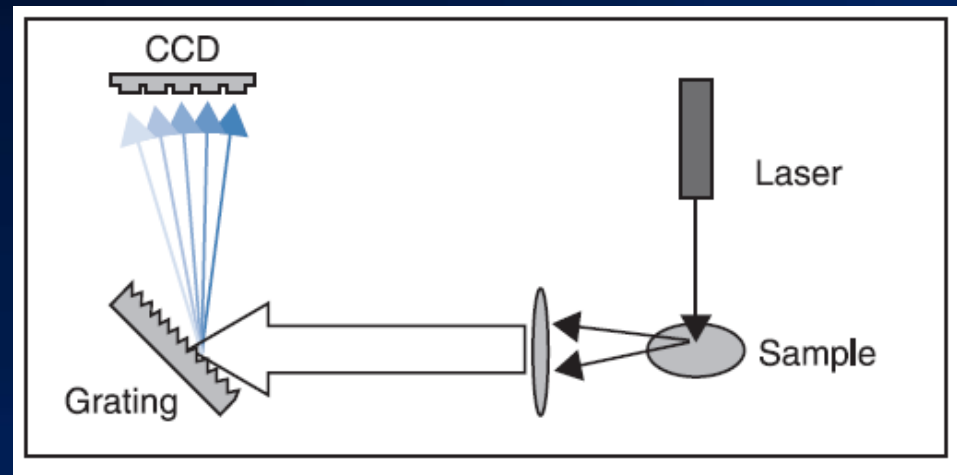
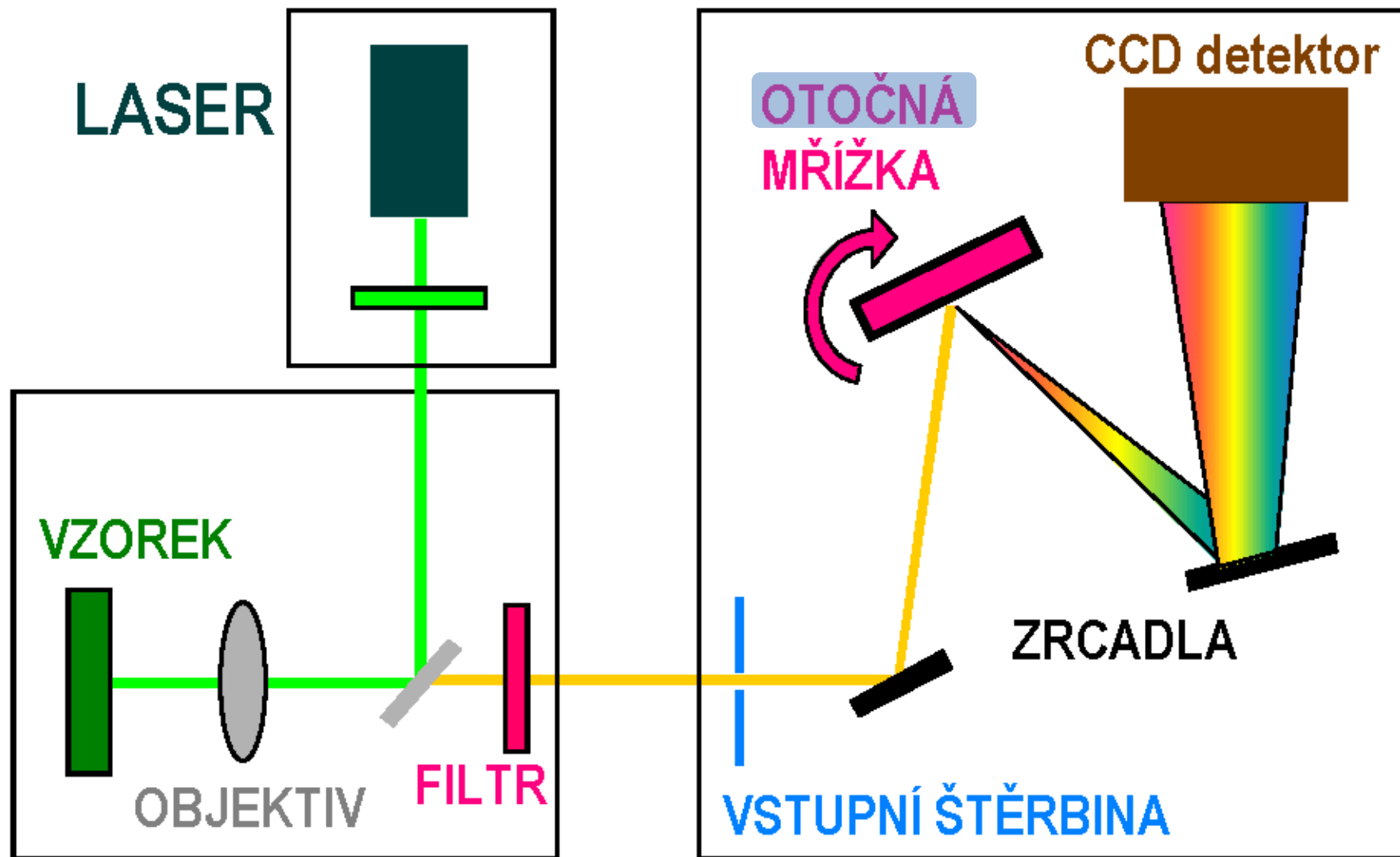


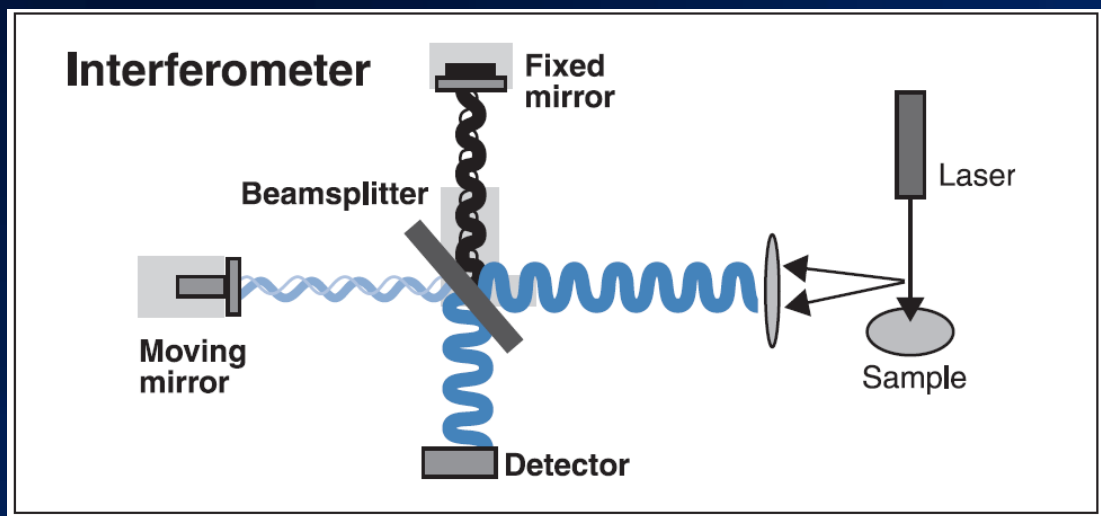
Schéma Ramanova disperzního přístroje



Instrumentace- dva základní typy spektrometrů

S Fourierovou transformací

- excitace v blízké infračervené oblasti – obvykle 1064 nm
- téměř nulová pravděpodobnost fluorescence
- menší intenzita rozptylu
- použití interferometru
- Jednokanálové detektory (InGaAs, Ge – chlazený N_2)
- Záznam celého spektra najednou
- Velmi přesný frekvenční záznam, minimální posuny maxim pásů díky zabudovanému laseru v interferometru
- Vhodná metoda pro záznam spekter do knihovny



Principy FT Ramanovy spektroskopie

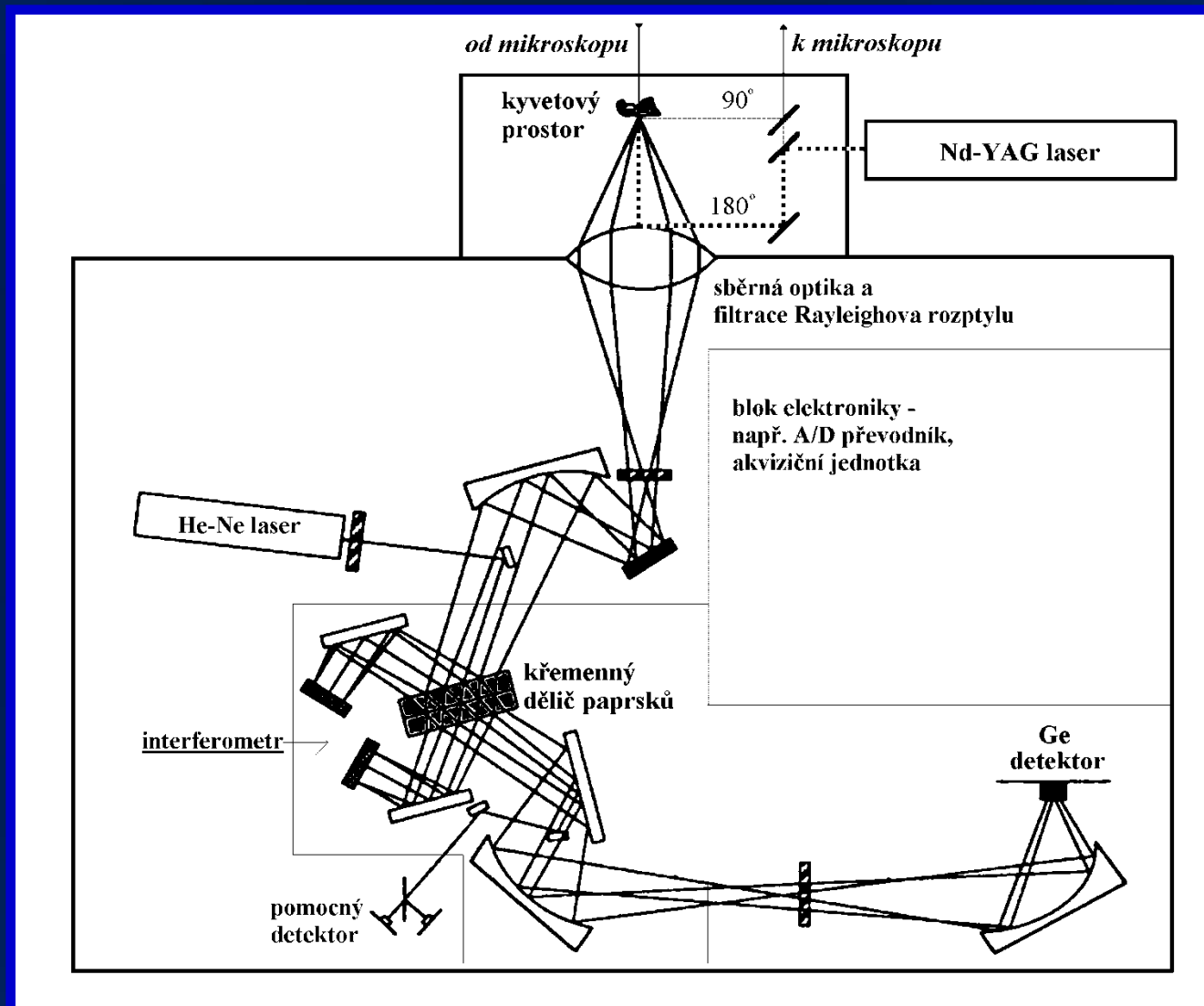


Schéma FT Ramanova spektrometru s NIR excitací

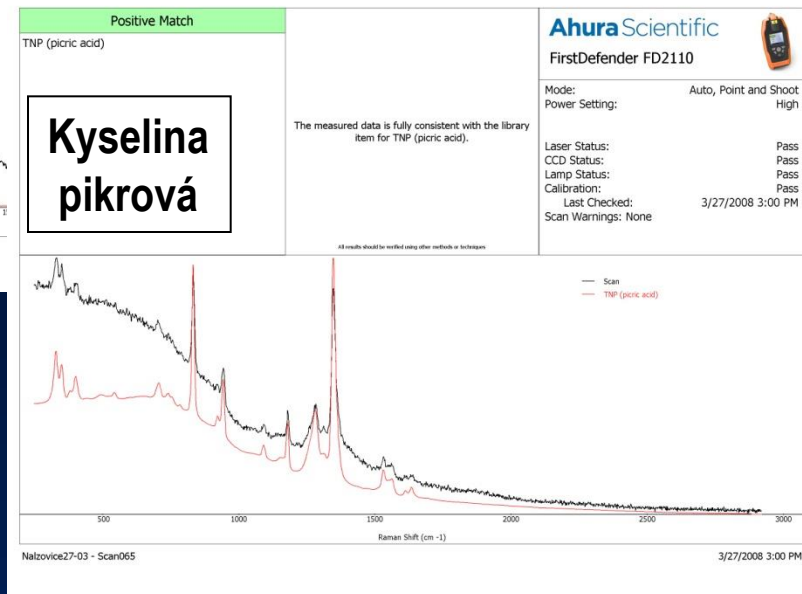
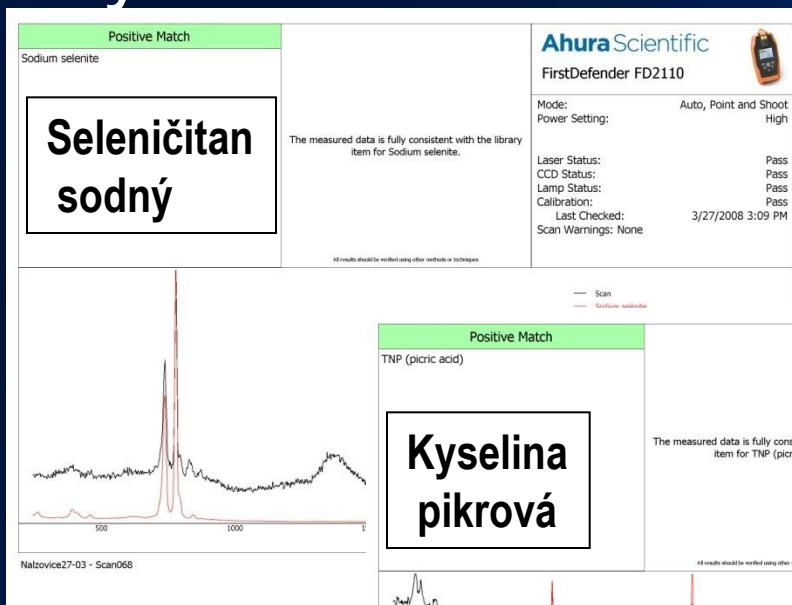
Instrumentace

- přenosné přístroje – „ruční“, mobilní
- stolní kompaktní spektrometry
- stolní spektrometry s volbou excitační vlnové délky
- stolní mikrospektrometry
- vědecké systémy
- průmyslové univerzální systémy
- aplikačně přizpůsobené (jednouúčelové) systémy



Terénní měření

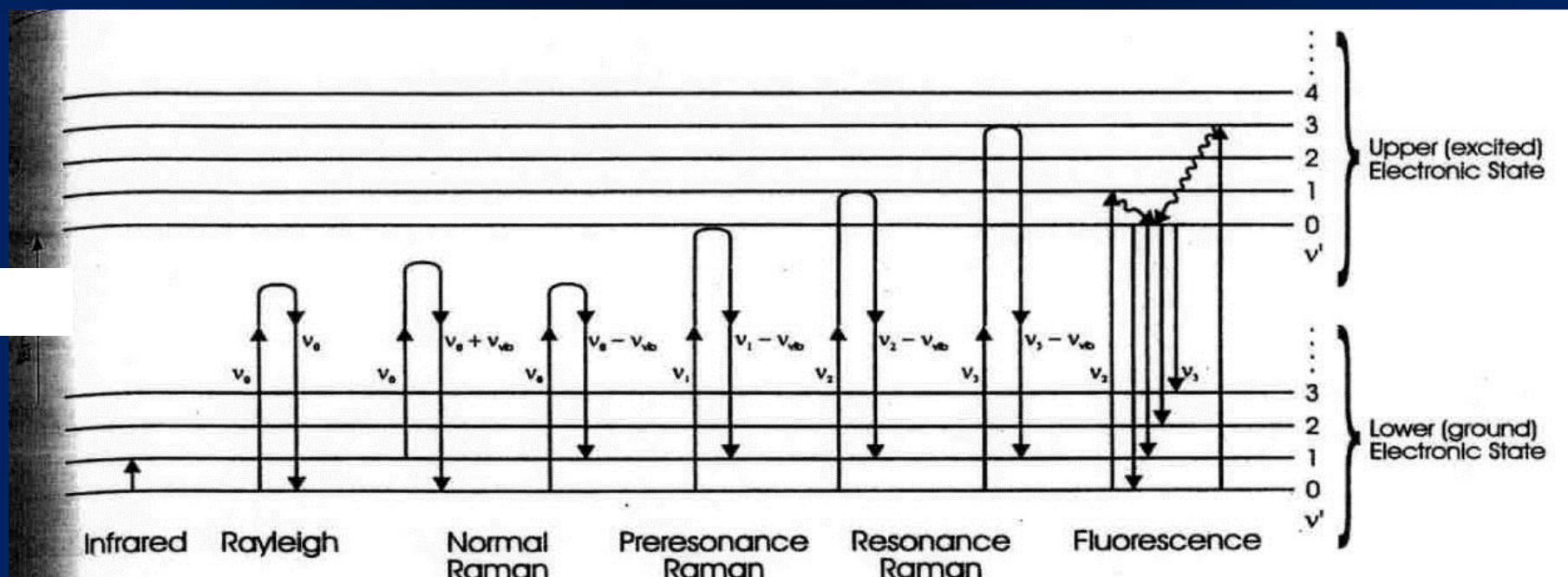
- Přenosný dispersní Ramanův spektrometr – AHURA
- Nalžovice – areál bývalého statku



Resonanční Raman

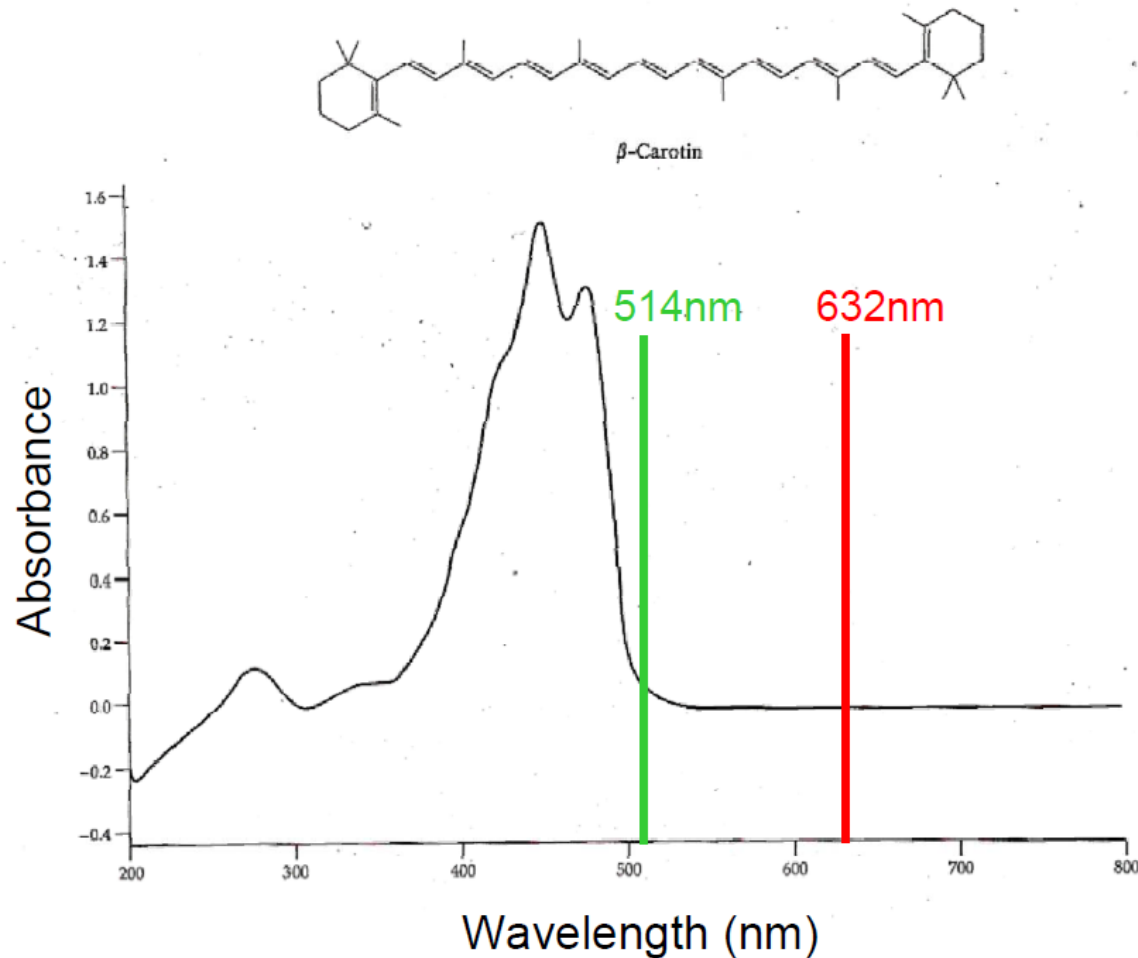
Intenzity Ramanových linií mohou být zesíleny resonančním faktorem až $10^5 \Rightarrow$ Detekční limity 10^{-6} to 10^{-8} M.

Obvykle se používá proladitelný viditelný laser jako zdroj.



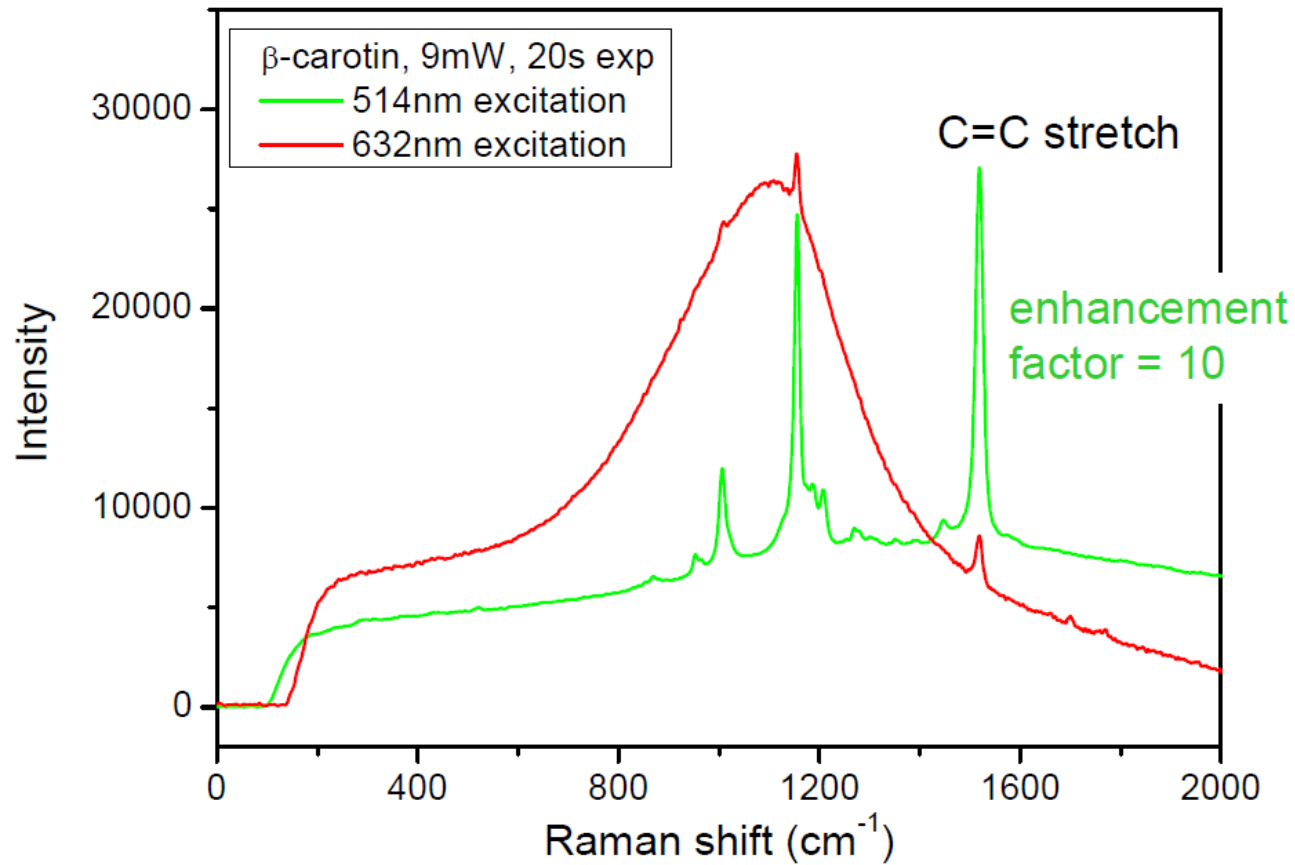
Resonanční Raman

Example: β -Carotin



Resonanční Raman

Example: β -Carotin



Rezonanční Ramanův rozptyl

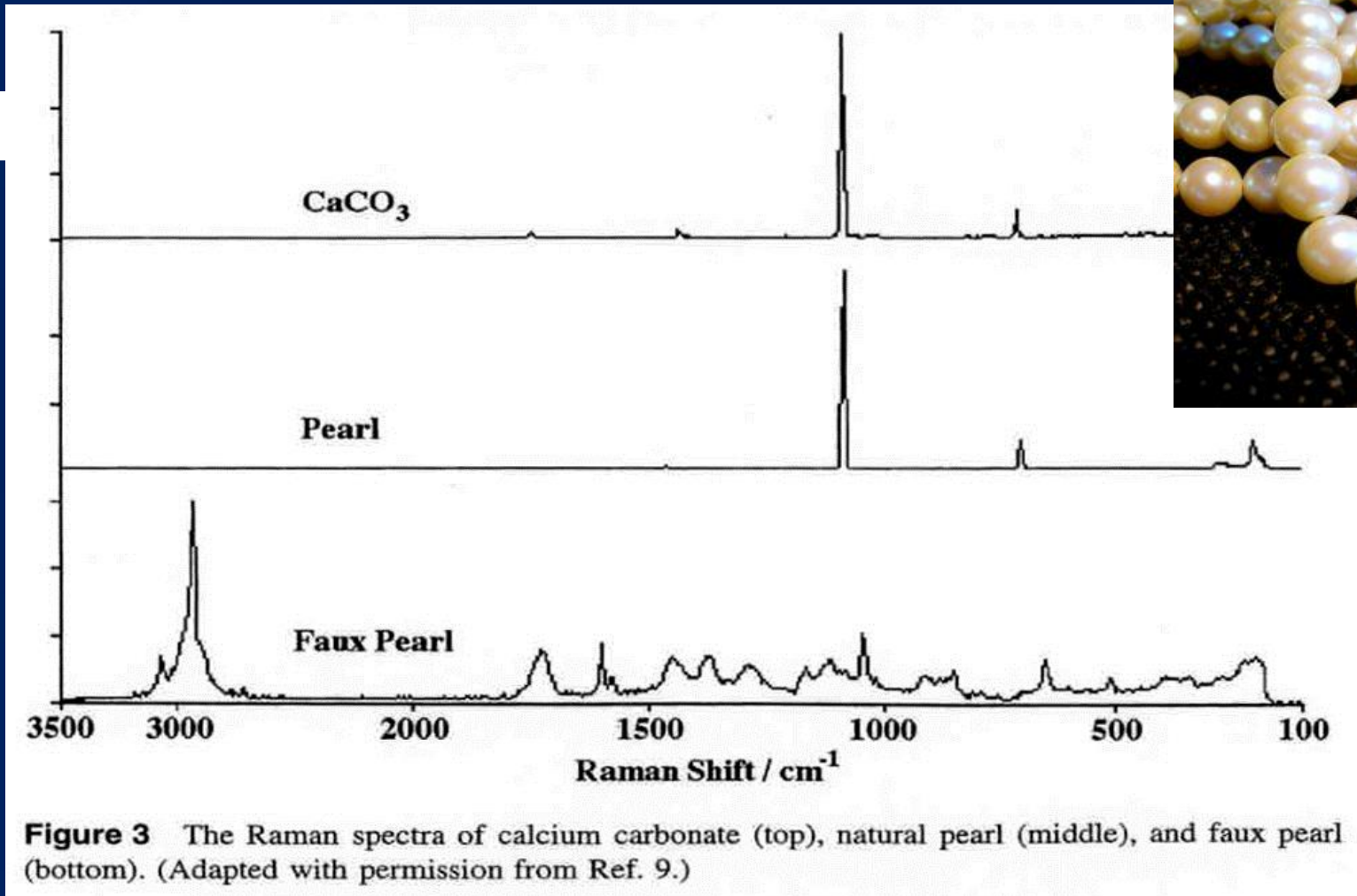
- virtuální hladina v blízkosti elektronově excitovaného stavu
 - UV rezonanční Ramanova spektroskopie – nukleové kyseliny, proteiny
 - Viditelná oblast – koordinanční sloučeniny, organická barviva, hemoproteiny
 - NIR – „prerezonance“ ? – nízkoenergetické elektronové přechody
 - Excitační profily – závislost Ramanových spekter (vybraných pásů) na excitační vlnové délce

Studované materiály

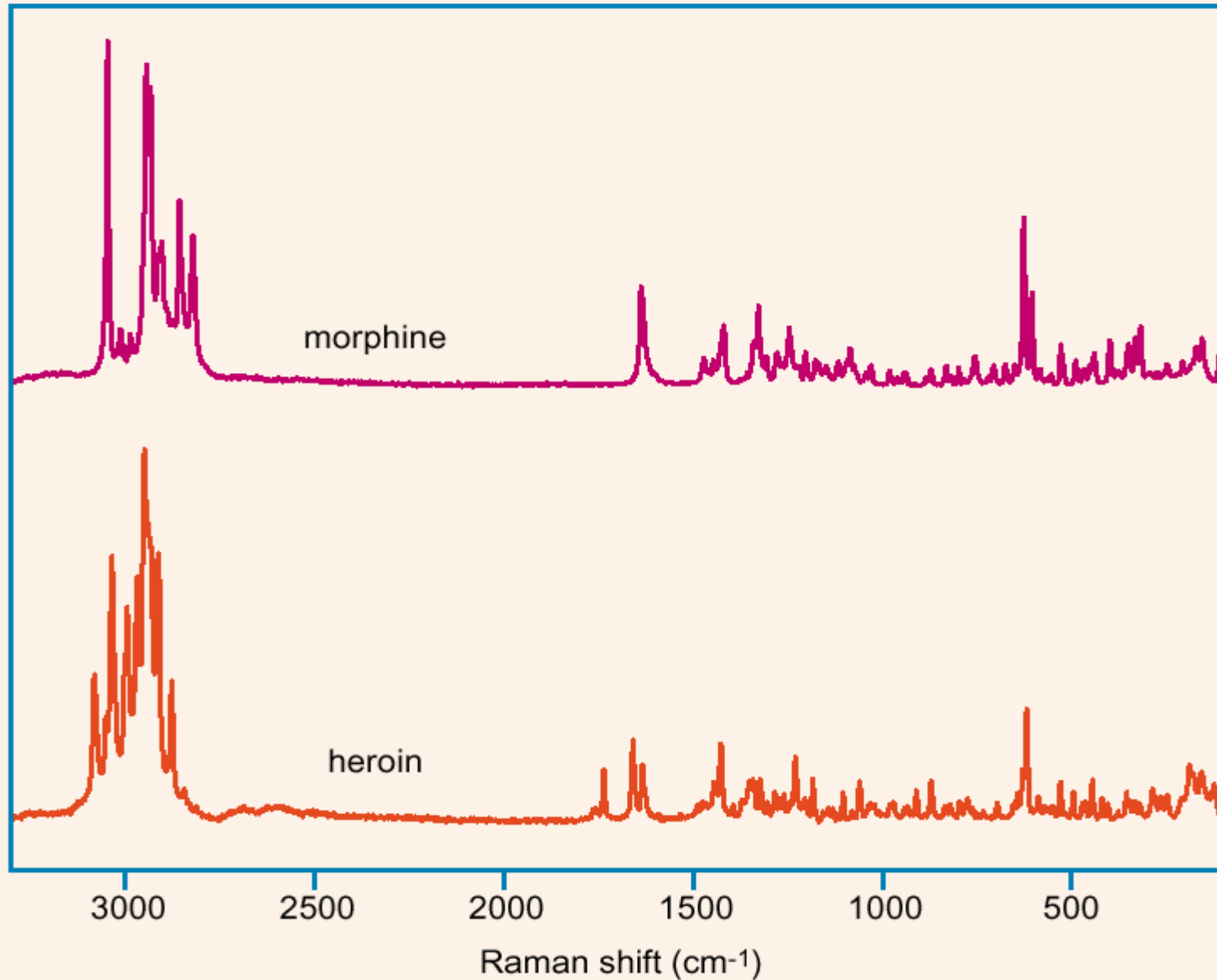
VZORKY

- **anorganické** - *korozní vrstvy*
 - povrchy pevných disků, křemík
 - amorfni uhlík, diamanty
- **organické** - *supramolekulární systémy*
 - systémy na nosičích
- **polymery** - *fotolabilní materiály*
- **biologické** - *in vitro, in vivo*
- **geologické** - *minerály, horniny*
- **archeologické** - *od paleolitu po novověk*

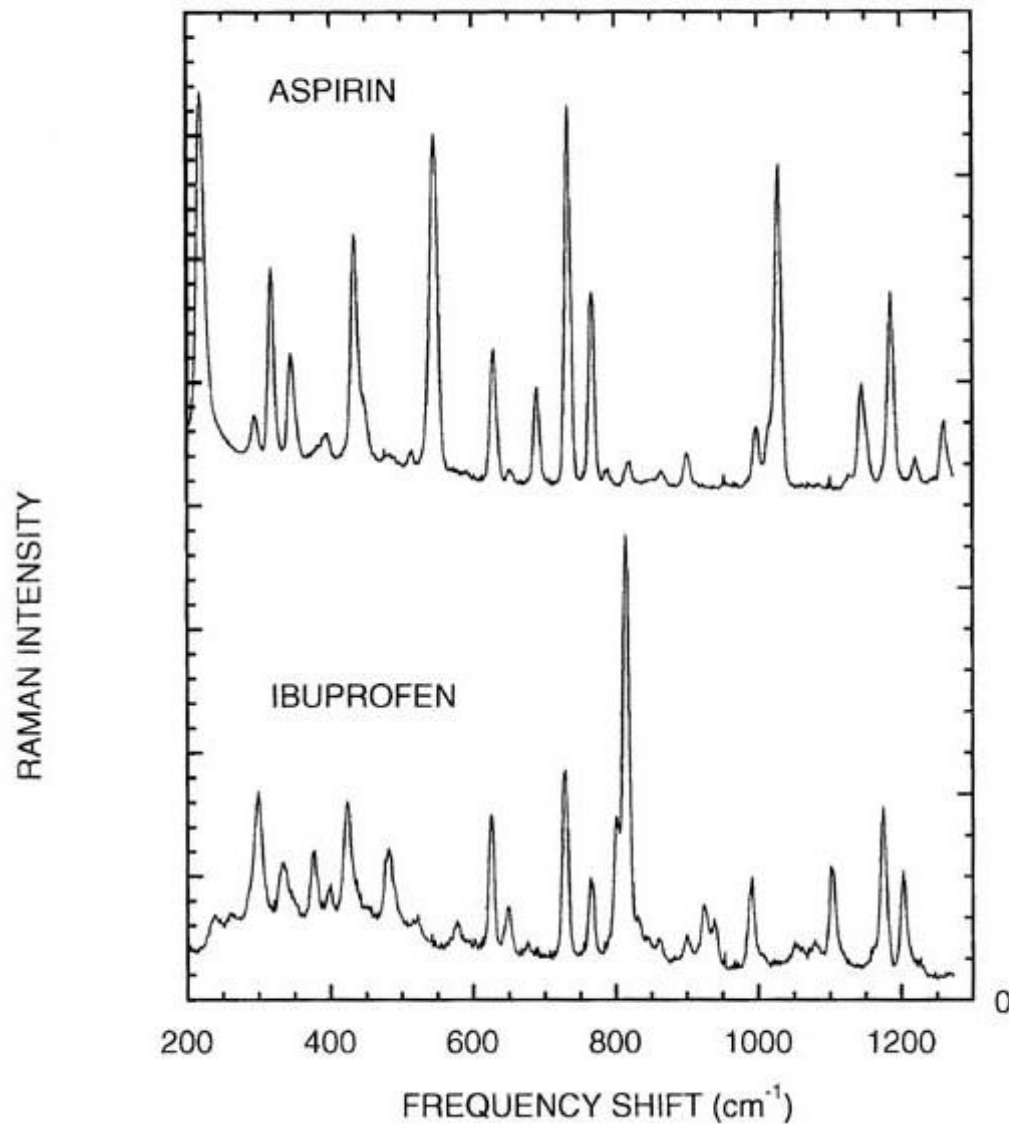
Identifikace padělků – umělé perly



Identifikace drog



Identifikace léčiv



FT Ramanova spektra tkání

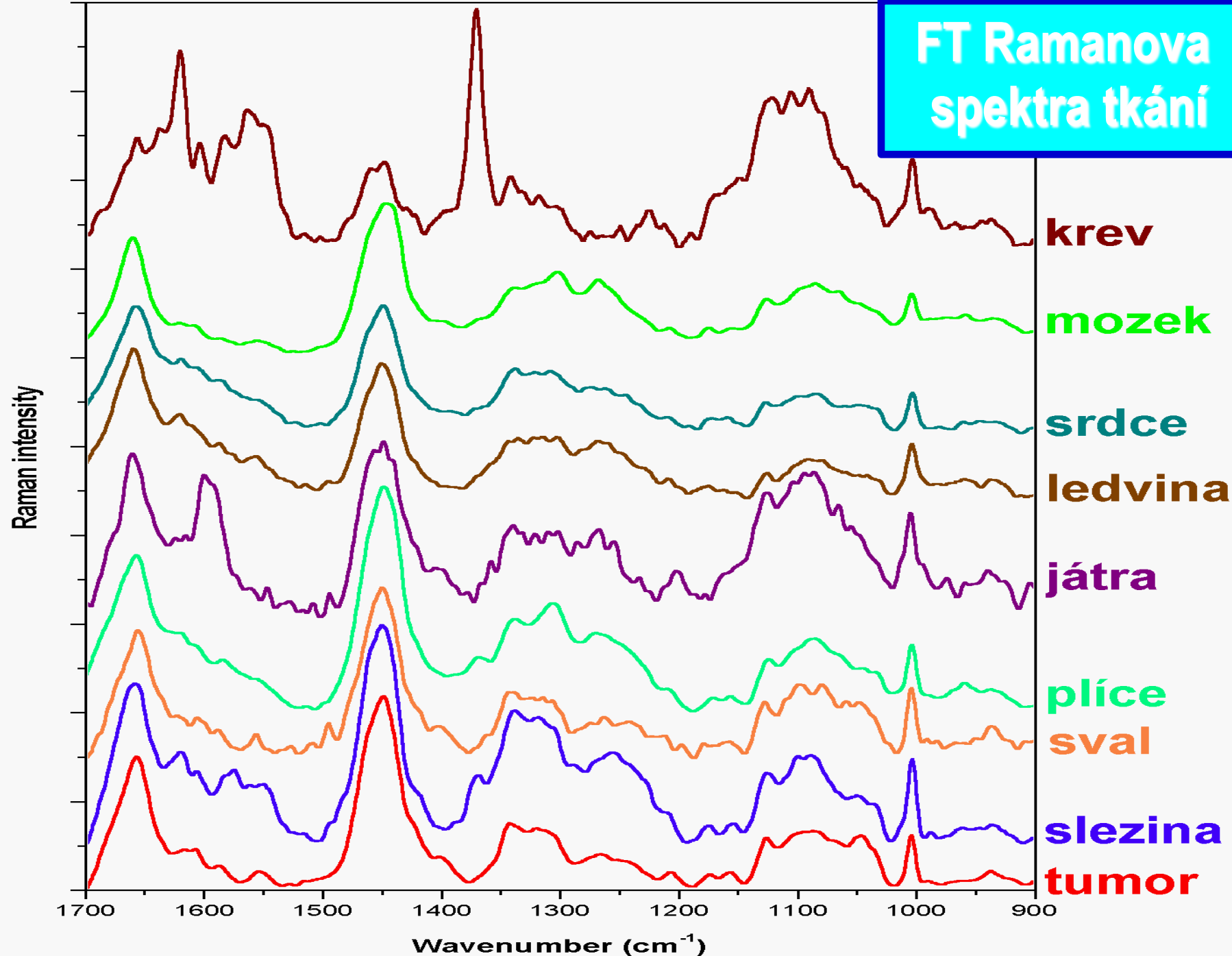
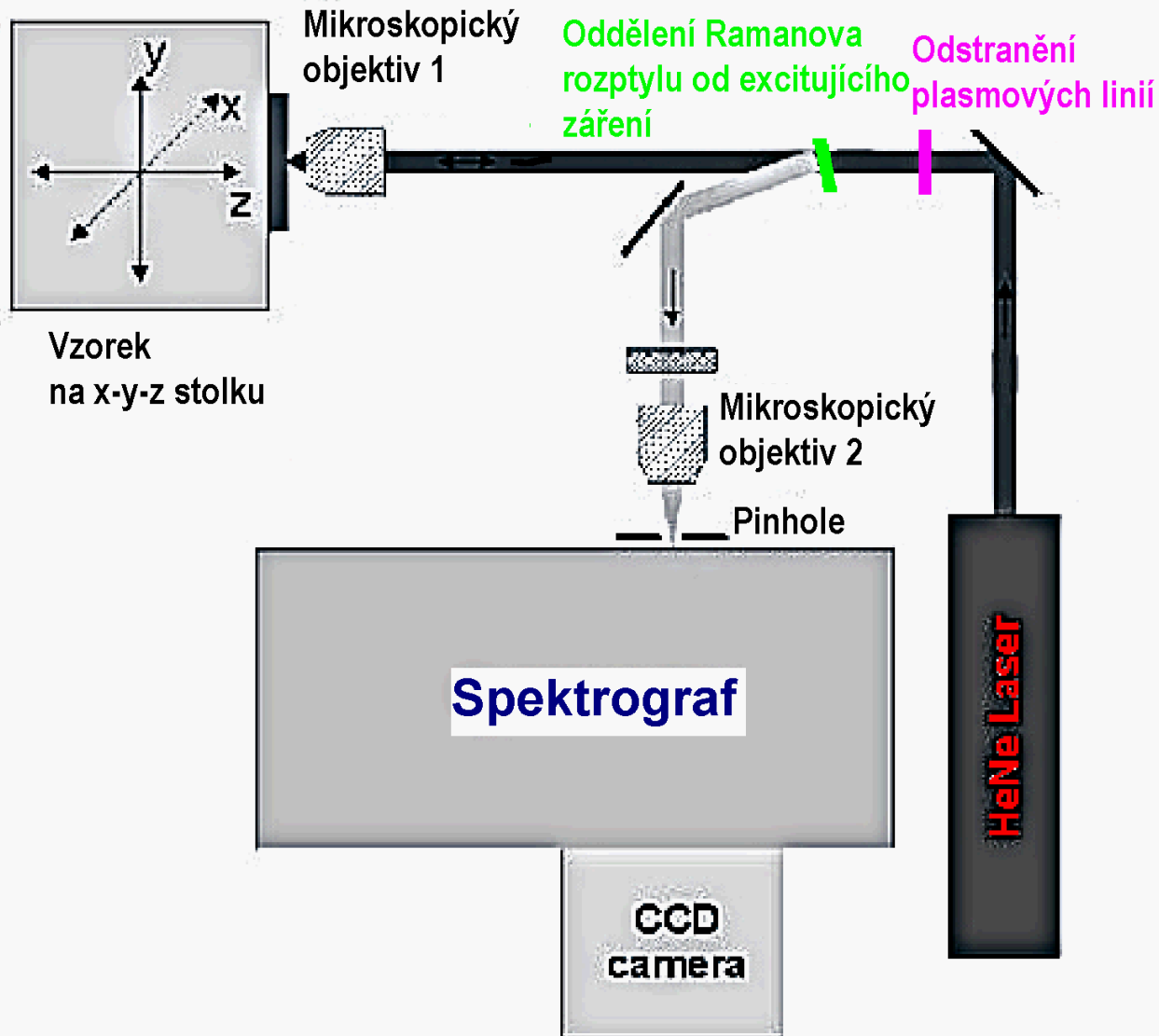
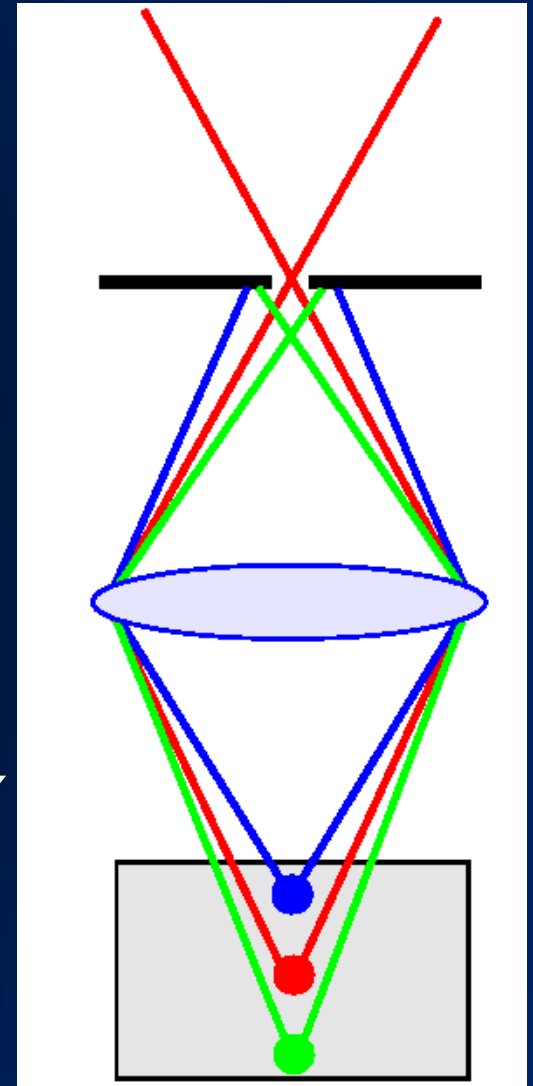


Schéma Ramanova mikroskopu

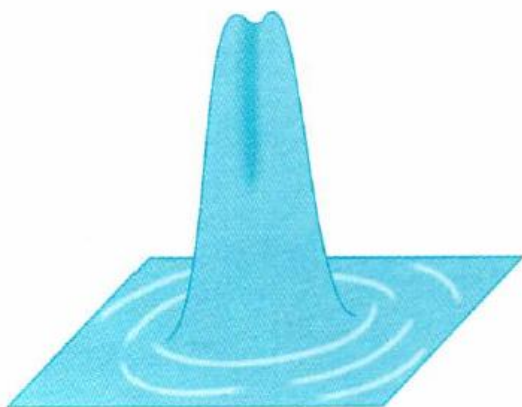
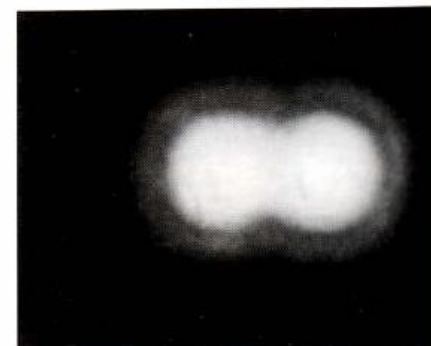


Ramanova mikrospektroskopie

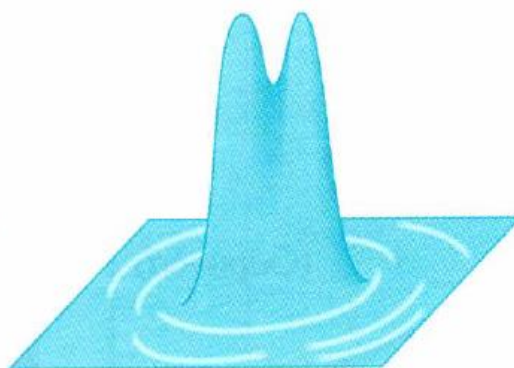
- **Dispersní**
 - viditelná excitace
 - možnost konfokálního režimu pro lepší prostorové rozlišení
- **FT Ramanova**
 - NIR excitace
 - horší prostorové rozlišení
 - menší riziko fotorozkladu a fluorescence



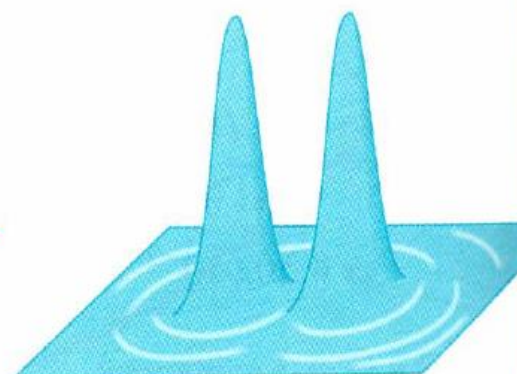
Difrakční limit rozlišovací schopnosti objektivu



(a)

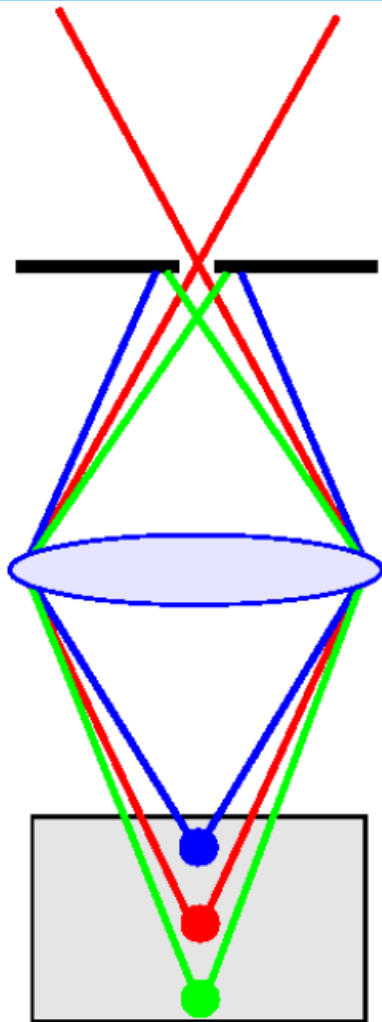


(b)

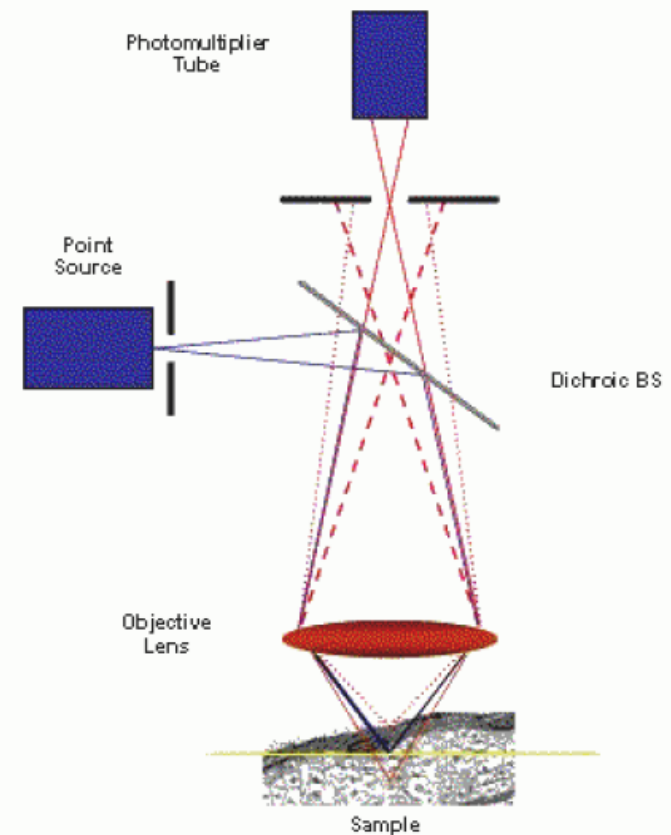


(c)

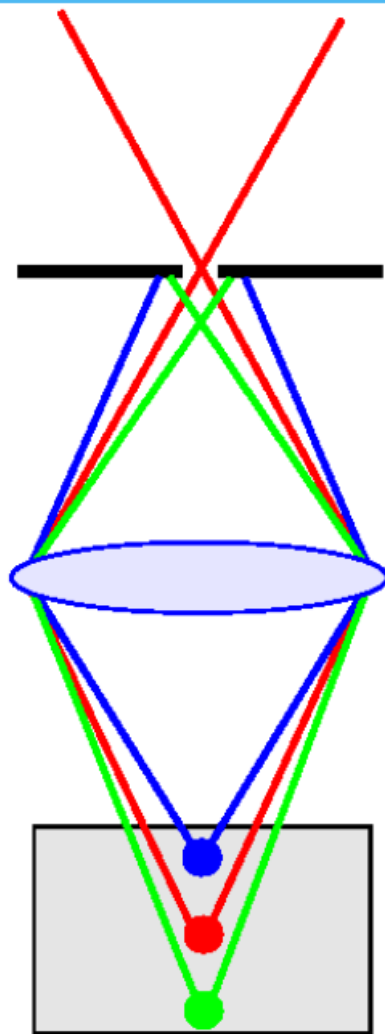
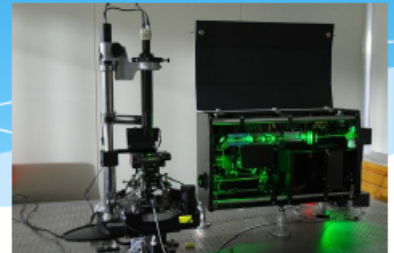
Optická konfokální mikroskopie a mikrospektroskopie



- * Konfokální clonka („pinhole“)
- * Vymezuje záření pocházející ze zaostřené plochy pod mikroskopem
- * Sekundární záření – odrazové, luminiscenční, rozptylové



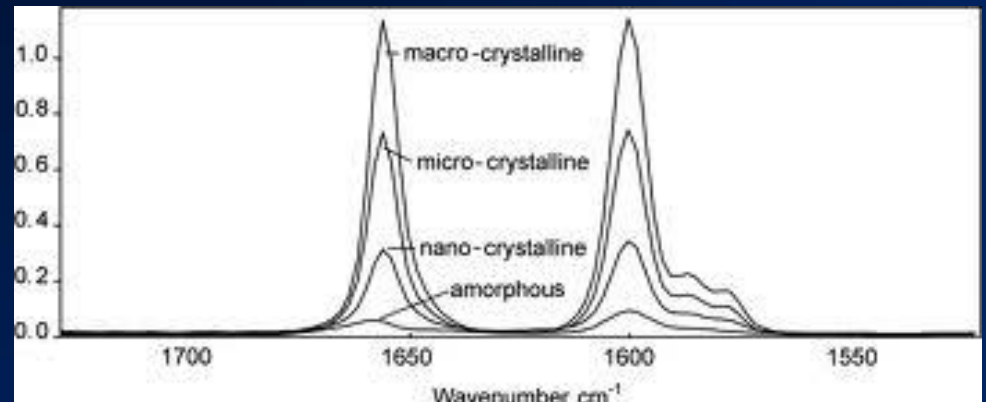
Optická konfokální mikroskopie a mikrospektroskopie



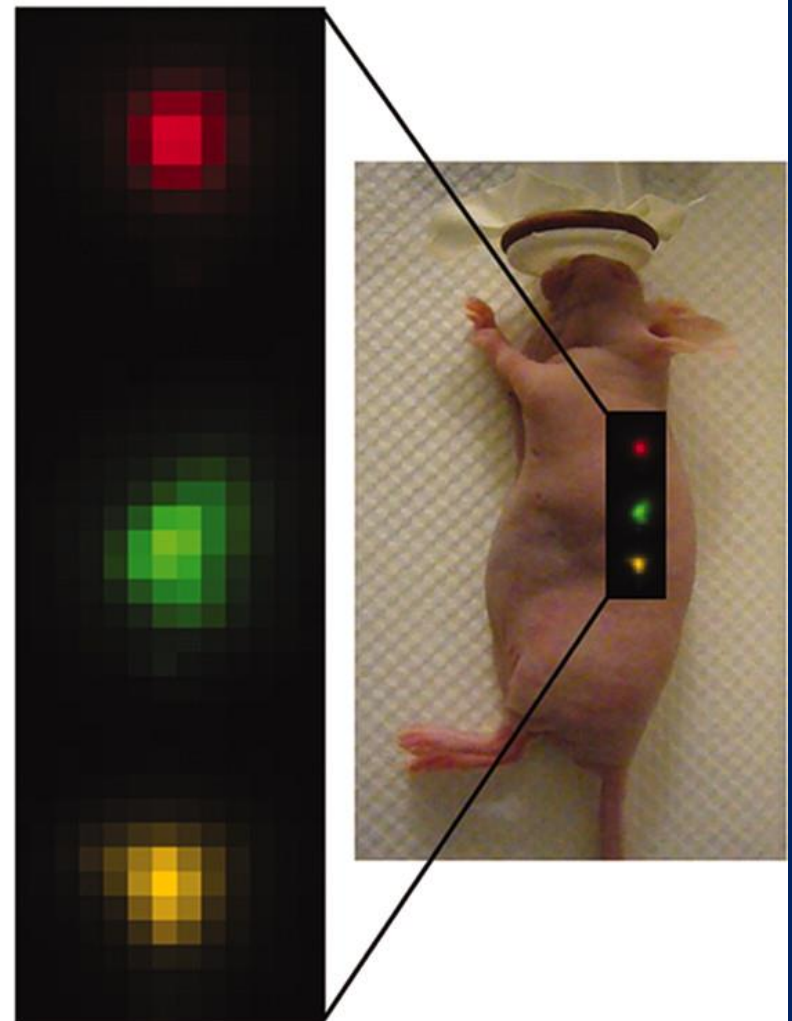
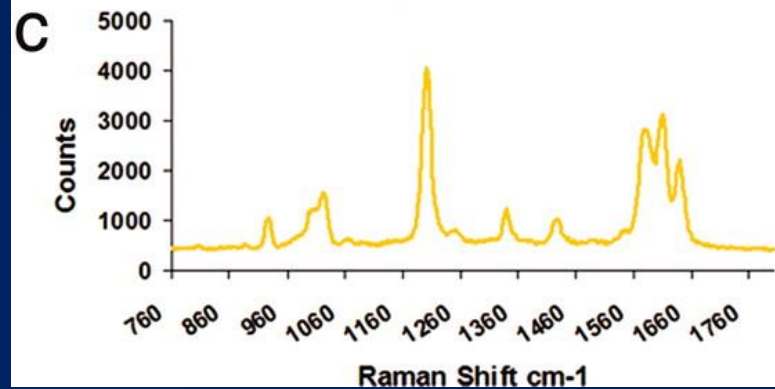
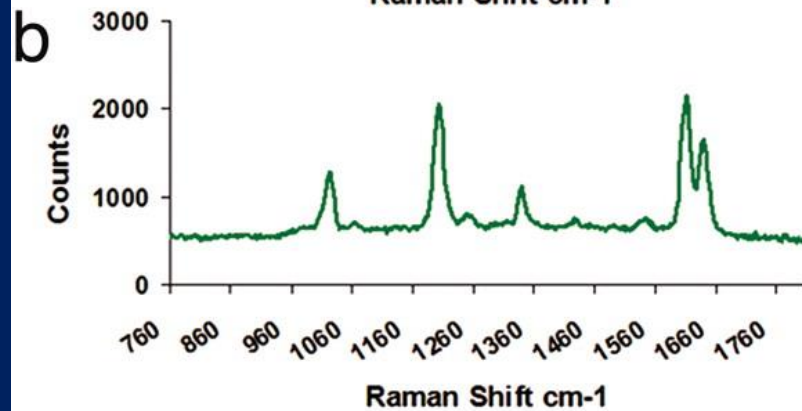
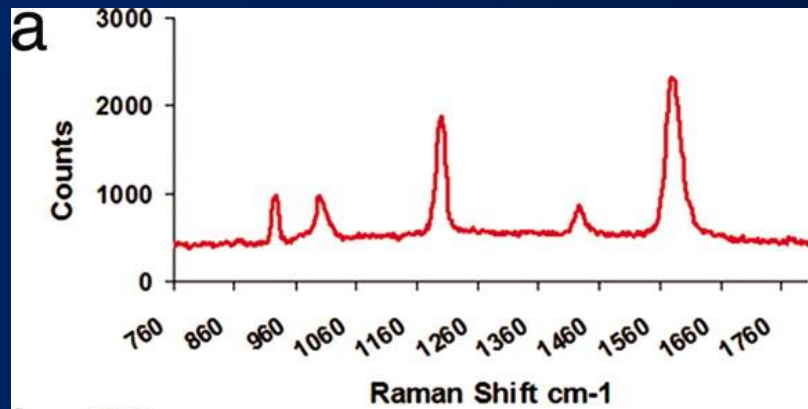
- * Možnost hloubkového proostřování
- * Sekundární záření vždy jen z ohniskové plochy
- * Kompromis průměru „pinhole“
 - menší průměr – lepší hloubkové rozlišení, nižší signál na detektoru
 - větší průměr – horší hloubkové rozlišení, vyšší signál na detektoru
- * V kombinaci s laterálním rozlišením (zobrazováním či mapováním) možnost konstrukce 3D obrazu

Aplikace Ramanovy spektroskopie ve farmacii

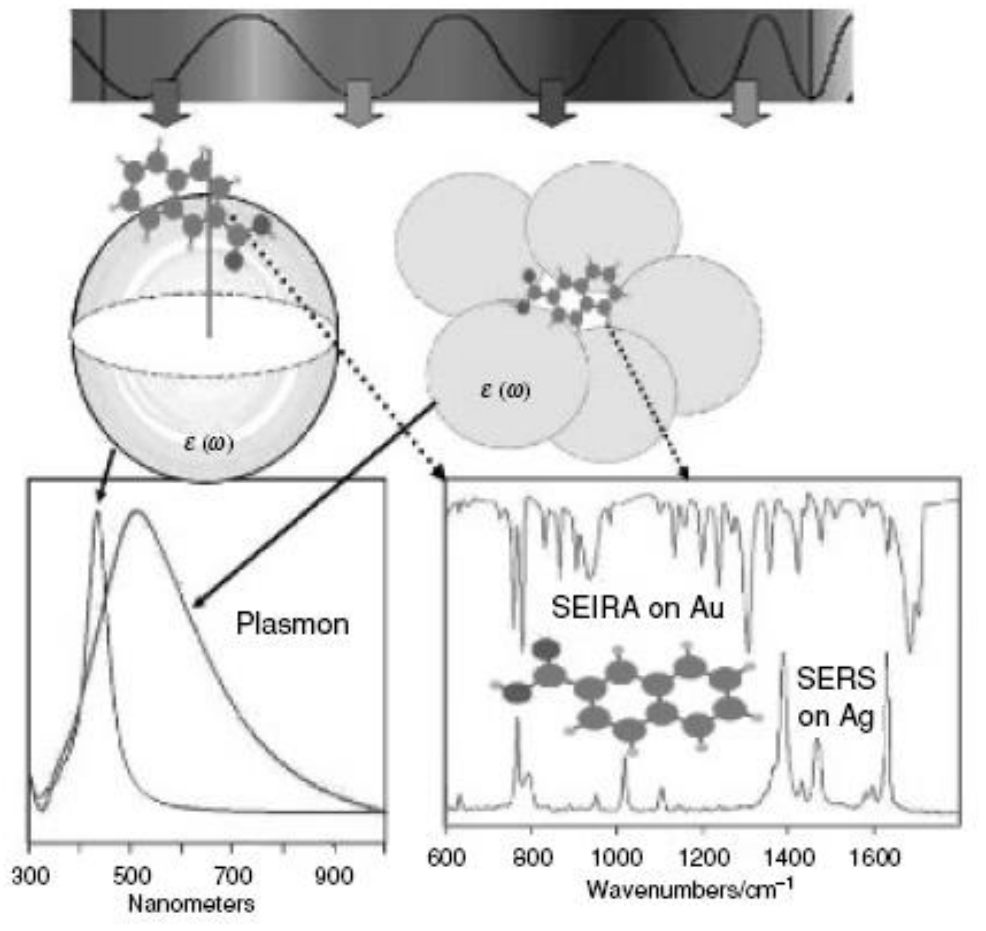
- Spektrální identifikace léčivých a pomocných látek – knihovny spekter
- Kvantitativní stanovení účinných látek
- Pomocný screening různých polymorfních forem
- Výstupní kvalitativní zkoušky v průmyslu



In vivo aplikace



Povrchem zesílený Ramanův rozptyl - SERS

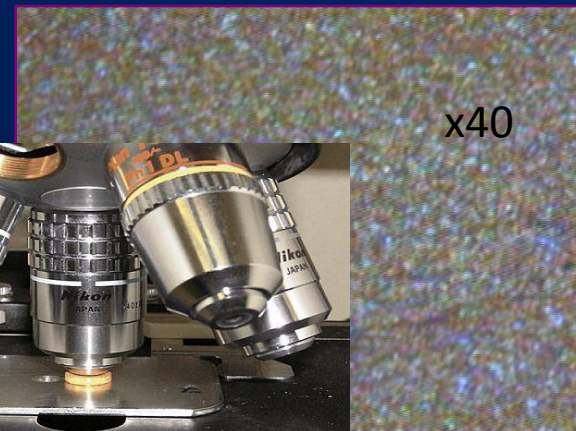
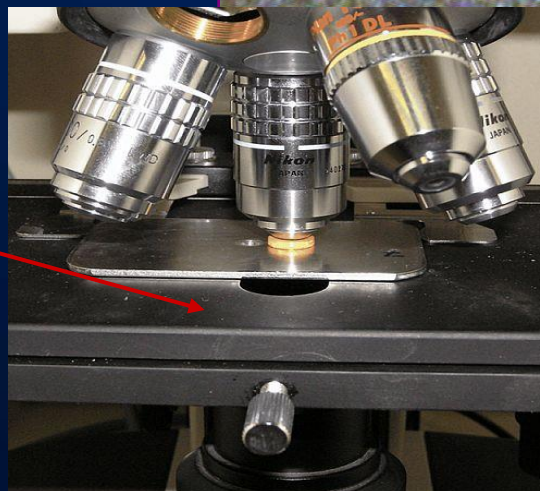


- povrchem zesílená vibrační spektroskopie (SEVS)
- vhodně připravený povrch kovu (Ag, Au, Cu)
- zesílení spektrálního signálu
- rezonanční excitace lokalisovaných povrchových plasmonů na nanostrukturovaném povrchu (jev povrchové plasmonové resonance)

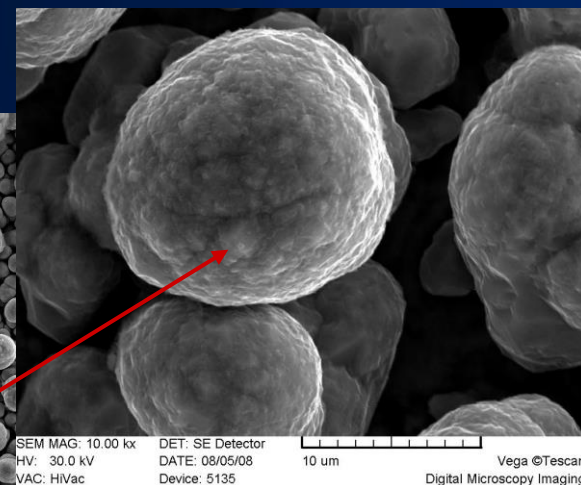
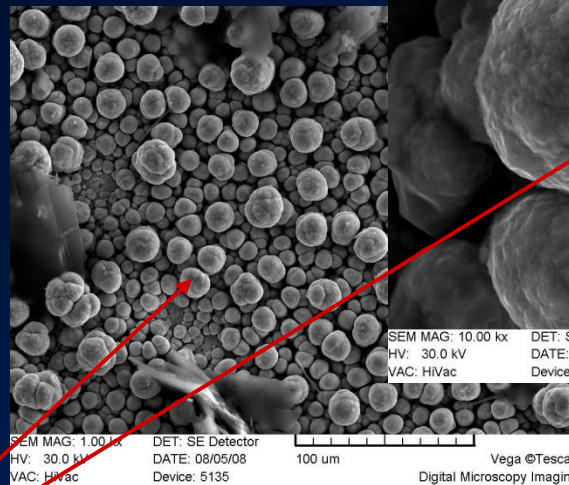
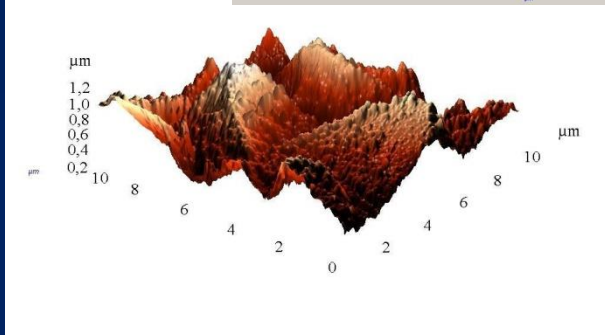
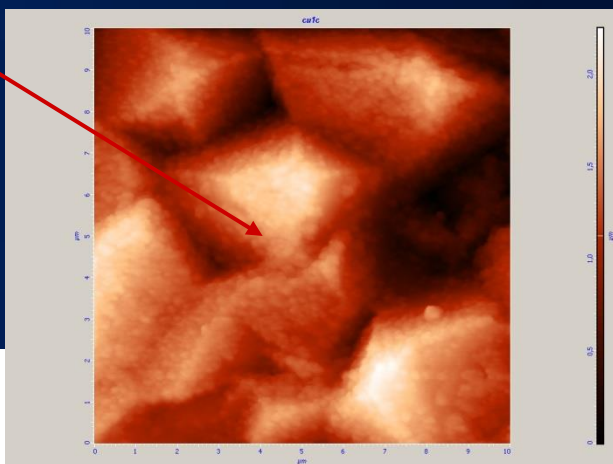
- indukované změny polarizovatelnosti adsorbovaných molekul
- sledování molekulových vibrací látek
- detekce malého množství látek – principiálně až jednotlivých molekul
- analýza ultratenkých organických filmů

Substráty s vhodnou morfologií povrchu

optická mikroskopie:
Nikon Optiphot II

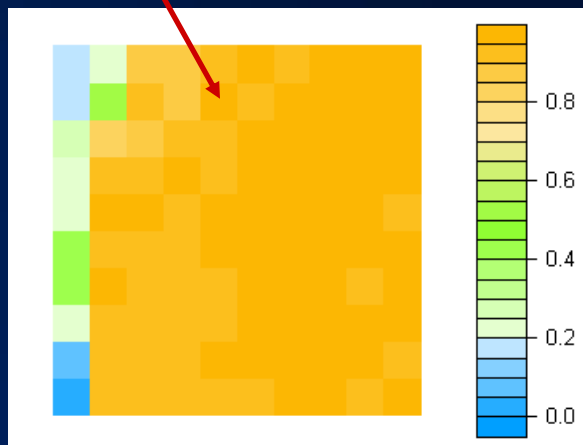
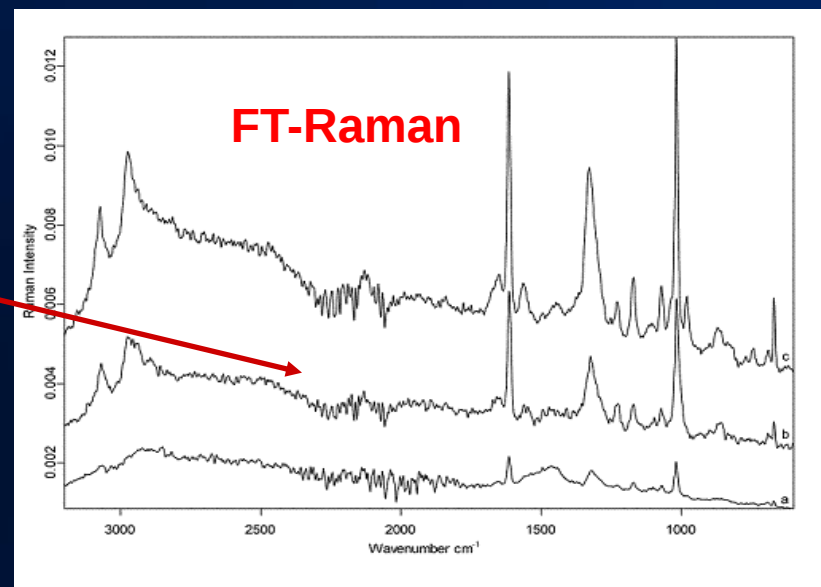
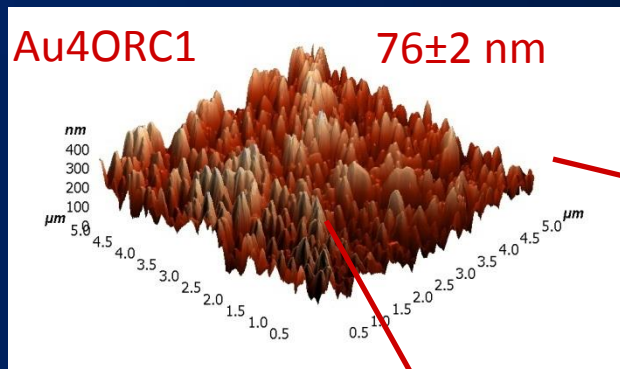


AFM snímky



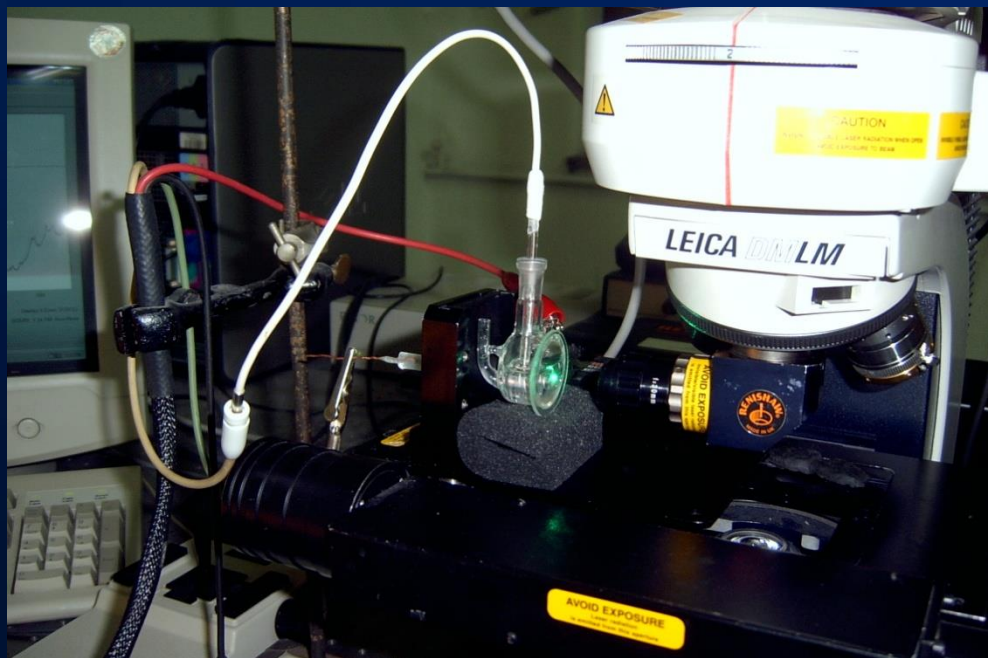
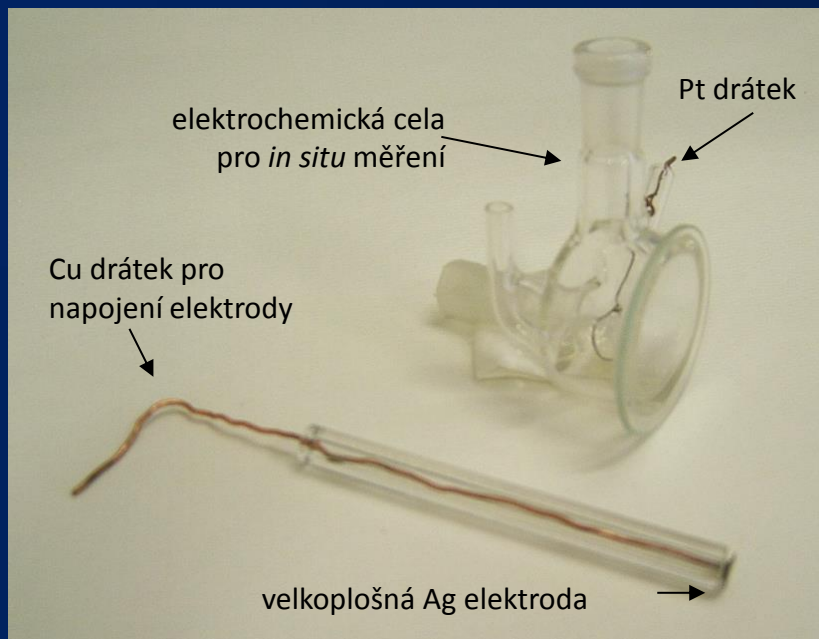
SEM snímky

Au substráty: nanostruktura a povrchové zesílení

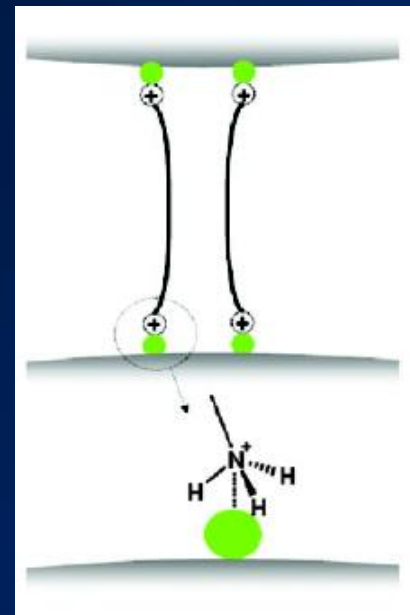


depoziční roztok: 10^{-5} mol/l

Aplikace SERS - nanokompozitní substráty – detekce látek



- kompozitní substrát: bifunkční činidlo jako linker spojující jednotlivé části
- velkoplošná Ag elektroda s vhodnou nanomorfologií + Ag koloidní nanočástice propojené molekulami diamminů
- chemicky řízené vytvoření SERS-aktivních systémů
- vznik kavit ve struktuře vytvořené samoskladné monovrstvy
- zachycení sledované látky a její detekce



Nanokompozitní substrát: detekce aldrinu - ALD

- nebezpečný organochlorový pesticid s karcinogenními, mutagenními imuno- a reprotoxickými účinky
- interaguje s plasmatickou membránou neuronových buněk
- velmi nízká afinita vůči kovovému povrchu
- spektrální detekce: pásy v oblasti otisku palce: 200 – 400 cm^{-1}

