

Műszeres analitika II.

(TKBE0532)

6. előadás

Egyéb molekulaszpektroszkópai módszerek:
turbidimetria, nefelometria, polarimetria,
refraktometria, lumineszcencia

Dr. András Melinda

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Egyéb molekulaszpektroszkópai módszerek

- **turbidimetria:** fényszórás
- **nefelometria:** fényszórás, a beeső fénnel szöget bezáró detektálás
- **plazmon rezonancia:** kolloidális méretű rendszerekben abszorbancia jellegű fényszórás mérése
- **fluoreszcencia:** a gerjesztéssel egyidejűleg lejátszódó emisszió detektálása
- **foszforeszcencia:** a gerjesztést követő emisszió detektálása
- **polarometria:** forgatóképesség mérése
- **refraktometria:** törésmutató mérése

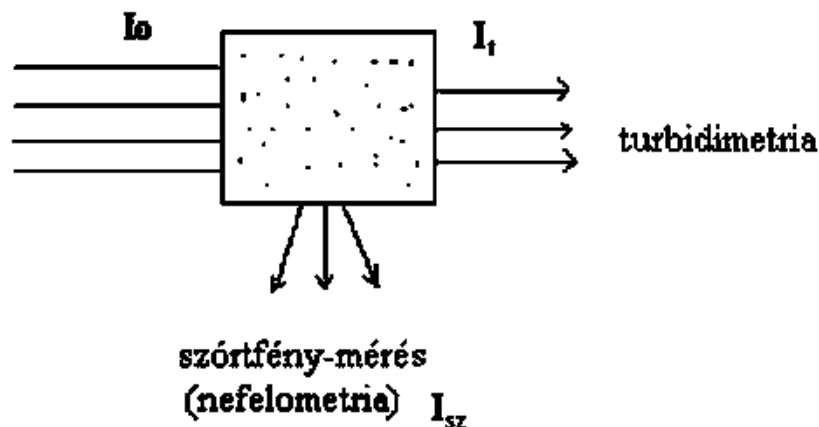
Turbidimetria, Nefelometria

Kolloid oldatok ($1 \text{ nm} < d < 1000 \text{ nm}$, d : részecskeméret) fényszórásának mérésén alapuló módszer.

Kolloid oldatban a fénysugár (I_0) egy része elnyelődik (I), a másik része szóródik (I_{sz}), míg a maradék (I_t) változatlanul halad tovább.

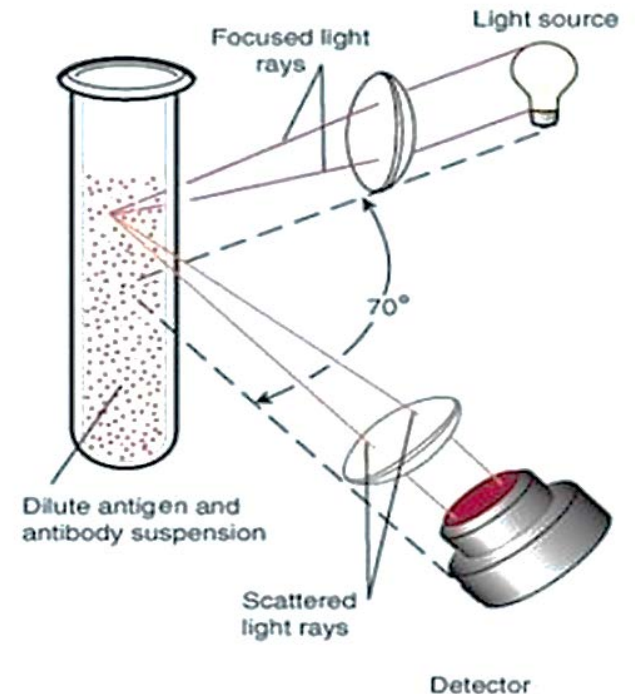
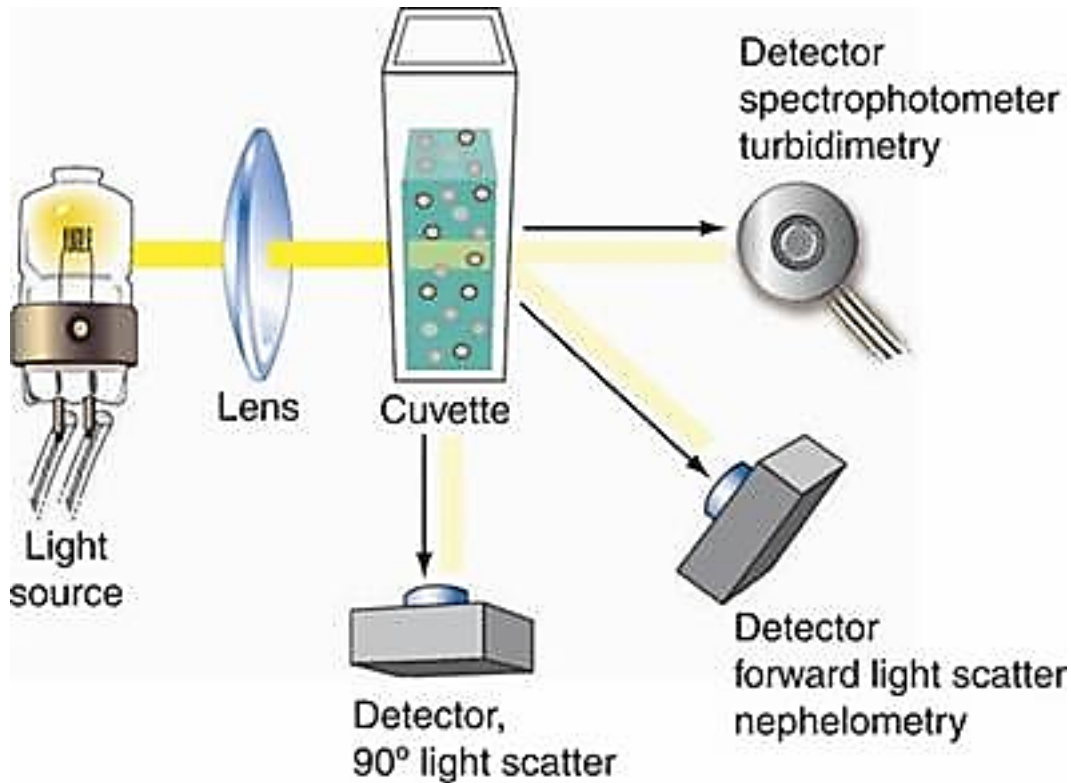
Turbidimetria: az oldat látszólagos abszorbanciáját (turbiditását), tehát az oldaton áthaladó fény intenzitását mérjük.

Nefelometria: az oldat által szórt fény intenzitását mérjük, beeső fényvel szöget bezáró ($70\text{-}75^\circ$, 90°) detektálás



Turbidimetria, Nefelometria

- Spektrofotométerrel azonos felépítésű készülék.
- Küvettában kolloid részecskék.
- Kvantitatív meghatározás: Lambert Beer törvény alapján.
A fényintenzitás csökkenés, illetve a szórt fény intenzitása a részecskék számával arányos.



Turbidimetria, Nefelometria

Turbidimetria alkalmazás:

- Ba^{2+} meghatározása $BaSO_4$ -ként
- fehérjék meghatározása testfolyadéokban (immunglobulinok, transferrin, komplement rendszer molekulái, akut fázis fehérjék)
- enzimaktivitás vizsgálata: amiláz bontja a kolloid méretű keményítőt
- élővizek, szennyvizek, üzemanyagok

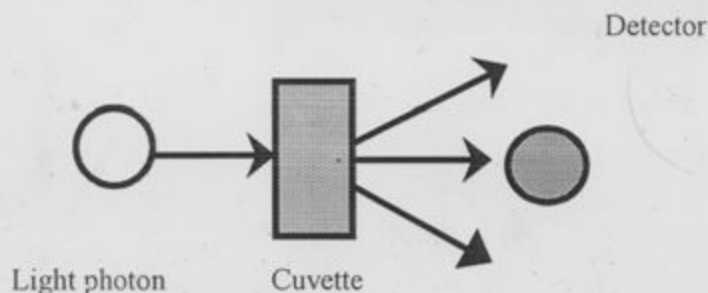
Nefelometria alkalmazás:

- rutin klinikai laboratóriumi diagnosztika (pl. szérum össz. IgE anafilaxia esetén)
- sejt- és baktériumtenyészetek növekedése
- levegő szennyezettsége (füst, köd)
- immunológia: antigén-antitest kölcsönhatás

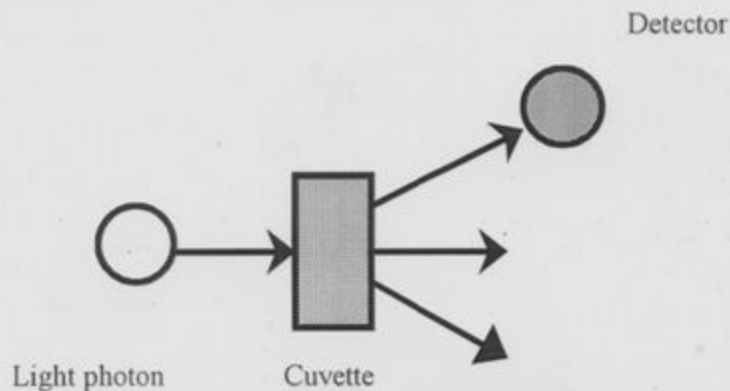
Turbidimetria és nefelometria

Mindkét módszer szolubilis fehérjék vizsgálatára alkalmas, napi rutinban elterjedt.

Vizsgálandó antigénre specifikus antitest és az antigén által létrehozott immunkomplex fényszórásán alapul mindkét módszer. Napi rutinban is alkalmazott vizsgálatok.



Turbidimetria: (érzékenység: 50 $\mu\text{g/ml}$) szérumban, liquorban nagy mennyiségben jelen lévő fehérjék vizsgálata. Fényintenzitás csökkenést mérjük.



Nefelometria: (érzékenység: 1 $\mu\text{g/ml}$) kis koncentrációjú szérum és liquor fehérjék, gyógyszer szintek mérése. A szórt fény intenzitását méri.

Lumineszcencia

A molekula valamilyen úton gerjesztett állapotba jut (a molekulában lévő elektronok közül néhány többletenergiára tesz szert), majd amikor elektron visszaugrik alacsonyabb energiájú állapotba, az energiafelesleg foton, vagyis fény formájában távozik.

Gerjesztés módja szerint:

- fotolumineszcencia: elektromágneses sugárzás (fény) hatására
- kemilumineszcencia: kémiai reakció eredményeként
- biolumineszcencia: biokémiai (főleg enzimatikus) reakció eredményeként



Kemilumineszcencia alkalmazásai

Vérnyomok kimutatása:

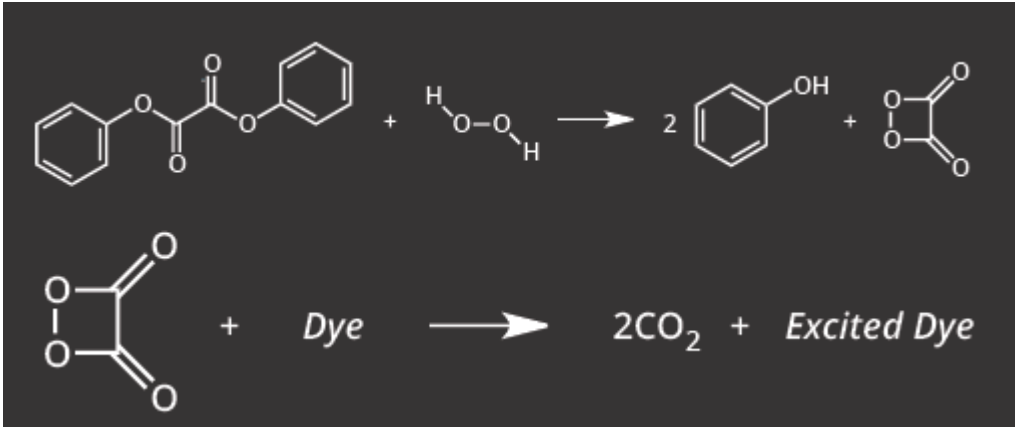
- 1928, H. O. Albrecht: a vér (vastartalmú hemoglobin) jelentős erősítő hatással van a luminol fénykibocsátására.
- helyszínen végrehajtható
- nem szükséges hozzá laboreszköz
- kis mennyiségben is kimutathatók a vérfoltok maradványai
- hemoglobin nem bomlik el a reakció közben, így a teszt akár többször is megismételhető



Kemilumineszcencia alkalmazásai

Fényrudak:

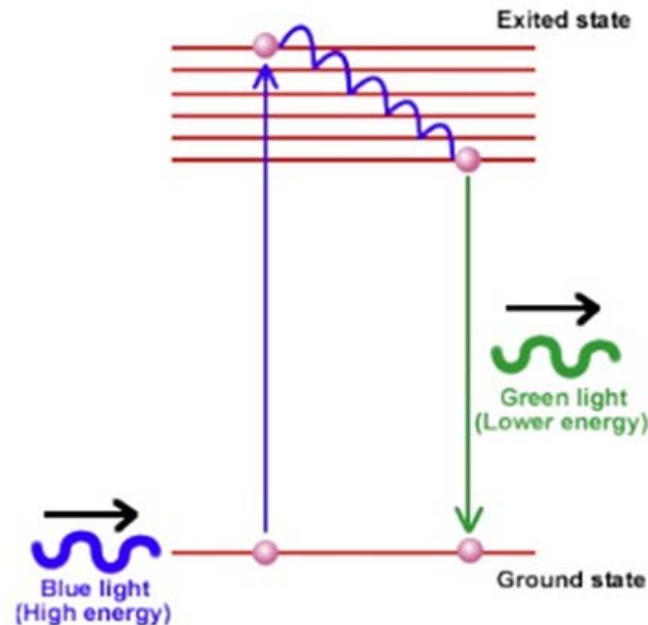
- A fénykibocsátás a szerves kemilumineszcens anyag és az oxidálószer (H₂O₂) közötti reakcióban történik.
- Vészvilágítás, víz alatti világítás.



RED	ORANGE	YELLOW	GREEN	BLUE
RHODAMINE B	5,12-BIS(PHENYLETHYNYL)NAPHTHACENE	RUBRENE	9,10-BIS(PHENYLETHYNYL)ANTHRACENE	9,10-DIPHENYLANTHRACENE

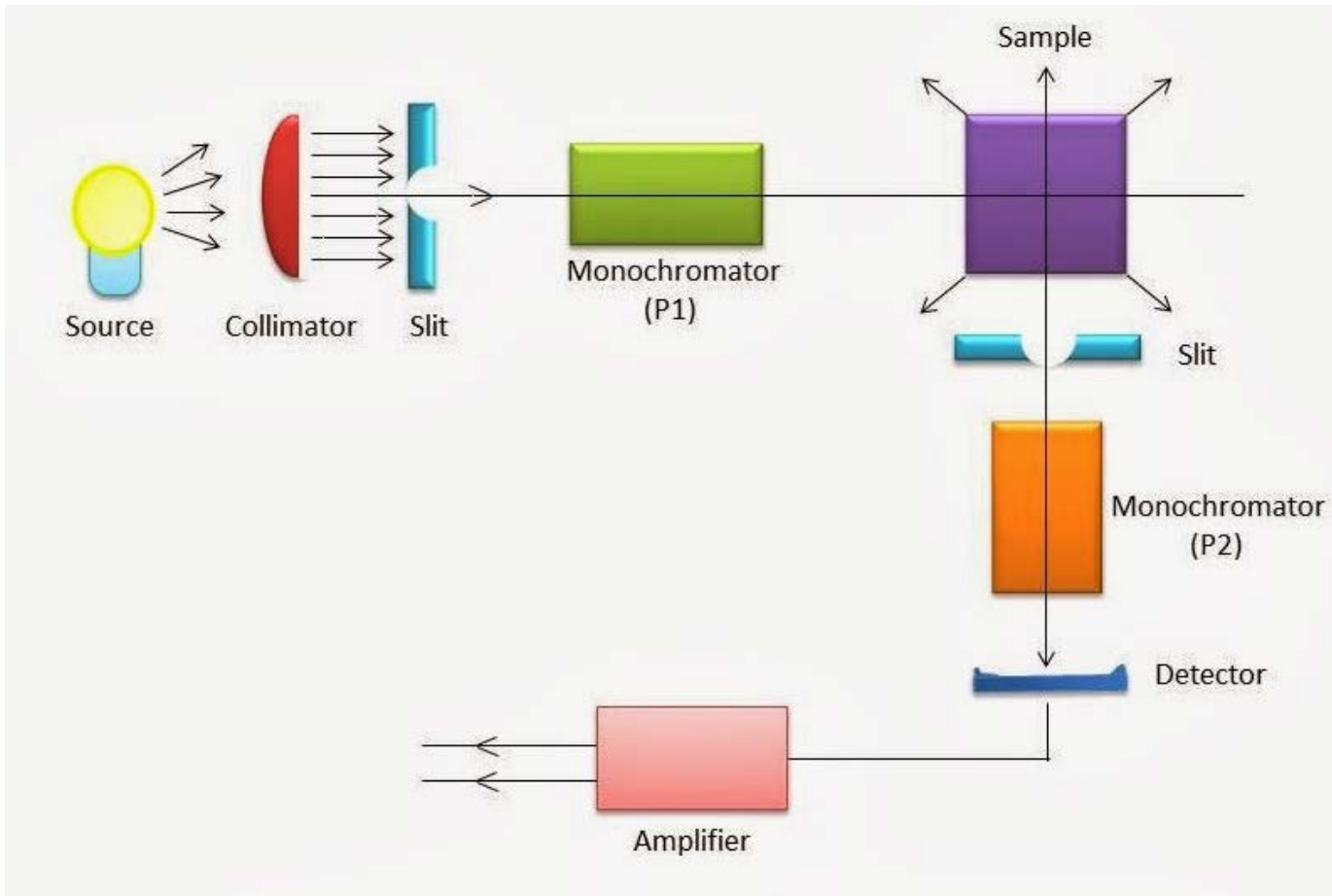
Fotolumineszcencia

- Fény általi gerjesztést követő sugárzással (fényemisszióval) járó relaxációk.
- A kibocsátott fény kisebb energiájú, vagyis nagyobb hullámhosszúságú lesz, mint a gerjesztő fény ($\lambda_{\text{megvilágított}} < \lambda_{\text{kibocsátott}}$).
- fluoreszcencia: gyors belső átrendeződést követően
- foszforeszcencia: lassú belső átrendeződést követően



Spektrofluorimetria

Szerkezeti felépítése a spektrofotométerhez, és nefelométerhez hasonló (a fényforrás és a detektor merőleges egymásra), itt a szórt fény helyett a relaxáció során a (alapállapotba való visszatérés) kibocsátott fény intenzitását detektáljuk.



Készülék vázlatos felépítése

- Fluoreszcencia és foszforeszcencia kis koncentrációk esetén az alábbi összefüggéssel írható le:

$$I_f = I_0 \cdot \theta \cdot \varepsilon \cdot c \cdot l$$

I_0 : a belépő fény intenzitása

ε : moláris abszorbancia

l : a minta rétegvastagsága (úthossz)

c : koncentráció

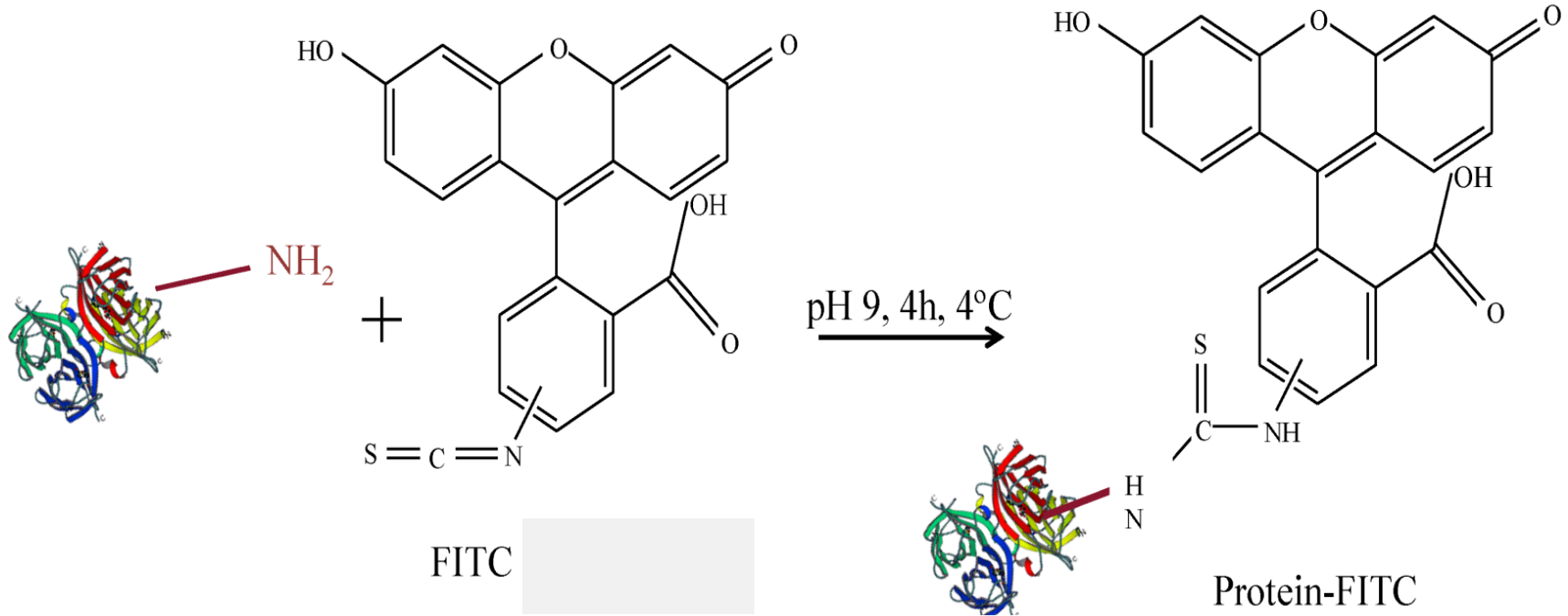
θ : kvantumhatásfok; emittált és elnyelt fotonok hányadosa

- Általában érzékenyebb és szelektívebb, mint az abszorpciós módszer.

Fluoreszcencia analitikai alkalmazásai

Fluorofór: az az egysége a molekulának, mely fényemisszóra képes. Tipikusan konjugált elektronokat tartalmazó rész (pl: heteroaromás, poliaromás rendszerek).

Egész molekula is lehet fluorofór (fluoreszcein-izotiocianát (FITC), melyet nem fluoreszkáló molekulához (pl. fehérjéhez) kapcsolnak. (Jelölés)



Fehérje molekula jelölése FITC alkalmazásával

Fluoreszcencia analitikai alkalmazásai

Alkalmazási terület:

Sejtbiológia, biokémia, molekuláris biológia, immunológia:

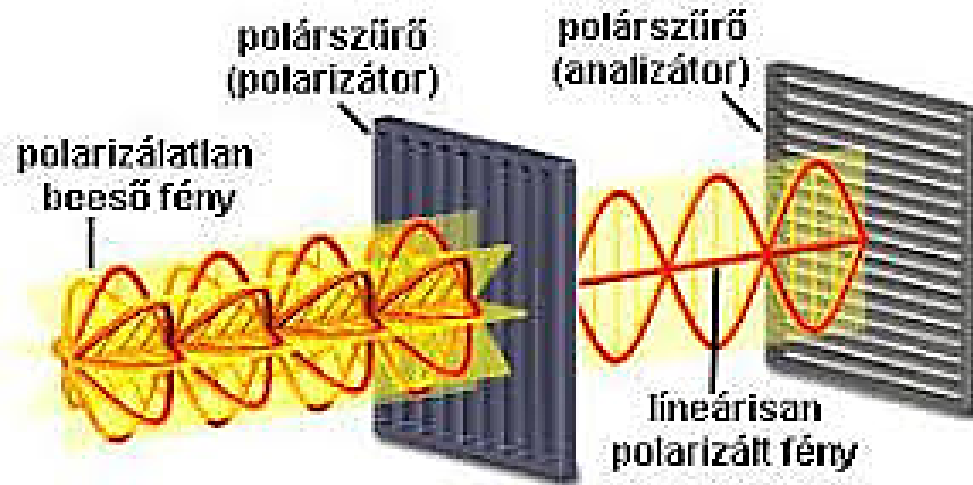
- Áramlási citometriában jelölt sejtek nyomonkövetése.
- Biológiailag aktív molekulák (pl: antitestek is) jelölése lehetővé teszi specifikus fehérjék vagy sejten belül struktúrák vizsgálatát.
- DNS analízis

LIF:

- Lézer indukált fluoreszcens (LIF) detektorok nagy műszeres eljárásokban (HPLC, CE).
- Érzékenyebb detektálást tesz lehetővé, mint az UV spektrofotometriás detektorok.

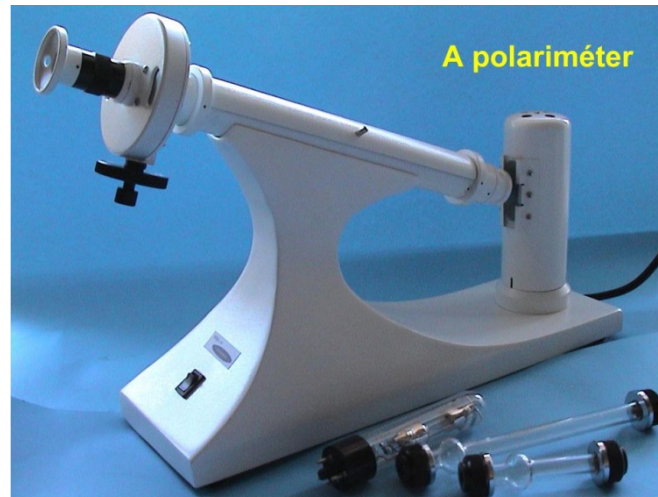
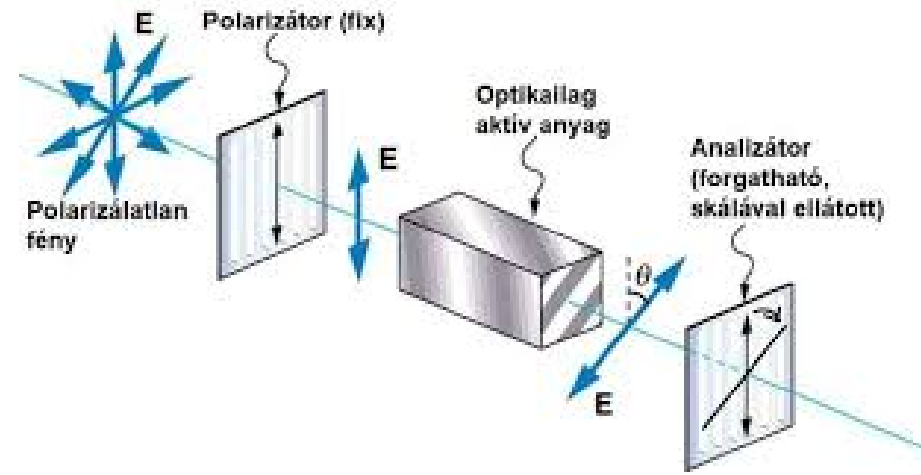
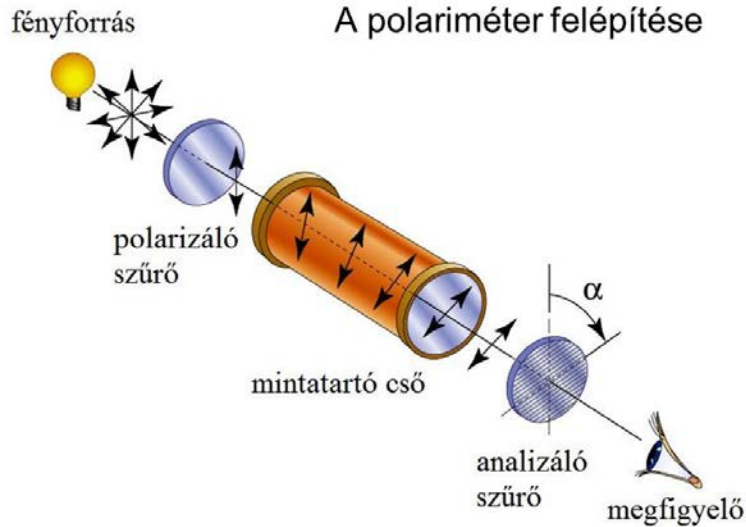
Polarimetria

A monokromatikus fény rezgései a haladási irányra merőleges minden lehetséges síkban történnek. Ilyen fénysugarat polarizátoron (Nicol prizma) átbocsájtva egyetlen síkban rezgő sugár haladhat keresztül.



Polarimetria

- Polarizált fényt optikailag aktív (királis molekulák) elforgatják.
- Optikai forgatóképesség mérése adott hullámhosszon.



Optikai forgatóképesség függ a fény hullámhosszától (λ) és a hőmérséklettől (T).

A forgatás szöge (α) arányos a fény által az anyagban megtett úthosszal (l), oldatoknál arányos a koncentrációval (c).

$$\alpha = \alpha_{\lambda T} \cdot c \cdot l$$

$\alpha_{\lambda T}$ az optikailag aktív anyag fajlagos forgatóképessége adott hullámhosszon és hőmérsékleten

Általában $\lambda = 589 \text{ nm}$ (nátrium D vonala), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Alkalmazási terület:

- Cukoripar: szacharóz meghatározás
- Élelmiszer-, gyógyszeripar: keményítő, szteroidok, vitaminok, aminosavak, antibiotikumok vizsgálata

Refraktometria

Amikor a fénysugár eltérő sűrűségű anyagok határán átlép, iránya megváltozik = fénytörés.

Törésmutató mérése:

Az átlátszó anyagok törésmutatója refraktométerrel meghatározható. Az *abszolút törésmutató* (n , *refraktív index*, R_I) a fény terjedési sebességét jellemzi az adott közegben:

$$n = \frac{c}{v}$$

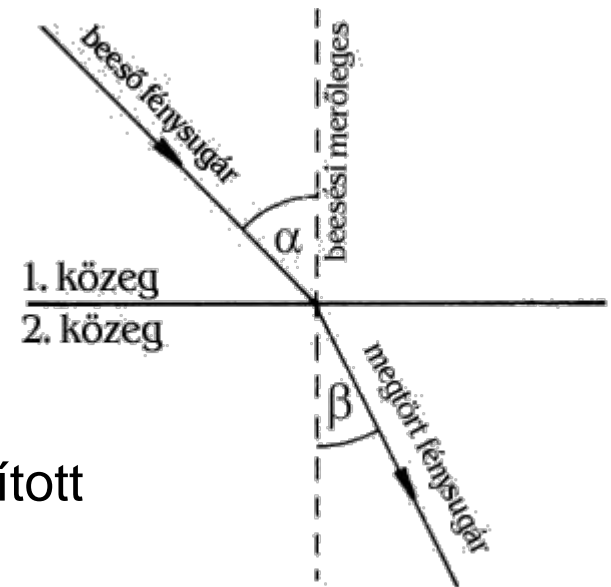
c : fénysebesség vákuumban

v : fény sebessége az adott közegben

(n mindig 1-nél nagyobb!)

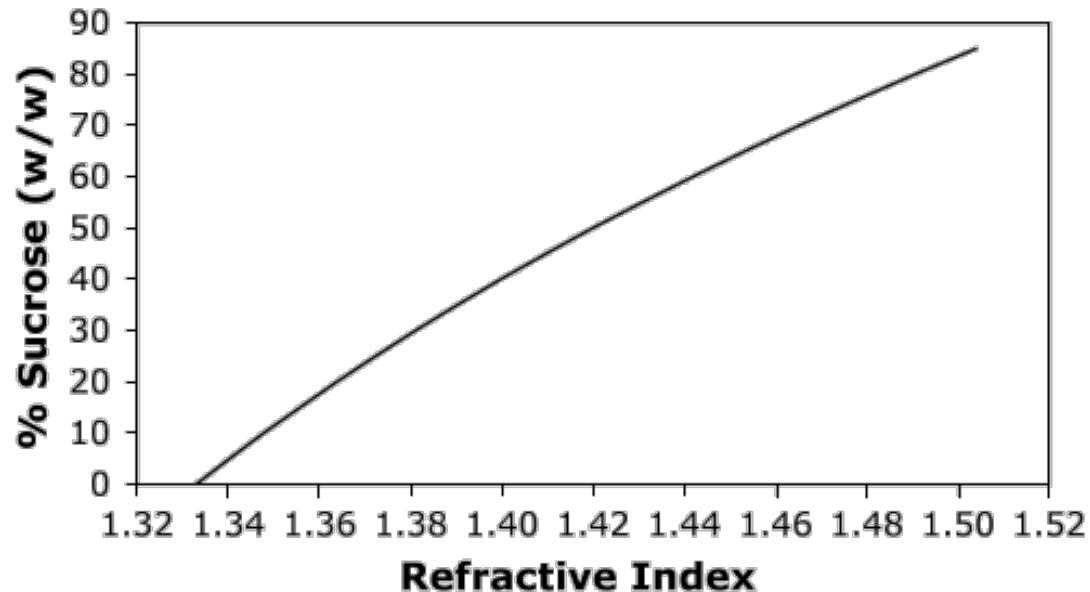
Relatív törésmutató: két közeg egymáshoz viszonyított törésmutatója:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin\alpha}{\sin\beta}$$



Refraktometria, mennyiségi leírás

A törésmutató függ a fény hullámhosszától (λ) és a hőmérséklettől (T).
Általában $\lambda = 589$ nm, ami a nátrium ún. D-vonala és $T = 20$ vagy 25 °C.
A törésmutató (n) arányos az oldat koncentrációjával (c).



Refraktometria gyakorlata

Azonosítás:} a minta törésmutatójának

Tisztaság ellenőrzése:} összehasonlítása ismert n értékekkel

Oldott anyag koncentrációjának meghatározása
kalibrációs görbék segítségével.



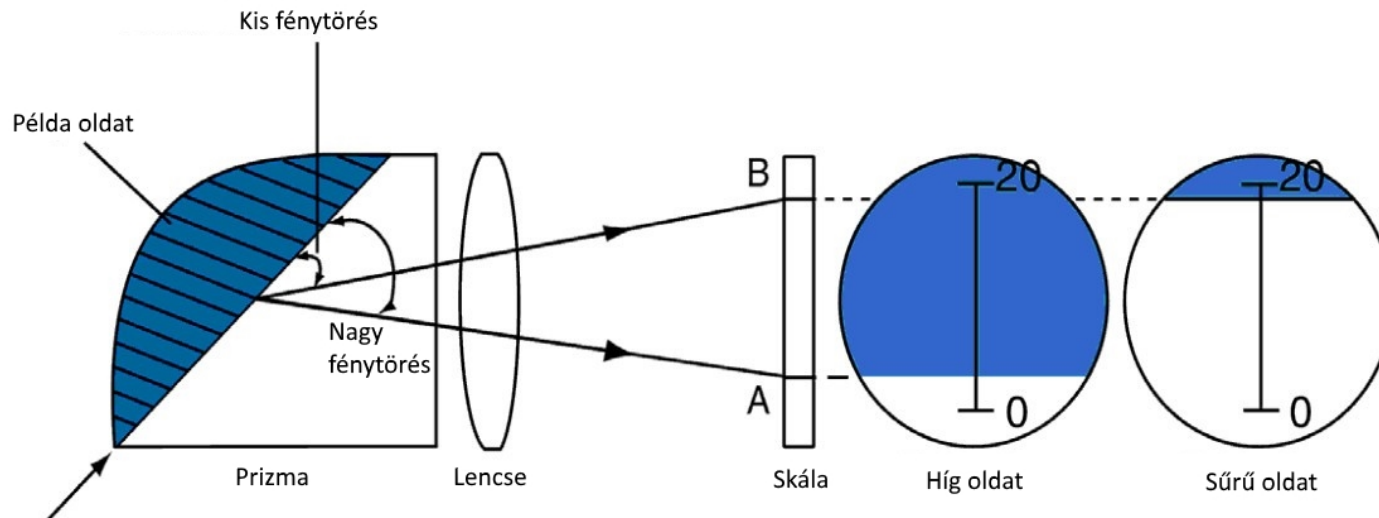
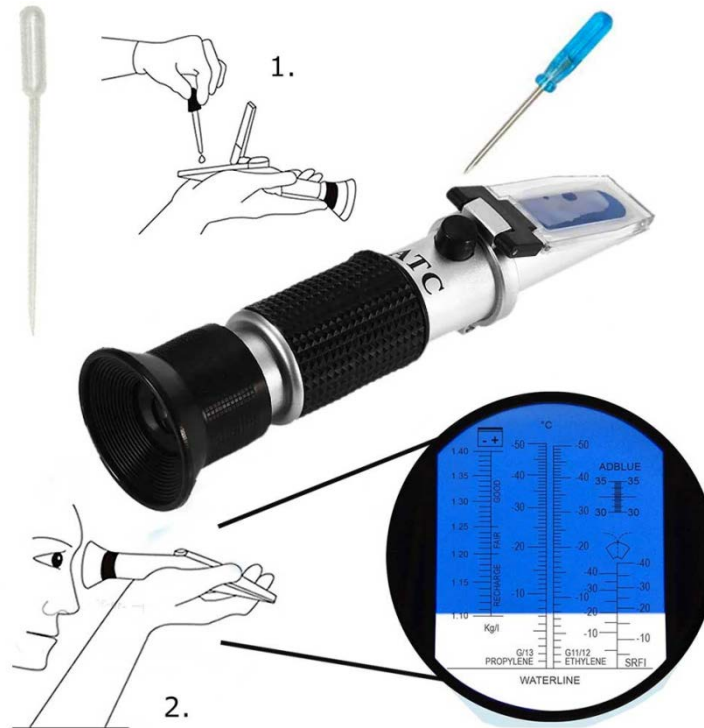
Abbé-refraktométer



Kézi refraktométer

anyag	n
vákuum	1
Gázok 0°C-on és légköri nyomáson	
levegő	1,000293
hélium	1,000036
hidrogén	1,000132
szén-dioxid	1,00045
folyadékok 20 °C-on	
víz	1,333
etanol	1,36
olívaolaj	1,47
szilárd anyagok	
jég	1,309
műanyagok	1,45-1,65
üvegek	1,45-1,7
gyémánt	2,42

Refraktometria gyakorlata



Refraktometria alkalmazásai

- főleg oldatok, de használják üveg vagy drágakövek, akár diszperz rendszerek vizsgálatára is
- olajok, zsírok, gyanták összetétele, tisztasága
- méhészet: méz víztartalma
- bor-, sörkészítés: fermentáció során a maradék cukor- és előállított alkoholtartalom
- tengerbiológia: sótartalom
- állatorvoslás: vér, vizelet összetétele

Műszeres analitika II. (TKBE0532)

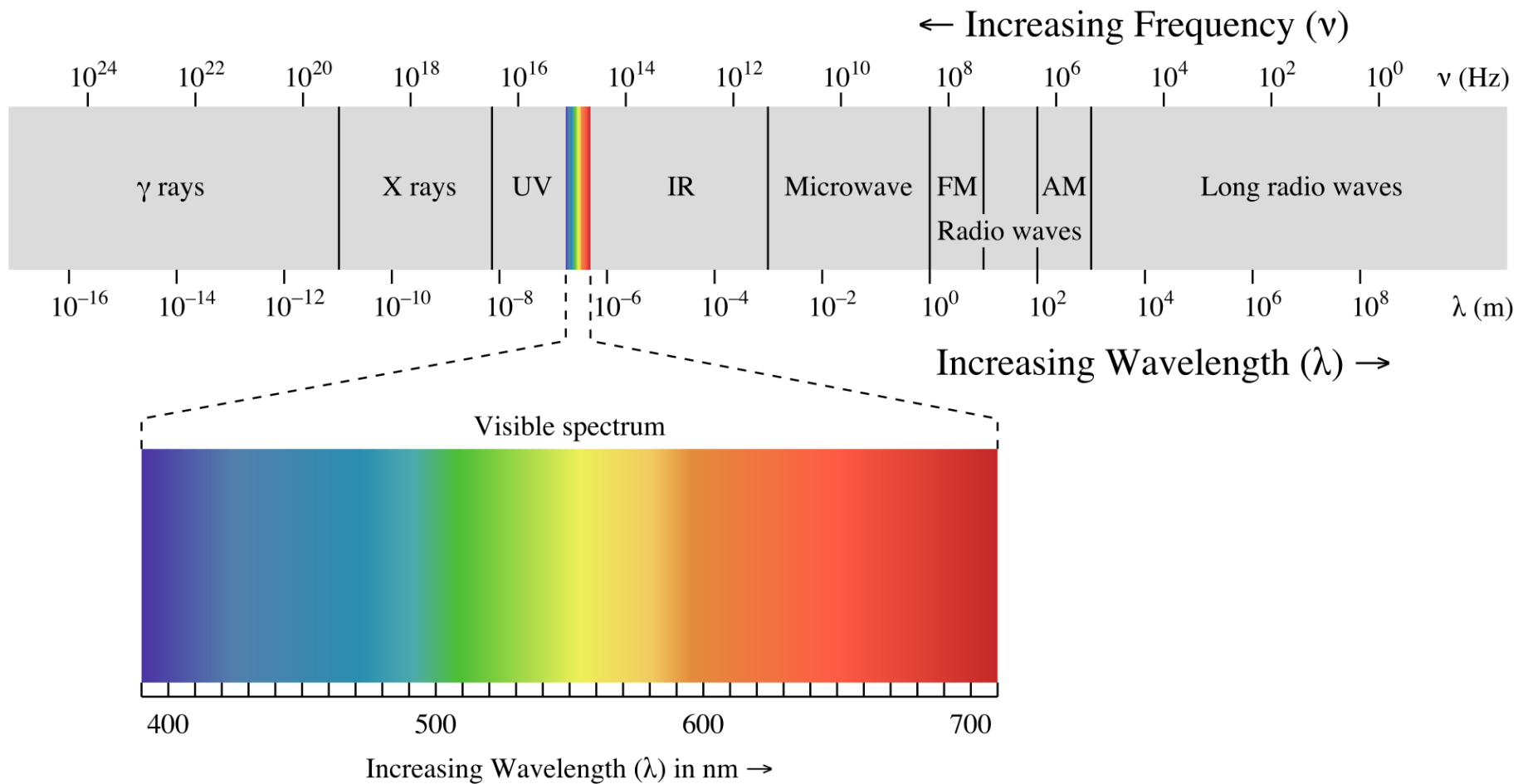
6. előadás Infravörös spektroszkópia

Dr. Andrási Melinda

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék



Elektromágneses sugárzások típusai



- Minél nagyobb a frekvencia annál nagyobb az energia.
- Minél nagyobb a hullámhossz annál kisebb az energia.

Optikai módszerek

Hullámhossz-tartomány		Sugárzás és anyag kölcsönhatása	Analitikai módszer
Gamma	$0,5 - 10 \text{ pm}$	Magátmenetek	Mössbauer-spektroszkópia
Röntgen (X-ray)	$0,01 - 10 \text{ nm}$	Belső elektronátmenetek (ionizáció)	Röntgenspektroszkópia
Távoli ultraibolya (FUV)	$10 - 180 \text{ nm}$	Vegyértékelektronok gerjesztése	Spektrofotometria
Ultraibolya (UV)	$180 - 350 \text{ nm}$		
Látható (VIS)	$350 - 780 \text{ nm}$		
Közeli infravörös (NIR)	$780 - 1000 \text{ nm}$	Rezgési és forgási átmenetek	IR-spektroszkópia
Infravörös (IR)	$1 - 30 \text{ }\mu\text{m}$		
Távoli infravörös (FIR)	$30 - 300 \text{ }\mu\text{m}$	Forgási átmenetek	
Mikrohullámok	$0,3 \text{ mm} - 1 \text{ m}$	Forgási átmenetek, elektronspin átmenetek	Mikrohullámú spektroszkópia
Rádióhullámok	$1 - 300 \text{ m}$	Magspin átmenetek	NMR

Infravörös spektroszkópia (IR)

Az UV-VIS fénynél kisebb energiájú, nagyobb hullámhosszúságú infravörös fény elnyelése a molekula forgási és rezgési energiáját növeli meg.

$$E = E_{\text{el.}} + E_{\text{vib.}} + E_{\text{rot.}}$$

UV-VIS IR

IR aktív rezgéseknél a molekula dipólus momentuma változik, ez feltétel, hogy jelet adjon spektrumban (azonos atomokból felépülő 2 atomos molekulának nincs IR spektruma).

Egyedi kötések → egyedi kötési állandóval jellemezhetők → adott energiájú fotonnal gerjeszthetők → minden molekulának jellegzetes elnyelése (spektruma) van.

Rezgések típusai:

- **Vegyérték rezgés:** kötés mentén a kötéstávolság változása.
- **Deformációs rezgés:** a kötésszög változásával jár.
- **Csatolt rezgés:** hasonló energiájú rezgések hatnak egymásra.

IR spektrum

Tartomány: $10 - 12800 \text{ cm}^{-1}$ (ill. $780 - 10^6 \text{ nm}$)

közeli (fényhez) IR: $4000 - 12800 \text{ cm}^{-1}$

közép vagy analitikai IR: $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$

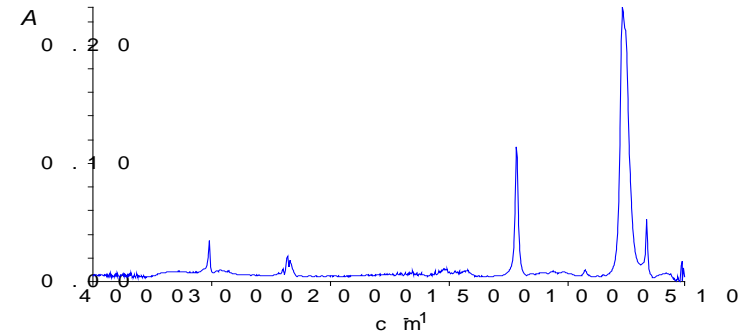
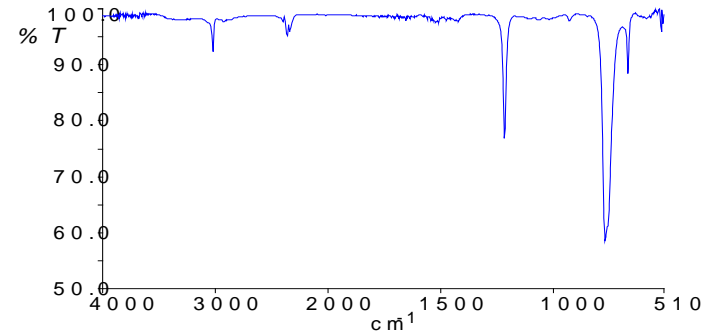
távoli IR: $10 - 400 \text{ cm}^{-1}$

IR spektrum:

x = hullámszám ($\bar{\nu}$)

y = transzmittancia (T)

y = abszorbancia (A)



IR sugárzás abszorpciójára is érvényes a Lambert-Beer törvény.

IR karakterisztikus kötési és csoportfrekvenciák

A kötésekre jellemző frekvencia (ν) a kötés ún. erőállandójától (k) és a kötést létesítő atomok redukált tömegétől (m) függ.

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{m}}$$

Ha az erőállandó nagy, azaz erős a kötés

→ kétszeres kötések: C=C, C=O, C=N stb.

→ háromszoros kötések: C≡C, C≡N

vagy az egyik alkotó atom tömege sokkal nagyobb ($m_1 \gg m_2$), mint a másik (C–H, O–H, N–H, S–H stb.)

akkor az adott kötés rezgési frekvenciáját csak kis mértékben befolyásolja a molekula egyéb része.

→ ha az adott kötések/csoportok előfordulnak a molekulában, akkor jellegzetes elnyelési sávok figyelhetők meg.

IR karakterisztikus kötési és csoportfrekvenciák

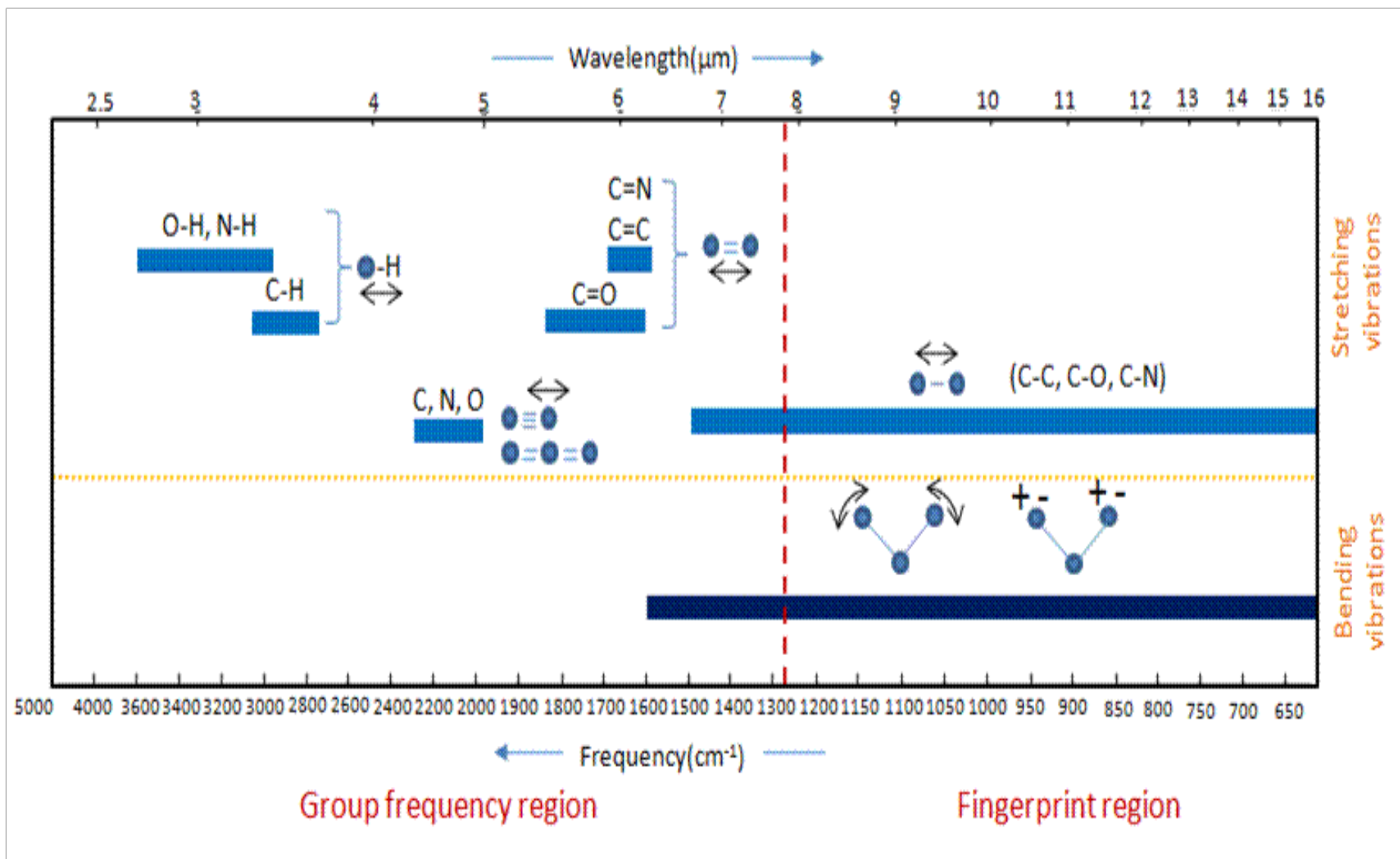
Bizonyos atomcsoportokhoz és kötésmódokhoz jellemző kötésfrekvenciák tartoznak, ezeket karakterisztikus sávoknak nevezzük (kötésmódtól függ, de nem teljesen független a molekula többi részétől).

Jellemző kötésfrekvenciák:

Két fő tartomány:

- **1600-400 cm^{-1} : ujjlenyomat tartomány, C-C, C-N, C-O**
vegyértékrezgés
- **4000-1600 cm^{-1} : funkciós csoport tartomány**

IR karakterisztikus kötési és csoportfrekvenciák



IR alkalmazása

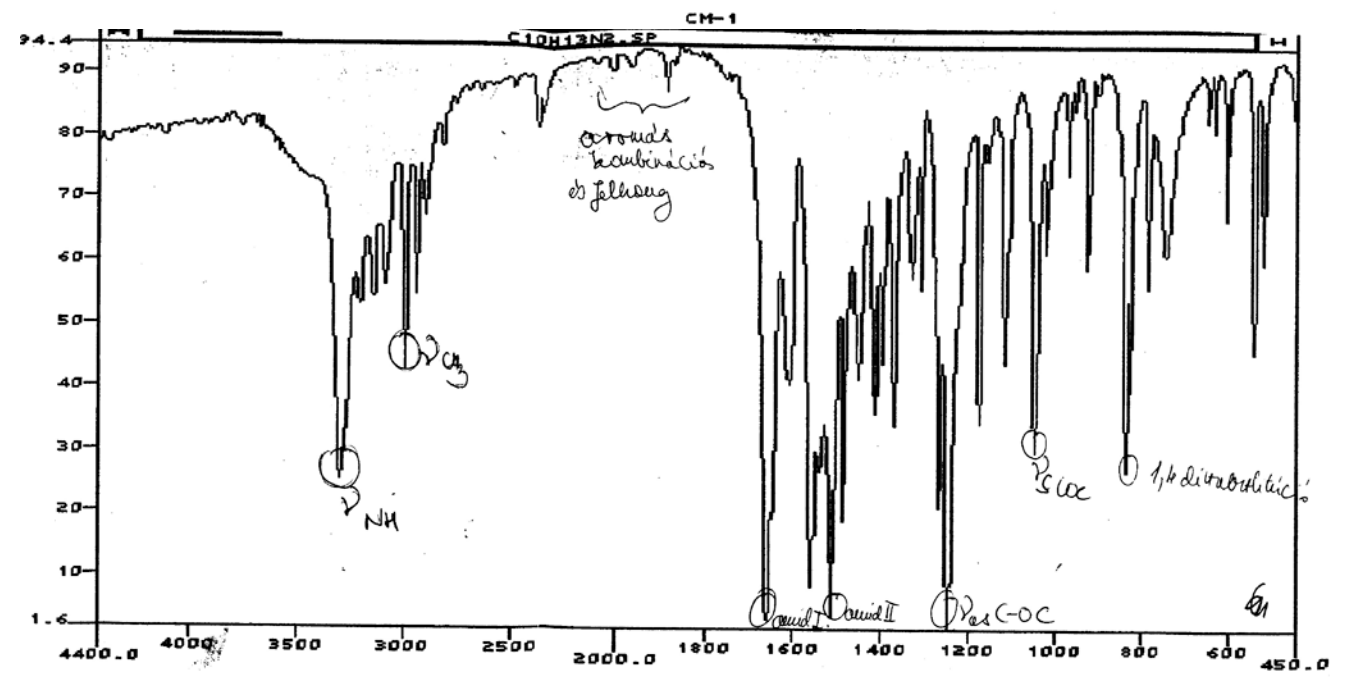
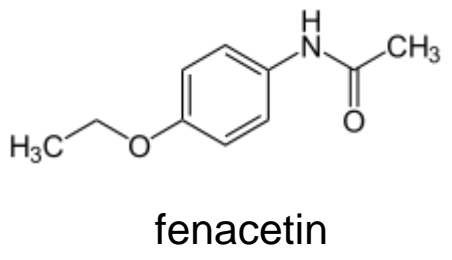
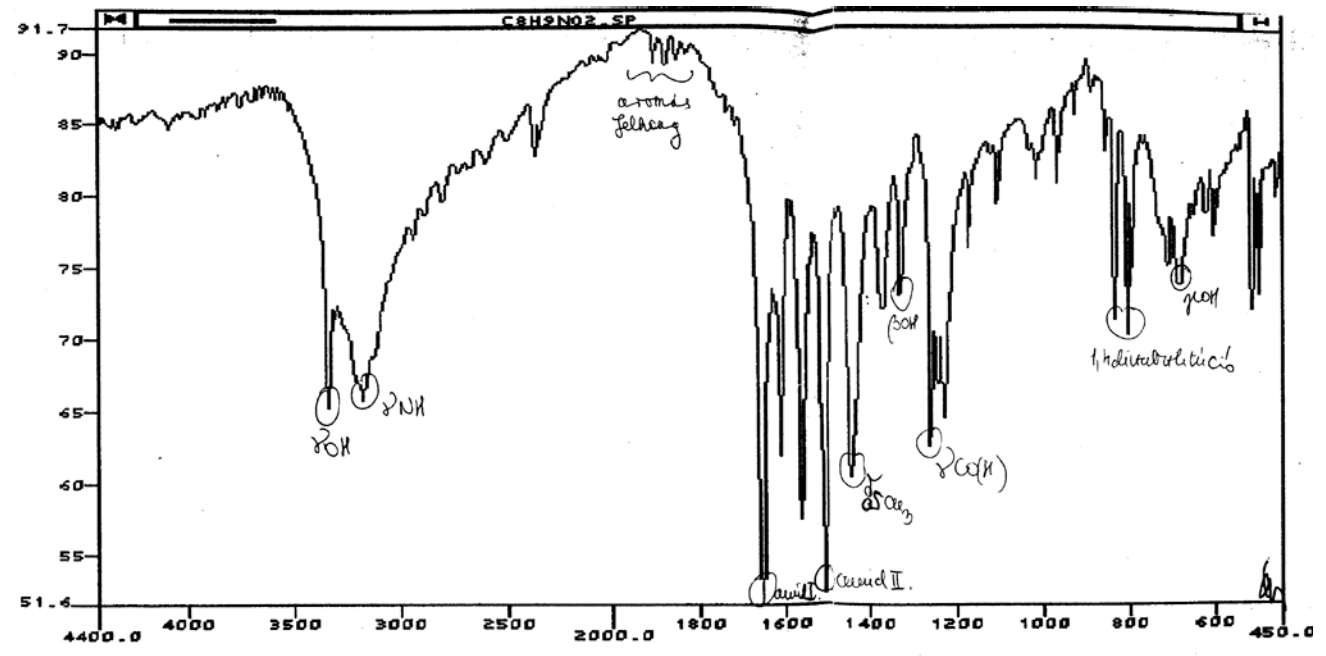
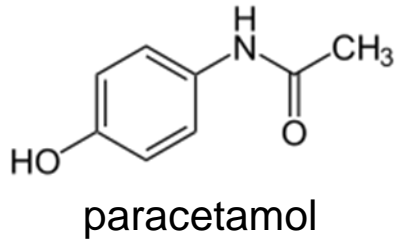
IR **elsősorban kvalitatív** információt hordoz:

- molekulák funkciós csoportjainak azonosítása, jelenlétük kimutatása
- új vegyületek szerkezetének felderítése
- tisztaságvizsgálat

DE általában önmagában nem elegendő a molekula azonosításához
(+MS, NMR...)

- Molekulák azonosítása során a meghatározandó minta spektrumát tiszta standard anyag azonos körülmények között felvett spektrumával hasonlítják össze.
- Azonosítási, illetve szerkezetvizsgálati célokra tiszta, szennyeződésmentes és lehetőleg gondosan víztelenített minta szükséges; a spektrum minőségét a minta víztartalma lényegesen befolyásolja.
- Spektrum minőségét a minta előkészítése, a preparálás módja is jelentősen meghatározza. Gyakran eltérő spektrumot kapunk a különböző módon készült mintákról.

IR alkalmazása



IR alkalmazása

Kvantitatív analízis:

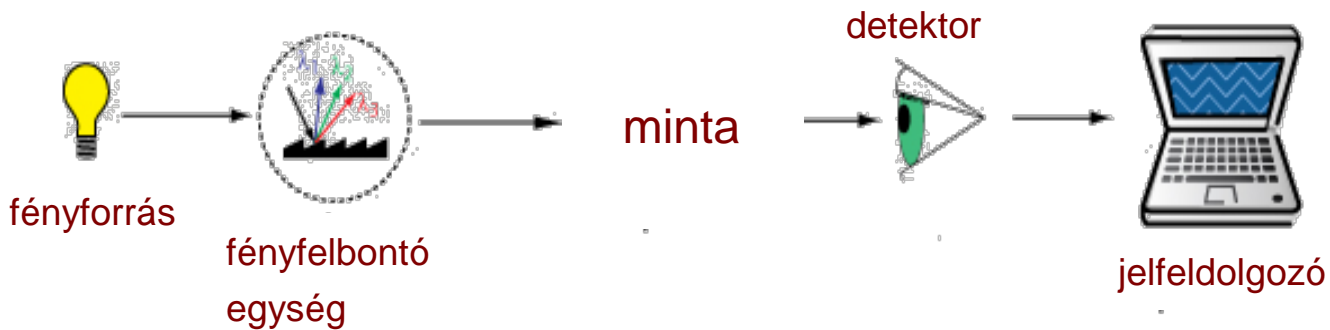
Lambert-Beer törvény szerint, $A = \epsilon cl$

(fényelnyelés arányos a koncentrációval)

Integrálabszorbancia: Területabszorbancia, általában az elnyelési sáv integrált abszorbanciáját használják, nem az adott hullámszámhoz tartozó abszorbanciát. Ez jellemzőbb a sávkiszélesedés miatt.

IR spektrofotométer felépítése

Elvi felépítése hasonló az UV-VIS fotométerekével
(fő részei: fényforrás, fényfelbontó egység, mintatér, detektor)



Fényforrás:

W-lámpa: közeli IR

Globalar-égő: SiC-rúd, $500-2500\text{ cm}^{-1}$

Hg-gőz lámpa: távoli IR

IR spektrofotométer, fényfelbontás, minták

Fényfelbontó egység:

Korábban: optikai rács, prizma

ezek ún. diszperziós módszerek: egyidejűleg csak egy szűk hullámhossztartományban képesek mérni

Manapság: Fourier-transzformációs (FT) technika
széles spektrális tartományban gyűjt egyidejűleg adatokat

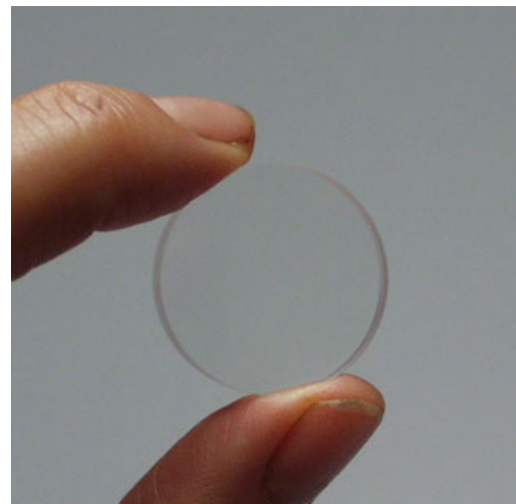
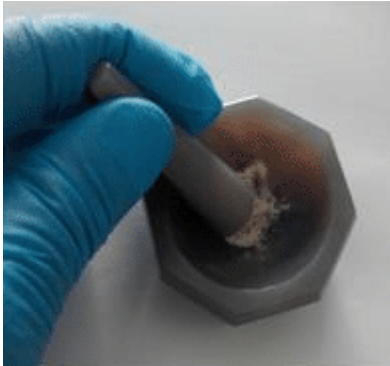
Minta:

Mindhárom halmazállapotban vizsgálhatók az anyagok!

- Gázok, folyadékok: alkálihalogenid ablakkal lezárt küvettában
- Szilárd mintákat: KBr-ban pasztillázva, vagy paraffin olajban (Nujol) szuszpendálva

IR spektrofotométer, szilárd minták

KBr pasztilla: nagy nyomáson (~600 bar) formázható, IR-áteresztő, fontos a homogenitás



Detektor:

- termikus érzékelők, pl. termisztor (hő éri megváltozik vezetőképessége)
- UV-VIS detektorok elvén működő fotoelektromos detektorok a közeli IR ($0,8\ \mu\text{m}$ - $30\ \mu\text{m}$) tartományban