

### 5.3. Stany oscylacyjne

Stany oscylacyjne cząsteczki analizuje się, badając światło przechodzące lub światło rozproszone. W pierwszym przypadku metoda eksperymentalna to **spektroskopia IR (w podczerwieni)** (IR, ang. *infrared spectroscopy*). Promieniowanie podczerwone, którego zakres rozciąga się między mikrofalami i promieniowaniem widzialnym, może być dodatkowo podzielone na trzy podzakresy:

- 1) bliska podczerwień (0,75–2,5  $\mu\text{m}$ ; 13335–5000  $\text{cm}^{-1}$ ),
- 2) średnia podczerwień (2,5–50  $\mu\text{m}$ ; 5000–400  $\text{cm}^{-1}$ )
- 3) daleka podczerwień (50–1000  $\mu\text{m}$ ; 400–10  $\text{cm}^{-1}$ )

Spektroskopia absorpcyjna, obejmująca zakres bliskiej podczerwieni (NIR, ang. *Near Infrared*), umożliwia badania nadtonów w ruchach oscylacyjnych cząsteczek oraz analizę stanów oscylacyjnych o wysokiej energii. Ten typ spektroskopii stosuje się zazwyczaj w analizie ilościowej grup funkcyjnych, głównie OH, NH i C=O w związkach organicznych.

Analiza światła rozproszonego również umożliwia badania stanów oscylacyjnych cząsteczek. W odpowiednich eksperymentach wykorzystuje się światło w zakresie widzialnym. Metoda badawcza nosi nazwę **spektroskopii Ramana**.

W badaniach makrocząsteczek biologicznych obie techniki pomiarowe niosą informację o ich strukturze drugorzędowej. Nowe techniki pomiarowe, jak spektroskopia IR z transformacją Fouriera i spektroskopia wielowymiarowa IR, przynoszą informacje o dynamice badanych układów. Przy czym jest to analiza procesów zachodzących w czasie rzędu  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  sekundy.

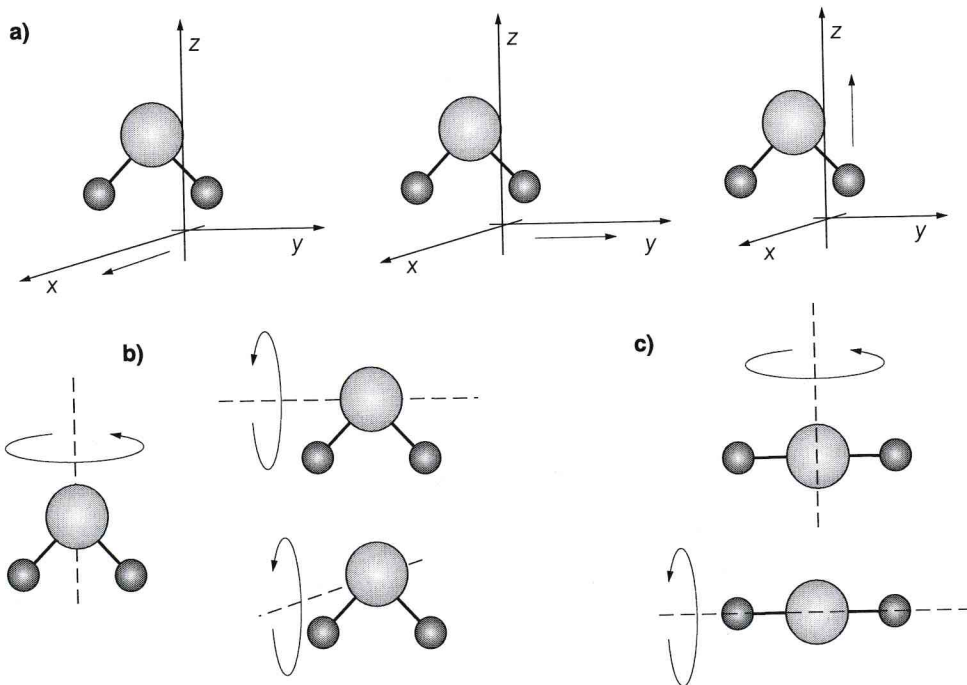
#### 5.3.1. Opis ruchu drgającego cząsteczek

##### Formy ruchu i stopnie swobody

Dla każdej cząsteczki możemy określić trzy formy ruchu: ruch translacyjny, ruch rotacyjny i ruch oscylacyjny.

**Ruchem translacyjnym** nazywamy przemieszczanie się całych cząsteczek w przestrzeni. Przykładem tej formy ruchu są ruchy Browna. Jest to wędrówka po linii prostej, od zderzenia do zderzenia (rys. 5.6). Przy założeniu, że taki ruch jest opisany wektorem, można przyjąć, iż ruch translacyjny cząsteczki można zawsze rozłożyć na trzy składowe odpowiadające przemieszczaniu się cząsteczki wzdłuż trzech prostopadłych kierunków dowolnego układu odniesienia. W ten sposób cząsteczka, która wykonuje ruch translacyjny, przypisuje się trzy stopnie swobody, ponieważ „ma ona do dyspozycji” trzy niezależne kierunki ruchu.

**Drugą formą ruchu jest rotacja.** Są to obroty cząsteczki wokół określonej osi własnej. Przy czym dla każdej cząsteczki nieliniowej możemy wyróżnić trzy wzajemnie prostopadłe, niezależne osie rotacji. Każdy obrót cząsteczki jest złożeniem obrotów wokół tych osi. W ruchu rotacyjnym, podobnie jak w ruchu translacyjnym cząsteczka ma zatem trzy stopnie swobody. Wyjątek stanowi cząsteczka liniowa (rys. 5.6c). W tym przypadku można wyróżnić jedynie dwie niezależne osie rotacji – oś równoległą do osi głównej cząsteczki i oś do niej prostopadłą. Cząsteczka liniowa ma zatem tylko dwa stopnie swobody.



Rys. 5.6. Formy ruchu cząsteczek: a) ruch translacyjny (3 stopnie swobody), b) ruch rotacyjny (3 stopnie swobody), c) ruch rotacyjny (2 stopnie swobody)

**Trzecią formą ruchu są oscylacje.** Ruch ten definiuje się jako drgania atomów cząsteczki wokół ich położenia równowagi. Ruchy atomów łączą się ze zmianami długości wiązań oraz ze zmianami kątów płaskich lub dwuściennych między wiązaniami. W tym przypadku liczba stopni swobody zależy od liczby atomów tworzących cząsteczkę. Cząsteczka zbudowana z  $N$  atomów posiada  $3N$  stopni swobody. Jest tak dlatego, że każdy z  $N$  atomów tej cząsteczki ma trzy stopnie swobody w swoim ruchu translacyjnym wokół położenia równowagi. Ruch translacyjny poszczególnych atomów składa się nie tylko na oscylacje cząsteczki, ale także na jej ruchy rotacyjne i translacyjne. Dochodzi do tego wówczas, gdy sumaryczny ruch wszystkich atomów w danej chwili spowoduje przesunięcie lub obrót całej cząsteczki. Jeżeli zatem w ruchu translacyjnym cząsteczka ma trzy stopnie swobody i w ruchu rotacyjnym (w ogólnym przypadku) też trzy stopnie swobody, to w ruchu „czysto” oscylacyjnym cząsteczka ma  $3N - 6$  stopni swobody. Tylko w przypadku cząsteczki liniowej, ze względu na liczbę stopni swobody w ruchu rotacyjnym, liczba ta zmienia się na  $3N - 5$ .

### Drgania normalne cząsteczki

W spektroskopii oscylacyjnej analizie poddane są oczywiście tylko takie drgania atomów, które nie powodują translacji lub rotacji całej cząsteczki. Drgania takie nazywamy **drzganiami własnymi** cząsteczki. Dla dowolnej cząsteczki zbudowanej z  $N$  atomów istnieje  $3N - 6$  takich drgań.

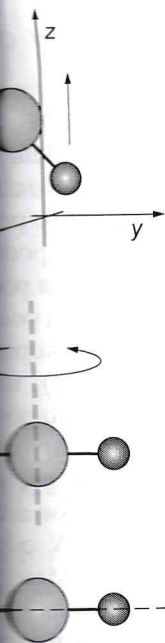
drzganie symetryczne

Rys. 5.7. Współ

Drgania współrzędne cząsteczki w przestrzeni wewnętrznej oraz współrzędne Drgania współrzędne może być rozmi (3N - 6)-w niezależne i te nazywamy jednocześnie częstością i w są znacznie kł du na zmian że ze względu

### 5.3.2. Spe

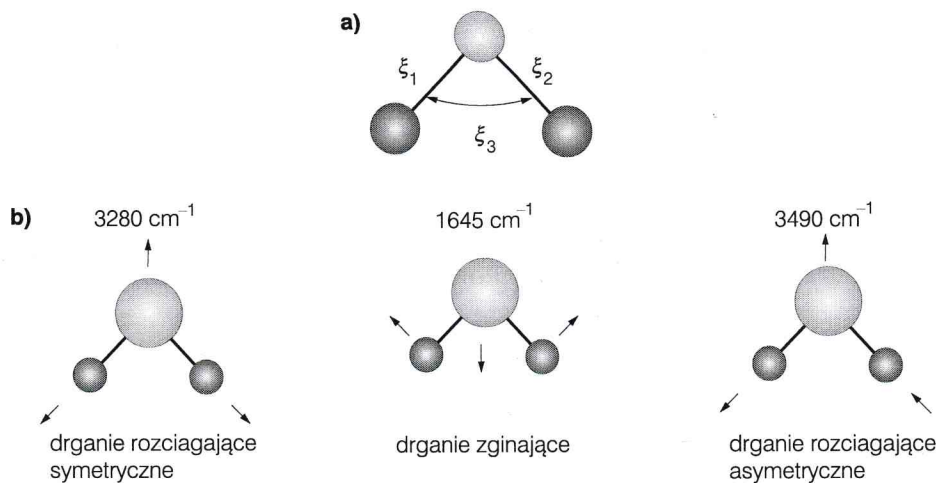
Spektroskop poci wyznacz nym działan przechodzi z stwo W tego mieniowania nikiem prop



... ruch rotacyjny (3 stop-

... jako drgania ato-  
... za się ze zmianami  
... między wiąza-  
... atomów tworzących  
... swobody. Jest tak  
... w swoim ruchu  
... szczególnych ato-  
... ruchy rotacyjne  
... wszystkich atomów  
... Jeżeli zatem w ru-  
... tacyjnym (w ogólnie-  
... oscylacyjnym czas-  
... miowej, ze względu  
... na  $3N - 5$ .

... takie drgania ato-  
... Drgania takie nazy-  
... zbudowanej z  $N$



Rys. 5.7. Współrzędne wewnętrzne (a) oraz schemat drgań normalnych cząsteczki wody (b)

Drgania cząsteczki opisuje się w **układzie współrzędnych wewnętrznych**. Liczba współrzędnych wewnętrznych odpowiada liczbie stopni swobody cząsteczki. Na przykład cząsteczce wody  $\text{H}_2\text{O}$ , która zbudowana jest z trzech atomów, przypisuje się trzy współrzędne wewnętrzne – dwie współrzędne  $\xi_1$  i  $\xi_2$ , opisujące rozciąganie dwóch wiązań OH, oraz współrzędną  $\xi_3$  opisującą zmiany kąta między tymi wiązaniami (rys. 5.7a).

Drgania własne cząsteczki mogą być zapisane w  $(3N - 6)$ -wymiarowej przestrzeni współrzędnych wewnętrznych. Tak jak każdy wektor w przestrzeni trójwymiarowej może być rozłożony na trzy wzajemnie prostopadłe wektory składowe, tak w przestrzeni  $(3N - 6)$ -wymiarowej drgania własne cząsteczki mogą być rozłożone na wzajemnie niezależne i ortogonalne (ogólne pojęcie prostopadłości) drgania składowe. Drgania te nazywamy **drzganiami normalnymi** cząsteczki. Tę formę drgań definiujemy jako jednoczesne oscylacje atomów wokół położenia równowagi odbywające się z tą samą częstością i w tej samej fazie (rys. 5.7b). Drgania normalne wieloatomowej molekuly są znacznie bardziej złożone niż drgania cząsteczki wody. Porządkuje się je ze względu na zmiany długości wiązań chemicznych, zmiany kątów między wiązaniami, a także ze względu na symetrię.

### 5.3.2. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni

Spektroskopia w podczerwieni analizuje promieniowanie przechodzące. Proces absorpcji wyznacza zatem możliwość rejestracji jakichkolwiek zmian. W układzie poddanym działaniu promieniowania dochodzi do zjawiska absorpcji wymuszonej, a układ przechodzi ze stanu energetycznego  $j$  do stanu  $k$  o wyższej energii. Prawdopodobieństwo  $W$  tego, że taki proces będzie miał miejsce, jest proporcjonalne do gęstości promieniowania  $\rho$  (ilości fotonów w jednostce objętości układu badanego), a współczynnikiem proporcjonalności jest współczynnik Einsteina  $B_{jk}$

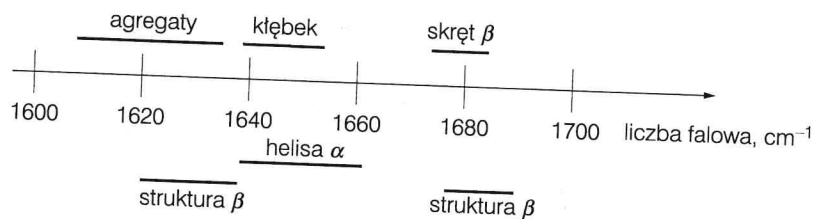
$$W = B_{jk}\rho \quad (5.13)$$

falowymi tych impulsów pojawia się z kierunku

(5.16)

nych. Amplituda i faza przesłane przez „zmieszanie” go są w odstępach czasu, czekaniem i defekcją funkcją  $\tau_1$  i  $\tau_3$ . Transmisja domeny częstotści

już pod koniec lat 70. zanim rozwinęła się spektroskopia w badaniach strukturalnych w podczerwieni. Położenie pasm jest do dnia dzisiejszego przypisywane drgań struktury drugorzędowej, (tabela 5.1). W badaniach dyfrakcyjnych pasmo amidowe I.



Rys. 5.16. Położenie pasm amidowych I w przypadku różnych form struktury drugo- i trzeciorzędowej

Pasmo to występuje w zakresie  $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ . Przy czym, w zależności od elementów struktury drugorzędowej, jego szczegółowe położenie się zmienia (rys. 5.16). Trudność polega jednak na tym, że w widmie widoczne są nałożone na siebie pasma amidowe I pochodzące od wszystkich wiązań peptydowych. Wymieszane są zatem informacje o wszystkich elementach struktury drugorzędowej. Zaproponowano numeryczną analizę widm IR. Wyróżnia się dwie procedury: metodę dekonwolucji prowadzącą do znacznego zwężenia poszczególnych pasm składowych oraz metodę opartą na rozpoznawaniu wzoru (ang. *pattern recognition method*). W drugim przypadku analizie podlegają pasma amidowe I i II. Sama procedura jest bardzo zbliżona do tej, jaką stosuje się w analizie widm CD.

Rozdzielenie pasm amidowych I pochodzących od różnych wiązań peptydowych możliwe jest także eksperymentalnie, przez zastosowanie znakowania izotopowego. Procedura ta została wprowadzona do spektroskopii IR w połowie lat osiemdziesiątych XX w. [24]. Najbardziej efektywne jest podstawienie izotopem  $^{13}\text{C}$ . Zamiana izotopów w wiązaniu peptydowym przesuwają pasmo amidowe I o  $35\text{ do }40\text{ cm}^{-1}$  w stronę mniejszych wartości liczby falowej. Stosuje się również podstawienie izotopem azotu  $^{15}\text{N}$ . Nie zmienia ono zasadniczo położenia pasma amidowego I, ale powoduje istotne przesunięcie pasma amidowego II.

Za pomocą spektroskopii 2D IR najczęściej rejestruje się widma w zakresie pasma amidowego I. Widma 2D IR niosą informację o wiązaniach chemicznych oraz o oddziaływaniach białek z cząsteczkami otoczenia. Poza tym metoda ta może być wykorzystana w badaniach DNA lub ogólnie w badaniach reakcji chemicznych, w tym reakcji wymiany (np. wymiany H/D). Spektroskopia impulsowa IR przeznaczona jest bowiem do analizy procesów dynamicznych (w przedziale czasowym pikosekund).

Opracowano również eksperymenty, których wynikiem są widma dwuwymiarowe w spektroskopii Ramana.

### 5.3.3. Spektroskopia Ramana

Spektroskopia Ramana jest również metodą analizy ruchów oscylacyjnych w układzie molekularnym. Opiera się ona jednak nie na absorpcji promieniowania jak spektroskopia w podczerwieni, lecz na zjawisku rozpraszania. Zakres fal elektromagnetycznych wykorzystywanych w tej metodzie to przede wszystkim światło widzialne.

Zjawisko rozpraszania światła w zakresie widzialnym jest przedstawione w podrzdziale 4.2. Opis ten dotyczy jednak rozpraszania Rayleigha. Już w połowie lat dwudziestych XX w. fizycy teoretycy zaczęli wysuwać hipotezę, iż oprócz pasma

Rayleigha w świetle rozproszonym powinno być widoczne inne pasmo. To promieniowanie powinno mieć częstość różną od częstości promieniowania padającego – pomniejszoną lub powiększoną o częstość oscylacji i rotacji. Potwierdzeniem poprawności tej hipotezy były doświadczenia przeprowadzone przez **Chandrasekhara V. Ramana**<sup>99</sup> oraz **G.S. Landsberga** i **L.I. Mandelsztama**. Pokazali oni, że zarówno w cieczach, jak i w ciele stałym nowe zjawisko rozpraszania jest widoczne.

Mechanizm rozpraszania Ramana opisuje się zwykle na podstawie teorii polaryzowalności **Placzka**. Światło rozproszone jest emitowane przez indukowany, drgający moment elektryczny. Jego wielkość opisana jest wzorem

$$\mu = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (5.17)$$

w którym  $E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$  opisuje pole elektryczne fali o częstości  $\nu_0$  padającej na układ cząsteczek, natomiast  $\alpha$  oznacza polaryzowalność elektronową cząsteczek. Wielkość ta zmienia się w trakcie ruchu drgającego atomów, gdy długości wiązań i kąty pomiędzy wiązaniami ulegają zmianie. W bardzo prostym układzie dwóch atomów, gdy wychylenie z położenia równowagi jest niewielkie, polaryzowalność jest funkcją wychylenia  $\alpha(q)$

$$\alpha(q) = \alpha_0 + \left( \frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q \cos(2\pi\nu t) \quad (5.18)$$

Po uwzględnieniu tych założeń, indukowany moment dipolowy ma postać

$$\begin{aligned} \mu = & \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left( \frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q E_0 \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{\text{osc}})t] + \\ & + \frac{1}{2} \left( \frac{d\alpha}{dq} \right)_0 Q E_0 \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{\text{osc}})t] \end{aligned} \quad (5.19)$$

Wynik ten wyjaśnia pochodzenie zjawiska rozpraszania Ramana. Zmieniający się w czasie indukowany moment dipolowy emituje fale elektromagnetyczne o częstości  $\nu_0$ ,  $(\nu_0 - \nu)$  oraz  $(\nu_0 + \nu)$ . Fala o częstości  $\nu_0$  jest efektem rozpraszania Rayleigha, natomiast fale o częstościach  $(\nu_0 - \nu)$  oraz  $(\nu_0 + \nu)$  są efektem rozpraszania Ramana. Są to odpowiednio składowa stokesowska i składowa antystokesowska (rys. 5.17).

W eksperymencie nie jest to jednak pojedyncza linia widmowa ale pasmo linii różniących się wielkością częstości oscylacji molekularnych  $\nu$ . **Rozpraszanie Rayleigha to rozpraszanie sprężyste**. Cząsteczka przechodzi ze stanu podstawowego do stanu wirtualnego i następnie wraca do stanu podstawowego. Energia promieniowania rozproszonego jest taka sama jak energia promieniowania padającego. **Rozpraszanie Ramana odpowiadające składowej stokesowskiej to rozpraszanie niesprężyste**. Cząsteczka przechodzi do stanu wirtualnego, lecz powraca na wyższy

<sup>99</sup> **Chandraseckhar V. Raman** (1888–1970) – fizyk hinduski, laureat Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki (1930). Nagrodę przyznano za badania procesu rozpraszania światła i odkrycie efektu, który dzisiaj nazywa się rozpraszaniem Ramana. Praca na temat nowo odkrytego zjawiska: Raman C.V., Krishnan K.S., „New type of secondary radiation”, *Nature*, **121**, 501 (1928). Przedmiotem tych badań było rozpraszanie światła w benzenie. Zajmował się również wybranymi zagadnieniami akustyki, np. akustyką instrumentów muzycznych.

Rys. 5.17. W  
schemat prze

niż pierwot  
Rayleigha.  
**praszanie**  
praszanie n  
szego pozic  
przesunięte  
rystyczne ob  
antystokeso  
Ramana prz

Wynik  
nie się linii  
**skopii Ran**  
podczas drg  
ci  $\alpha$ . Wraca  
mie Ramana  
widoczne w  
małej masie  
Ramana, ta

Opisane  
**tu klasyczn**  
**rezonansow**  
W tym dośw  
wszystkie, a  
nansowe roz  
podlega pro  
różnych poz  
lektywne i p  
go otoczenia

pasmo. To promieniowanie padającego – potwierdzeniem poprawy Chandrasekhara V. kazali oni, że zarówno t widoczne.

podstawie teorii polaryzacji indukowany, drga-

$$(5.17)$$

na  $\nu_0$  padającej na układ cząsteczek. Wielkość kątów wiązań i kąty pomiędzy atomów, gdy wy- jest funkcją wychy-

$$(5.18)$$

ma postać

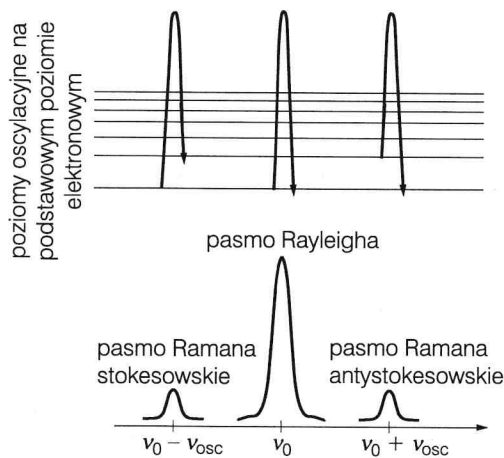
$$-v_{osc})t] +$$

$$(5.19)$$

Zmieniający się magnetyczne o częstości rozpraszania Rayleigha, na rozpraszania Ramana. stowska (rys. 5.17).

ale pasmo linii **Rozpraszanie Rayleigha** ze stanu podstawowego. Energia promieniowania padającego. **Rozpraszanie Rayleigha** to rozpraszanie powraca na wyższy

Nobla w dziedzinie fizyki, który dzisiaj nazywa się K.S., „New type of światła w benzenie. muzycznych.



Rys. 5.17. Widmo światła rozproszonego zawiera pasmo Rayleigha oraz pasma Ramana. Powyżej schemat przejść pomiędzy poziomami oscylacyjnymi na podstawowym poziomie elektronowym

niż pierwotnie stan oscylacyjny. Pasmo stokesowskie ma częstość niższą niż pasmo Rayleigha. Różnica odpowiada odległości poziomów oscylacyjnych cząsteczki. **Rozpraszanie Ramana** odpowiadające **składowej antystokesowskiej** to również rozpraszanie niesprężyste. Tym razem cząsteczka przechodzi do stanu wirtualnego z wyższego poziomu oscylacyjnego i powraca do stanu podstawowego. Pasmo to jest przesunięte ku wyższym częstościom niż pasmo Rayleigha. Ze względu na charakterystyczne obsadzenie poziomów energetycznych opisane rozkładem Boltzmanna, linie antystokesowskie mają mniejszą intensywność niż linie stokesowskie. W spektroskopii Ramana przedmiotem analizy jest pasmo stokesowskie lub antystokesowskie.

Wynik zapisany w równaniu (5.19) wskazuje też na kryteria warunkujące pojawienie się linii widmowej określonego drgania normalnego (**reguła wyboru w spektroskopii Ramana**). Obie składowe są różne od zera pod warunkiem, że ruch atomów podczas drgania normalnego określonego rodzaju wywołuje zmianę polaryzowalności  $\alpha$ . Wracając do przykładu cząsteczki  $\text{CO}_2$  (rys. 5.8), drganiem widocznym w widmie Ramana jest jedynie drganie rozciągające symetryczne, które nie jest w kolei widoczne w widmie w podczerwieni. W cząsteczkach wieloatomowych o względnie małej masie atomowej rejestrowane są równoległe widma w podczerwieni i widma Ramana, tak by można było analizować wszystkie drgania normalne tych cząsteczek.

Opisane tu w zarysie podstawy spektroskopii Ramana odnoszą się do **eksperymentu klasycznego, nierezonansowego**. Nowe metody pomiarowe to przede wszystkim **rezonansowa spektroskopia Ramana (RRS, ang. Resonance Raman Spectroscopy)**. W tym doświadczeniu linie widmowe ulegają znacznemu wzmocnieniu. Jednak nie wszystkie, ale tylko te, które odpowiadają drganiom normalnym chromoforu. Rezonansowe rozpraszanie Ramana jest bowiem eksperymentem, w którym rozpraszaniu podlega promieniowanie w zakresie UV, a analizie poddane są stany oscylacyjne na różnych poziomach elektronowych. Doświadczenie to jest w ten sposób bardzo selektywne i pozwala wyciągać wnioski co do samego chromoforu i jego bezpośrednio otoczenia chemicznego.