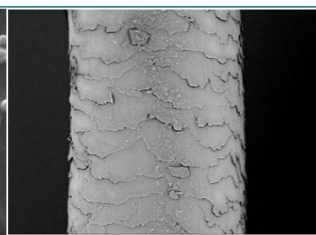
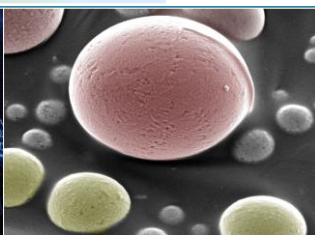


## Ćwiczenie 7

# Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej do identyfikacji i oznaczania leków



## I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest rejestracja oraz analiza widm Ramana powszechnie dostępnych leków, analiza ich składu oraz oznaczenie zawartości w nich substancji czynnej oraz substancji dodatkowych.

**Pytanie organu procesowego:** Czy dostarczone materiały dowodowe w postaci tabletek pochodzą z tego samego źródła (od tego samego producenta), co leki znalezione w miejscu popełnienia przestępstwa?

## Wstęp teoretyczny

Ekspertyza fizykochemiczna obejmuje badania identyfikacyjne i porównawcze oraz badania właściwości substancji chemicznych ujawnionych podczas oględzin miejsca zdarzenia. Do substancji tych należą między innymi środki odurzające, substancje psychotropowe, drażniące i obezwładniające, alkohole, leki, materiały wybuchowe i łatwopalne oraz inne ujawnione mikroślady (włókna, lakiery, smary). Szczególne znaczenie w badaniach fizykochemicznych ma ich zastosowanie w toksykologii, gdzie kluczowe staje się ustalenie wpływu danej substancji na organizm człowieka. Badania identyfikacyjne polegają na rozpoznaniu danej substancji poprzez pomiar jej charakterystycznych cech (np. pasm ramanowskich w danym zakresie spektralnym) i porównanie ich z danymi literaturowymi lub zgromadzonymi w specjalnych bazach. Badania porównawcze mają na celu określenie podobieństwa między cechami/właściwościami materiału dowodowego oraz materiału porównawczego. Na podstawie przeprowadzonej analizy wyników badań fizykochemicznych można również określić, czy materiał dowodowy pochodzi z tej samej grupy, serii produkcyjnej czy od tego samego producenta co materiał porównawczy. Materiał porównawczy powinien posiadać te same właściwości (stan skupienia, konsystencję, barwę, połysk i inne) co materiał dowodowy. Metody spektroskopowe (UV-VIS, IR, RAMAN) są technikami wykorzystywanymi do identyfikacji związków organicznych i nieorganicznych, można je stosować nawet w przypadku posiadania niewielkiej ilości materiału dowodowego.

Spektroskopia ramanowska jest jedną z technik fizykochemicznych wykorzystywaną do identyfikacji i porównywania substancji chemicznych. W kryminalistyce stosuje się tę metodę do badania płynów ustrojowych (śliny, spermy, krwi) oraz w toksykologii do identyfikacji substancji toksycznych (leków, narkotyków, substancji psychoaktywnych), a także do badania innych materiałów dowodowych: klejów, szminek, lakierów samochodowych.

Spektroskopia Ramana należy do technik pomiarowych, w których bada się promieniowanie rozproszone. Odpowiednie ustawienie detektora promieniowania pozwala na detekcję światła rozproszonego i pomiar jego natężenia oraz długości fali. Skład oraz strukturę cząsteczek badanych substancji określa się w spektroskopii Ramana na podstawie analizy ruchów oscylacyjnych, czyli drgań atomów cząsteczki wokół ich położeń równowagi. Ruchy te są związane ze zmianą długości wiązań oraz zmianami kątów między wiązaniami. W metodzie tej wykorzystuje się światło z zakresu widzialnego, które ulega rozproszeniu w wyniku oddziaływania pola elektrycznego fali elektromagnetycznej z cząsteczkami ośrodka. Światło rozproszone jest emitowane przez indukowany drgający moment elektryczny, którego wielkość zależy między innymi od polaryzowalności

elektronowej cząsteczki. Promieniowanie elektromagnetyczne o częstości  $\nu_0$  indukuje w cząsteczce moment dipolowy  $\mu_{ind}$  proporcjonalny do natężenia składowej elektrycznej  $E$  tego pola:

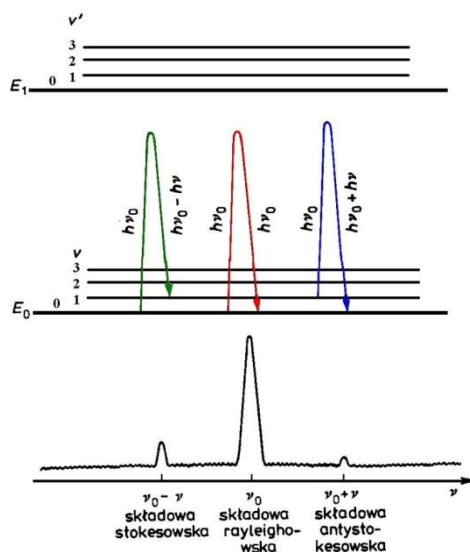
$$\mu_{ind} = \alpha E,$$

współczynnik proporcjonalności  $\alpha$  jest polaryzowalnością elektronową cząsteczki. Wielkość drgającego indukowanego momentu dipolowego opisuje następujące wyrażenie:

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

w którym  $E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$  opisuje pole elektryczne fali o częstości  $\nu_0$  padającej na układ cząsteczek. Polaryzowalność zmienia się w trakcie ruchu drgającego atomów, gdy zmieniają się długości wiązań i kąty pomiędzy nimi. Jest ona funkcją wychylenia układu atomów z położenia równowagi. Zmieniający się w czasie indukowany moment dipolowy emituje fale elektromagnetyczne o częstości równej częstości promieniowania padającego (rozpraszanie Rayleigha) oraz o częstościach wyższych i niższych od częstości promieniowania padającego (rozpraszanie Ramana). Podczas rozpraszania Rayleigha cząsteczka przechodzi ze stanu podstawowego do tzw. stanu wirtualnego, który znajduje się między poziomem elektronowym podstawowym a pierwszym poziomem elektronowym wzbudzonym. Energia, którą cząsteczka nabyła w wyniku oddziaływania z promieniowaniem padającym nie jest wystarczająca, by osiągnąć wzbudzony stan elektronowy. Gdy cząsteczka ze stanu wirtualnego powraca do stanu podstawowego, to energia promieniowania rozproszonego jest taka sama jak promieniowania padającego - rozpraszanie sprężyste (Rayleigha). Rozpraszanie Ramana jest rozpraszaniem niesprężystym. Cząsteczka przechodzi do stanu wirtualnego, ale powraca na wyższy poziom oscylacyjny i w ten sposób generowane jest pasmo stokesowskie widma Ramana. Cząsteczka może również przechodzić do stanu wirtualnego z wyższego poziomu oscylacyjnego i powrócić do stanu podstawowego – powstaje wówczas pasmo antystokesowskie. Schemat przejść pomiędzy poziomami oscylacyjnymi na podstawowym poziomie elektronowym podczas zjawiska rozpraszania promieniowania przedstawiono na Rys. 1.

Warunki (tzw. reguły wyboru), jakie muszą być spełnione, by zaszło zjawisko rozpraszania promieniowania są następujące: wzbudzenie odbywa się za pomocą promieniowania widzialnego,  $\nu \approx 25000 \text{ cm}^{-1}$  w substancjach bezbarwnych, czyli w takich, w których pierwszy wzbudzony poziom elektronowy jest oddalony o  $\nu \approx 30000 \text{ cm}^{-1}$  od poziomu podstawowego oraz gdy występuje zmiana polaryzowalności cząsteczki w czasie jej drgania normalnego tj.  $(d\alpha/dq) \neq 0$ . Drganie normalne jest definiowane jako jednoczesny ruch oscylacyjny atomów lub grup funkcyjnych cząsteczki wokół położenia równowagi, odbywający się w zgodnej fazie i z jednakową częstością. Drgania normalne są wzajemnie niezależne. W drganiu tym amplitudy wychyleń atomów z położenia równowagi mogą być różne ale nie występuje przemieszczenie środka masy cząsteczki.



Rys. 1. Schemat przejść pomiędzy poziomami oscylacyjnymi na podstawowym poziomie elektronowym podczas zjawiska rozpraszania promieniowań<sup>1</sup>.

## II. Literatura

1. Z. Kęcki „Podstawy spektroskopii molekularnej”, PWN Warszawa 1992.
2. A. Cygański „Metody spektroskopowe w chemii analitycznej”, Wydawnictwa Naukowo Techniczne Warszawa 2002.
3. G. Ślósarek „Biofizyka molekularna”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.
4. C. Kittel „Wstęp do fizyki ciała stałego”, PWN Warszawa 1999.
5. J. P. Simons „Fotochemia i spektroskopia”, PWN Warszawa 1976.
6. red. J. Najbar, A. Turek „Fotochemia i spektroskopia optyczna , ćwiczenia laboratoryjne”, PWN Warszawa 2009.
7. H. Haken, H. C. Wolf „Fizyka molekularna z elementami chemii kwantowej”, PWN Warszawa 1998.
8. P. Kowalczyk „Fizyka cząsteczek”, PWN Warszawa 2000.
9. red. I. Sołtyszewski „Badania kryminalistyczne (wybrane aspekty), Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2007.
10. red. J. Wójcikiewicz „Ekspertyza Sądowa”. Zagadnienia Wybrane; Wolters Kluwer, Warszawa 2007.

<sup>1</sup> Z. Kęcki „Podstawy spektroskopii molekularnej”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.

### III. Zagadnienia do opracowania

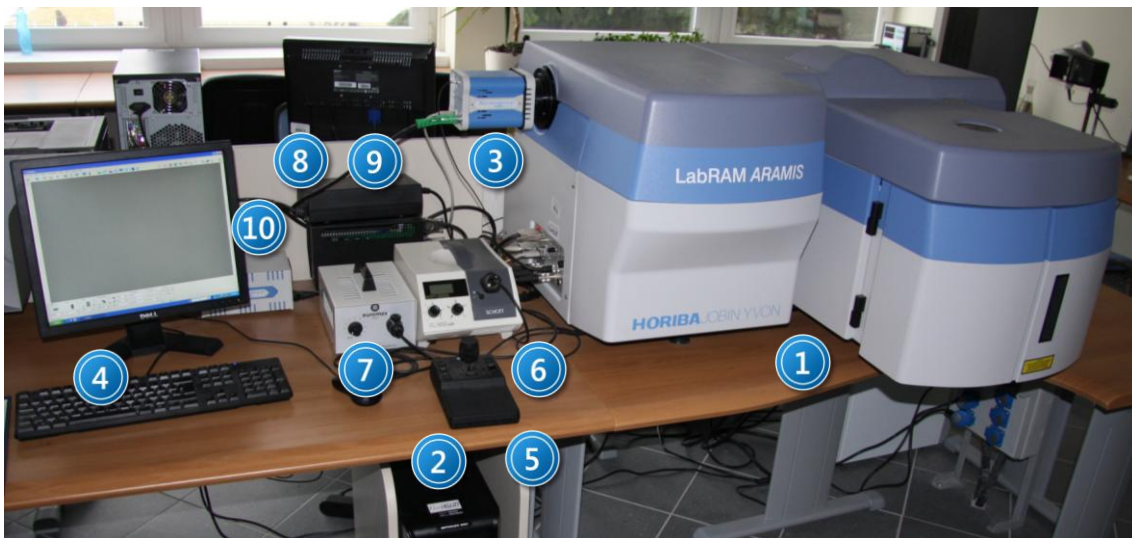
1. Zjawisko rozpraszania Rayleigha i Ramana – podstawy fizyczne.
2. Drgania oscylacyjne.
3. Ramanowska mikroskopia współogniskowa (konfokalna).
4. Lasery jako źródło wzbudzenia w spektroskopii Ramana.
5. Emisja spontaniczna.
6. Emisja wymuszona.
7. Budowa spektrometru ramanowskiego.
8. Zastosowania spektroskopii ramanowskiej.

### IV. Zestaw przyrządów.

1. Spektrometr ramanowski LabRam Aramis firmy Horiba Yobin Yvon.
2. Kamera CCD Synapse firmy Horiba Yobin Yvon.
3. Joystick sterowania stolikiem XYZ mikroskopu.
4. Dwa oświetlacze mikroskopu dla próbek przezroczystych i nieprzezroczystych.
5. Transformator.
6. Zasilacz do stolika XYZ mikroskopu.
7. Zasilacz kamery CCD.
8. Zasilacze laserów: He-Ne i YAG:Nd.
9. Zestaw komputerowy.

## V. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

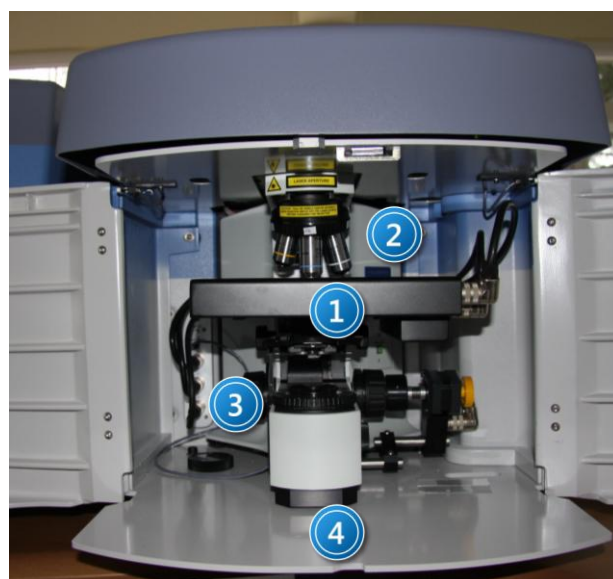
1. Zapoznać się z układem pomiarowym przedstawionym na *Zdjęciach 1, 2 i 3*.



*Zdjęcie 1. Układ pomiarowy – widok z przodu: 1 - spektrometr Ramana; 2 - komputer; 3 - kamera CCD; 4 - monitor z klawiaturą; 5 - joystick sterujący stolikiem x,y,z mikroskopu; 6 - oświetlacz mikroskopu; 7 - oświetlacz mikroskopu dla próbek przezroczystych; 8 - transformator; 9 - zasilacz do stolika x,y,z mikroskopu; 10 - zasilacz do kamery CCD.*



*Zdjęcie 2. Układ pomiarowy – widok z boku: 1 - zasilacz lasera He-Ne; 2 - zasilacz lasera YAG:Nd; 3 - spektrometr Ramana.*



*Zdjęcie 3. Komora spektrometru: 1 - stolik x,y,z mikroskopu; 2 - obiektywy mikroskopu; 3 - śruba przesuwu w kierunku z; 4 - kondensator z polaryzatorem.*

2. Zapoznać się z instrukcją obsługi stanowiska pomiarowego umieszczonego w *Dodatku*.
3. Zarejestrować widma Ramana materiału dowodowego: tabletek producenta A oraz B.  
Zapisać widmo w formacie \*.ngs oraz \*.txt.

4. Zarejestrować widmo Ramana materiału porównawczego: substancji czynnej obecnej w analizowanych lekach (widmo porównawcze).
5. Opracować wyniki pomiarowe:
  - przedstawić widma Ramana dla materiału dowodowego oraz widmo porównawcze na jednym wykresie;
  - wskazać pasma ramanowskie (wartość liczby falowej w  $\text{cm}^{-1}$ ) pochodzące od drgań grup molekularnych znajdujących się w cząsteczce substancji czynnej leków pochodzących od różnych producentów i porównać ze wzorcem;
  - wskazać pasma ramanowskie (wartość liczby falowej w  $\text{cm}^{-1}$ ) pochodzące od substancji dodatkowych zawartych w lekach - zaznaczyć podobieństwa i różnice między lekami pochodzącymi od różnych producentów;
  - wykonać analizę porównawczą intensywności linii substancji czynnej dla wszystkich badanych próbek;
  - wyniki analizy porównawczej położenia oraz intensywności pasm ramanowskich przedstawić w tabeli:

Tabela 1. Położenie pasm ramanowskich dla tabletek od różnych producentów oraz dla substancji porównawczej (wzorzec) .

Rodzaj drgania grupa molekularna	Położenie pasma ramanowskiego [ $\text{cm}^{-1}$ ] Producent A	Położenie pasma ramanowskiego [ $\text{cm}^{-1}$ ] Producent B	Położenie pasma ramanowskiego [ $\text{cm}^{-1}$ ] wzorzec

6. Sporządzić opinię dla organu procesowego.

Sprawozdanie ma mieć charakter przykładowej opinii biegłego tzn.: zawierać takie elementy jak:

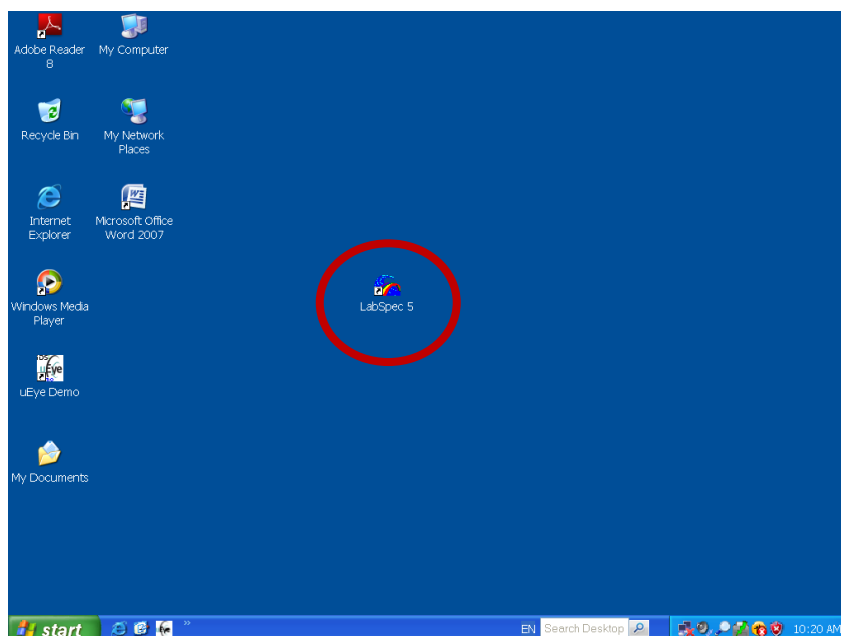
- imię, nazwisko, stopień i tytuł naukowy, specjalność i stanowisko zawodowe biegłego;
- imiona i nazwiska oraz pozostałe dane innych osób, które uczestniczyły w przeprowadzeniu ekspertyzy, ze wskazaniem czynności dokonanych przez każdą z nich, w przypadku opinii instytucji - także pełną nazwę i siedzibę instytucji;
- czas przeprowadzonych badań oraz datę wydania opinii;
- szczegółowy opis nadesłanego materiału dowodowego, porównawczego (sposób zabezpieczenia podczas transportu, opis opakowania, jego cechy ogólne i indywidualne) i cytowane pytania organu procesowego;
- informację o zastosowanych technikach i metodach;
- sprawozdanie z przeprowadzonych badań i obserwacji;
- interpretację wyników i wnioski;
- podpisy wszystkich biegłych, którzy uczestniczyli w wydaniu opinii.

Opinia powinna być napisana zrozumiałym językiem, a wnioski powinny być bardzo czytelne, zwłaszcza dla organów procesowych (dla prokuratury i sędziego).

## Dodatek

### Instrukcja obsługi aparatury pomiarowej

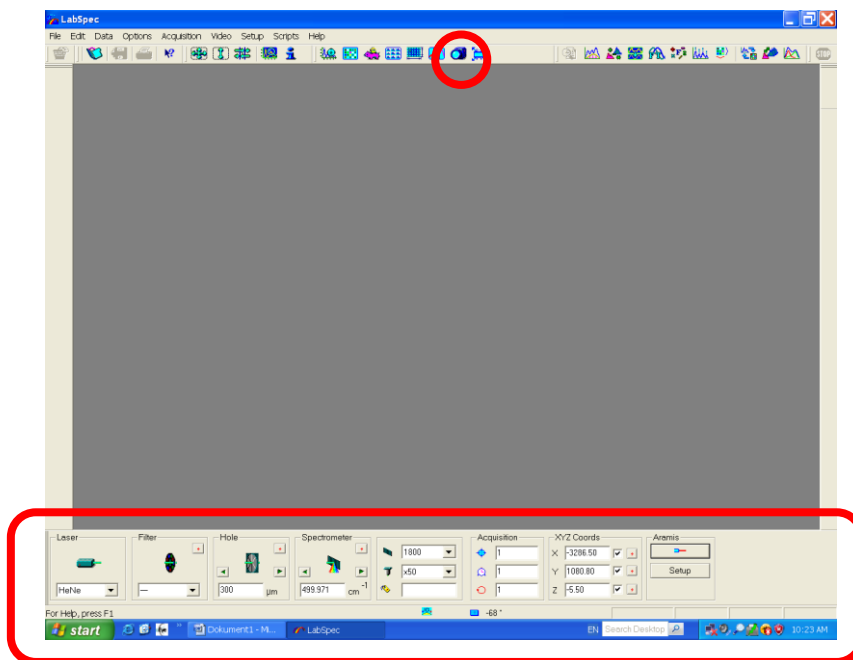
1. Włączyć zasilanie spektrometru Ramana, kamery CCD i stolika xyz mikroskopu konfokalnego wyłącznikiem na listwie zasilającej.
2. Włączyć laser He-Ne – przez przekręcenie kluczyka na obudowie zasilacza lasera (1 na *Zdjęciu 2*) (na obudowie zapali się zielona dioda).
3. Włączyć komputer. Na ekranie monitora pojawi się pulpit Windows XP. Uruchomić oprogramowanie „LabSpec 5” (zaznaczona ikona na *Zdjęciu 4*).



*Zdjęcie 4. Widok ekranu monitora przed rozpoczęciem pomiarów. Zaznaczono program do mierzenia widm Ramana.*

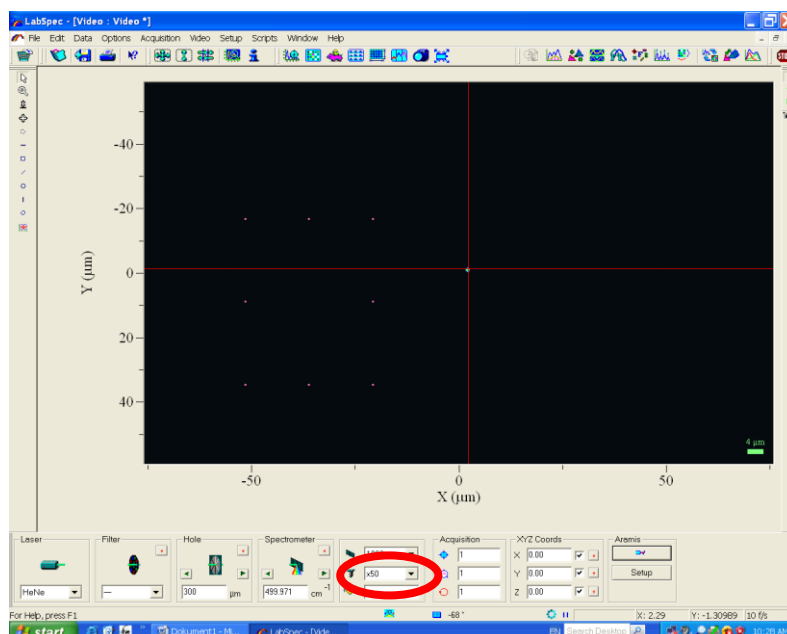
Na ekranie pojawi się okno jak na *Zdjęciu 5*.





Zdjęcie 5. Widok ekranu monitora z zaznaczonym trybem pracy Video. Zaznaczono ikonę trybu pracy video (u góry) oraz menu ustawienia parametrów pomiaru (na dole).

4. Włączyć kamerę – (ikona tryb pracy video zaznaczona na Zdjęciu 5).  
Na ekranie pojawi się tryb pracy video (Zdjęcie 6).



Zdjęcie 6. Ikona wyboru obiektywu mikroskopu konfokalnego. Dla Si i C wybrać obiektyw x50LWD.

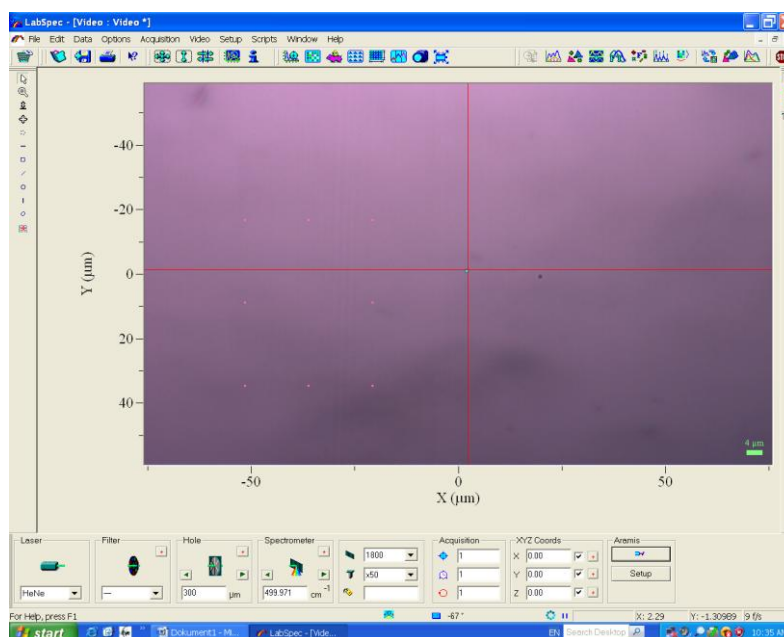
5. W komorze spektrometru (*Zdjęcie 3*) wybrać obiektyw x 50 LWD. Ten sam obiektyw wybrać w oknie „menu ustawienia parametrów pomiaru” (*Zdjęcie 6*).
6. Włączyć oświetlacz górny KL 1500 (6 na *Zdjęciu 1*). Wyłącznik znajduje się w dolnej części panelu. Ustawić pokrętko lewe w pozycji 4 natomiast pokrętko prawe w pozycji C.
7. Umieścić wybraną próbkę na stoliku mikroskopu. Pokręcając pokrętkiem „z” stolika mikroskopu (3 na *Zdjęciu 3*) zogniskować wiązkę światła na próbce aż do uzyskania obrazu powierzchni próbki na monitorze (*Zdjęcie 7*).
8. Uzyskać ostry obraz powierzchni badanej próbki poprzez delikatne pokręcanie pokrętkiem joysticka lewo-prawo. Właściwy obraz powierzchni próbki przedstawia *Zdjęcie 8*.

Zatwierdzić aktualną pozycję stolika z próbką w oprogramowaniu spektrometru naciskając trzy czerwone przyciski w ikonice XYZ Coords. Współrzędne x, y, z stolika (XYZ Coords) przyjmą wtedy wartości zerowe.

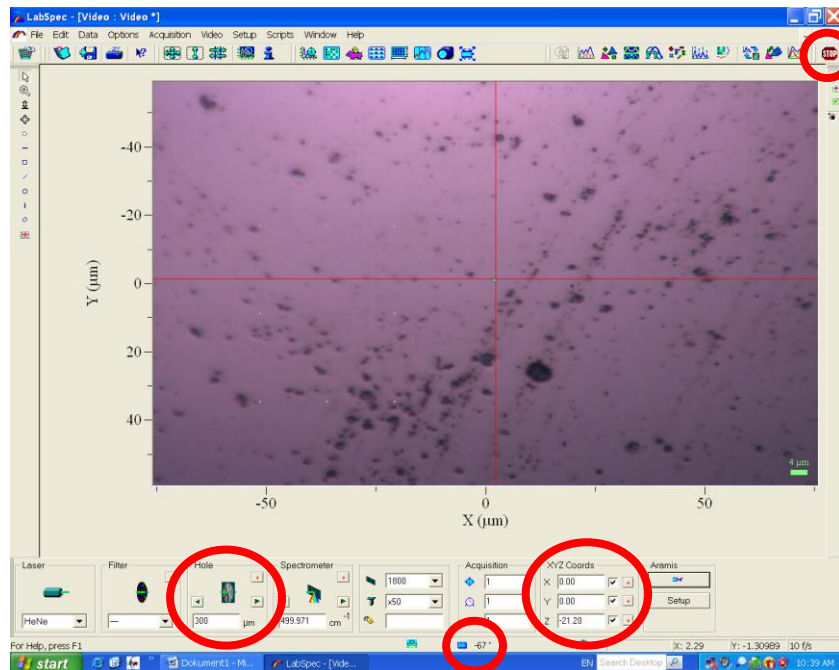


## Wskazówka

W przypadku pogorszenia ostrości obrazu można powrócić do poprzedniego obrazu wpisując zera w wartościach X, Y, Z w okienku XYZ Coords.



*Zdjęcie 7. Nieostry obraz powierzchni badanej próbki na monitorze.*



Zdjęcie 8. Wyraźny obraz powierzchni próbki. Zaznaczono: ikonę Stop (u góry); ikony przesłony mikroskopu (Hole) oraz kontroli pozycji stolika mikroskopu (XYZ Coords), temperaturę detektora (na dole).

9. Sprawdzić temperaturę detektora - powinna być niższa niż  $-60^{\circ}\text{C}$  (Zdjęcie 8).
10. Wyłączyć oświetlacz górny (6 na Zdjęciu 1) wyłącznikiem w dolnej części panelu.  
Wyłączyć tryb video przez uaktywnienie ikony Stop (Zdjęcie 8). Odczekać około 10 sekund.

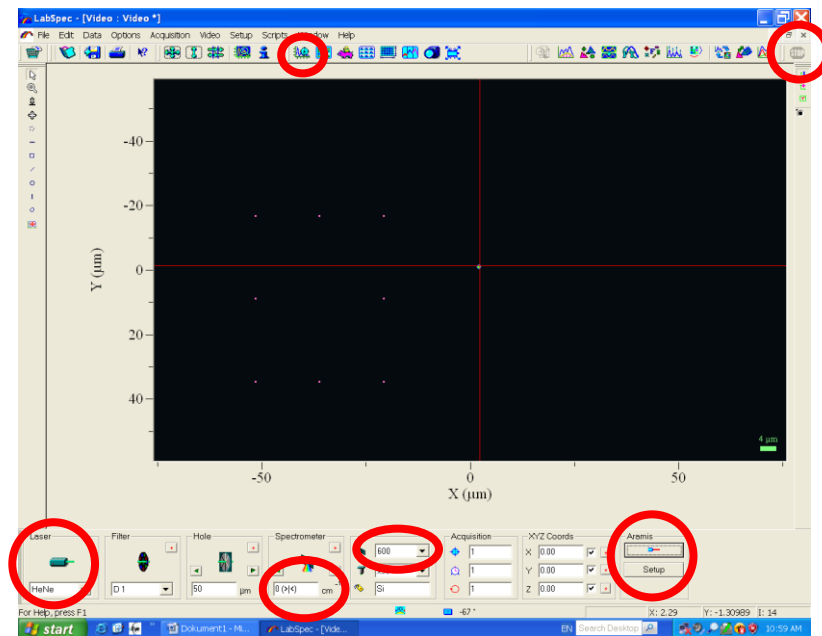


## UWAGA!

Należy bezwzględnie wyłączyć tryb pracy video podczas pomiaru widma. W przeciwnym razie może nastąpić uszkodzenie kamery video.

11. W celu rejestracji widma należy przejść do trybu pracy w czasie rzeczywistym (Real Time Domain - RTD). Przed przejściem do trybu RTD należy sprawdzić ustawienia w oknach dialogowych „menu ustawienia parametrów pomiaru” na dole ekranu (Zdjęcie 9):
  - Laser - wybrać laser He-Ne;
  - Filter – ustalić D1;
  - Hole – wpisać 50um i nacisnąć enter;
  - Siatka – wybrać 600l/mm;
  - Obiektyw – wybrać x50 LWD;
  - Acquisition – w kolejnych oknach wpisać parametry pomiaru widma: 1,1,1 lub 1,1,10;

- Upewnić się, że dla XYZ Coords we wszystkich oknach wpisane są wartości 0, 0, 0;
- Włączyć laser przez uaktywnienie okna Aramis;
- Spectrometer – wpisać wartość  $0 \text{ cm}^{-1}$ .



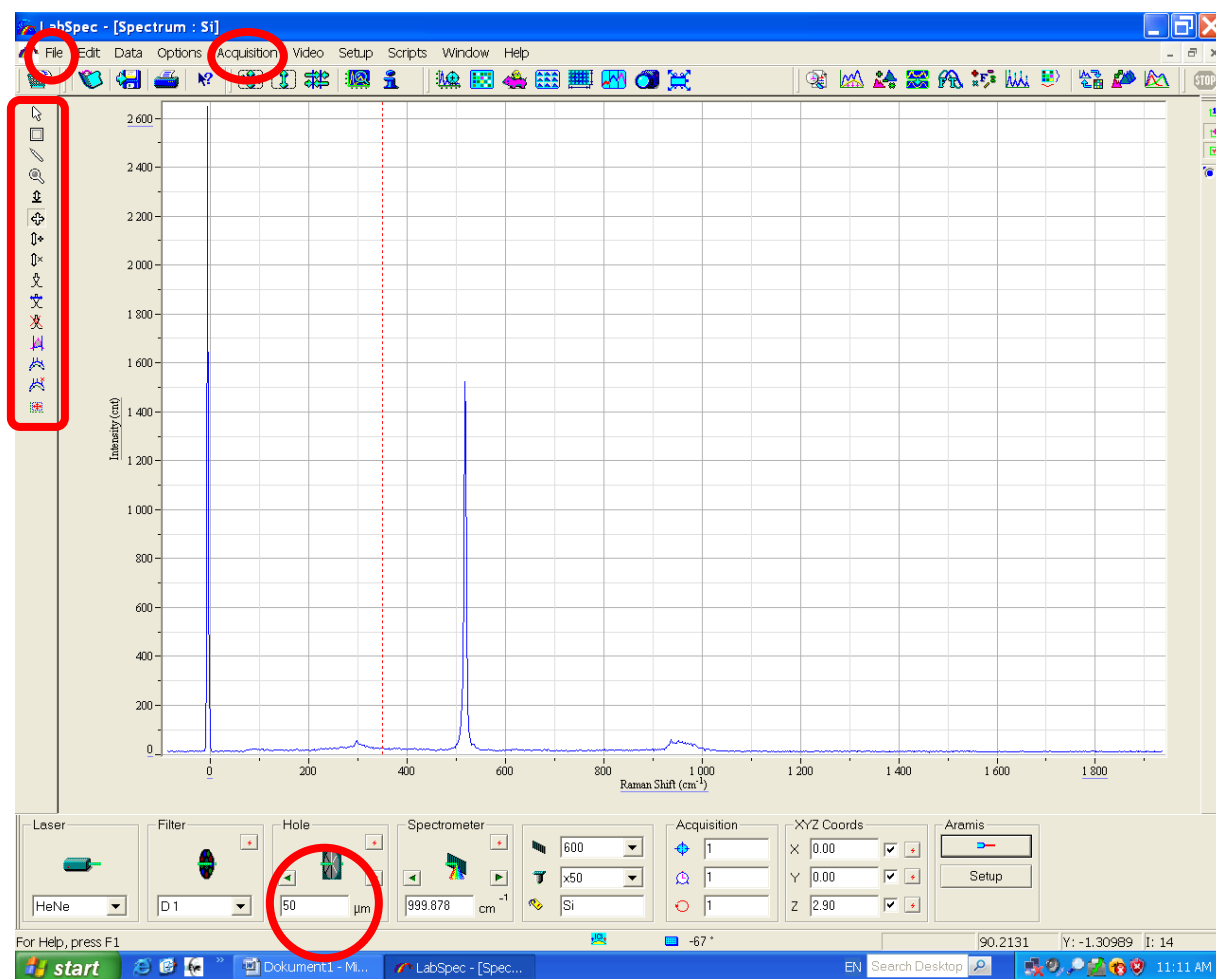
Zdjęcie 9. Wybór parametrów przy rejestracji widma w czasie rzeczywistym RTD. Zaznaczono: ikony trybu RTD i Stop (u góry) oraz ikony wybór lasera, zerowego rzędu widma, siatki, włączania – wyłączania lasera (na dole).

12. Włącz tryb RTD przez uaktywnienie ikony RTD na górze ekranu (Zdjęcie 9).

Jeśli przesunięcie linii na ekranie nie jest większe niż 1 nm przystąpić do dalszych pomiarów.

13. Wyłączyć pomiar przez wciśnięcie ikony Stop, ustalić w oknie Spectrometer wartość 1000, następnie powtórnie włączyć tryb RTD przez uaktywnienie ikony RTD na górze ekranu.

W celu uzyskania optymalnego sygnału skorzystać z menu ustawienia z lewej strony ekranu (Zdjęcie 10).



Zdjęcie 10. Przykładowe widmo Ramana. Zaznaczono: zapis widma (File), Acquisition i Menu ustawiania obrazu (u góry) oraz ikonę przestony mikroskopu (na dole).

14. Zarejestrować widma. W tym celu zapisać widma przez uaktywnienie zakładki „File” w menu głównym a następnie poprzez wybór opcji „Save as”.  
Zapisać widmo w dwóch plikach: jedno w formacie \*.ngs; drugie w formacie \*.txt (format txt nadaje się do obróbki przy pomocy programów Microcal Origin i MS Excel).
15. Wyłączyć spektrometr. W tym celu zamknąć otwór przestony mikroskopu okno „Hole” w menu pomiarowym. Z menu głównego w zakładce „Acquisition” uaktywnić opcję „Heat detector”. Odczekać aż temperatura detektora wzrośnie powyżej 0°C.
16. Wyłączyć komputer. Wyłączyć spektrometr (wyłącznikiem na listwie zasilającej).