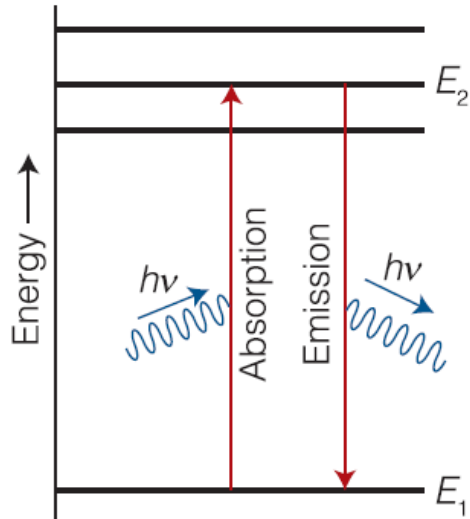


Οπτική φασματοσκοπία

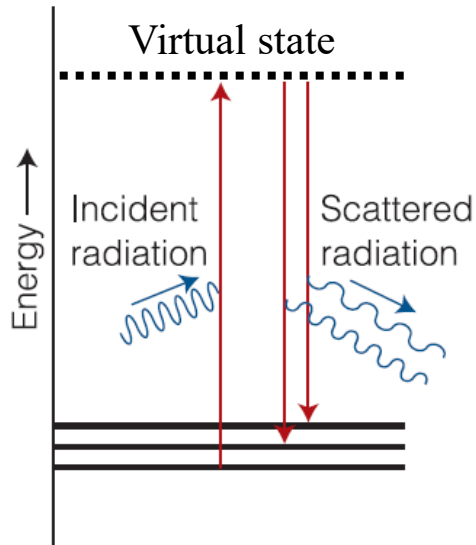


Είδη φασματοσκοπίας



Φασματοσκοπία εκπομπής, κατά την οποία ένα μόριο μεταβαίνει από μια κατάσταση **υψηλής** ενέργειας E_2 , σε μια κατάσταση **χαμηλής** ενέργειας E_1 με την ταυτόχρονη εκπομπή της περίσσειας ενέργειας ως ένα φωτόνιο

Φασματοσκοπία απορρόφησης, κατά την οποία η απορρόφηση ακτινοβολίας παρακολουθείται καθώς ή συχνότητά της μεταβάλλεται σε ένα συγκεκριμένο εύρος



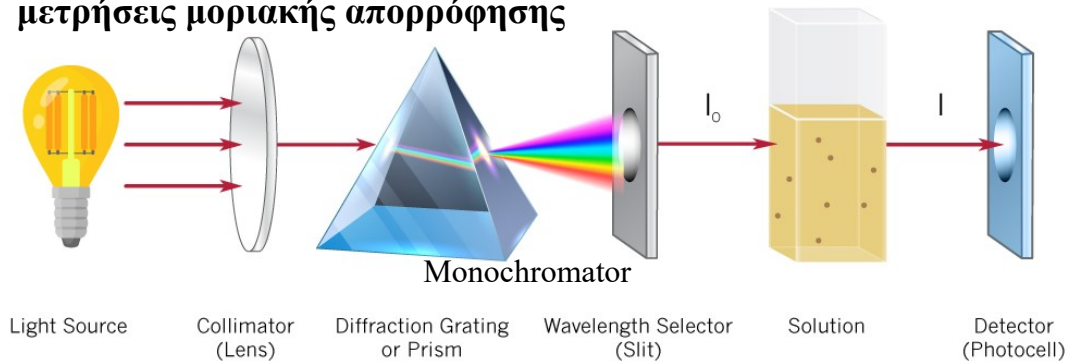
Φασματοσκοπία Raman, κατά την οποία μονοχρωματική (μιας συχνότητας) δέσμη λέιζερ περνά μέσα από το δείγμα και εξετάζονται οι **συχνότητες σκέδασης** της ακτινοβολίας

Σημαντικές σχέσεις

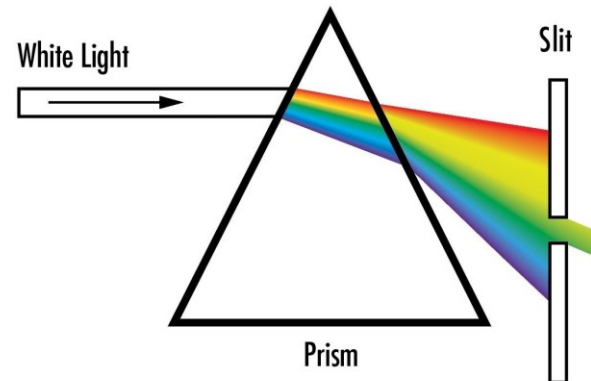
$$h\nu = |E_1 - E_2| \quad \text{Συνθήκη Bohr} \quad \lambda = \frac{c}{\nu} \quad \text{Σύνδεση μήκους κύματος - συχνότητας}$$
$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad \text{Ορισμός κυματάριθμου}$$



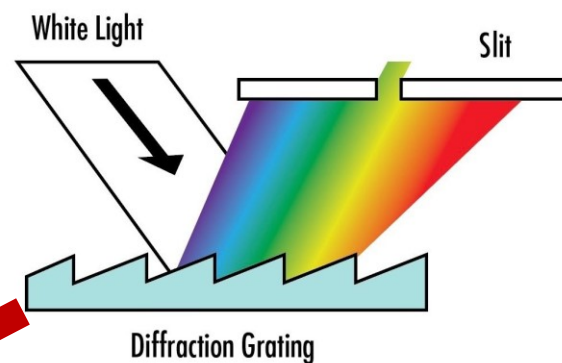
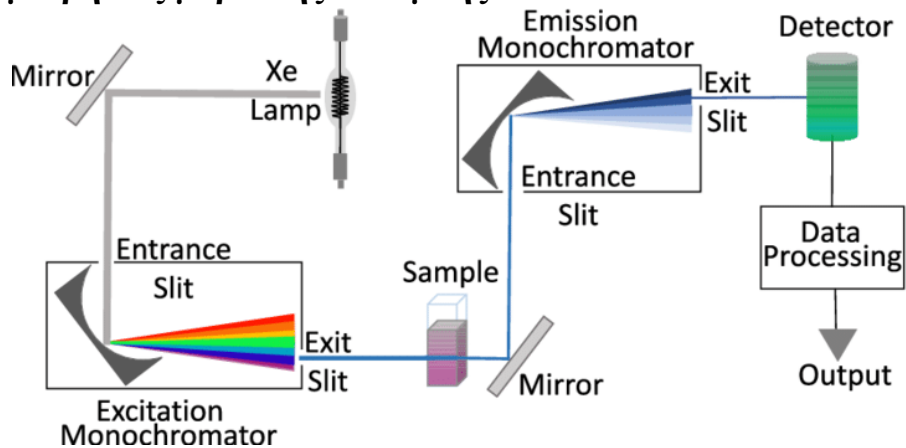
Φασματοφωτόμετρο για μετρήσεις μοριακής απορρόφησης



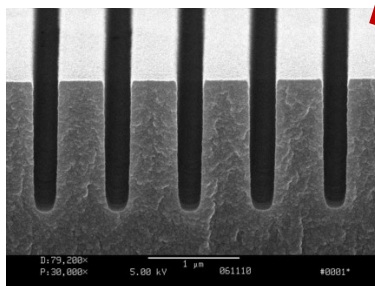
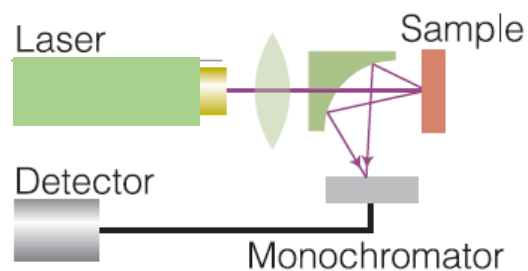
Τα δύο είδη μονοχρωμάτορα



Φασματοφωτόμετρο για μετρήσεις μοριακής εκπομπής



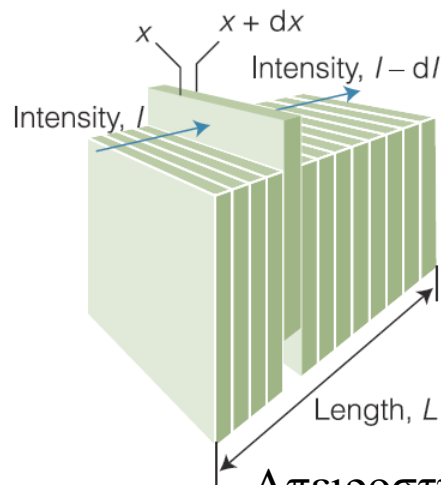
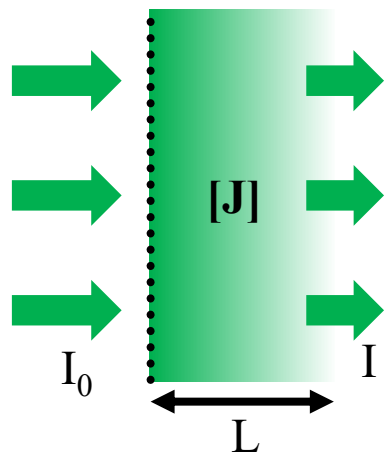
Φασματοσκοπία Raman



Το φράγμα περίθλασης αποτελείται από μια γυάλινη ή κεραμική πλάκα με χαραγές ανά ~1 μm που καλύπτεται από ένα λεπτό ανακλαστικό στρώμα αλουμινίου



Ο νόμος Beer-Lambert για την απορρόφηση ακτινοβολίας



? Ποια θα είναι η ένταση I της ακτινοβολίας όταν διέλθει από δείγμα πάχους L με συγκέντρωση απορροφητή $[J]$;

$dI \propto [J] I dx$ Απειροστή μεταβολή ένταση εξαιτίας μιας λεπτής φέτας πάχους dx

$dI = -\kappa [J] I dx$ κ : σταθερά αναλογίας το - «μπαίνει» διότι η ακτινοβολία μειώνεται ($dI < 0$)

$\frac{dI}{I} = -\kappa [J] dx$

$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\kappa \int_0^L [J] dx$ σταθερή $[J]$ $\rightarrow \ln \frac{I}{I_0} = -\kappa [J] L$ $\xrightarrow{\epsilon = \kappa / \ln 10}$ $\log \frac{I}{I_0} = -\epsilon [J] L$

$I = I_0 10^{-\epsilon [J] L}$ Beer-Lambert law

ϵ : μοριακή απορροφητικότητα



$$I = I_0 10^{-\epsilon[J]L}$$

Νόμος
Beer-Lambert

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Απορρόφηση
(absorbance)

$$T = \frac{I}{I_0}$$

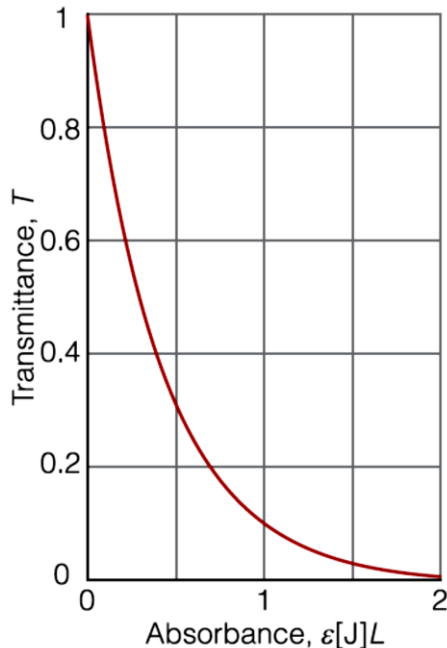
Διαπερατότητα
(transmittance)



$$A = \epsilon[J]L$$

$$A = -\log T$$

$$T = 10^{-\epsilon[J]L}$$



Μπορούμε να υπολογίσουμε τις συγκεντρώσεις δύο ουσιών σε ένα διάλυμα αν γνωρίζουμε τις τιμές ϵ ;



Για ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος λ , μπορούμε να γράψουμε για την συνολική απορρόφηση δύο ουσιών A και B ότι

$$A = A_A + A_B = \epsilon_A[A]L + \epsilon_B[B]L = (\epsilon_A[A] + \epsilon_B[B])L$$

Αν πραγματοποιήσουμε μετρήσεις της συνολικής απορρόφησης A_1 και A_2 για δύο μήκη κύματος 1 και 2 θα προκύψει ότι

$$A_1 = (\epsilon_{A1}[A] + \epsilon_{B1}[B])L$$

$$A_2 = (\epsilon_{A2}[A] + \epsilon_{B2}[B])L$$

Επιλύοντας το σύστημα ως προς $[A]$, $[B]$ υπολογίζουμε τις άγνωστες συγκεντρώσεις ως

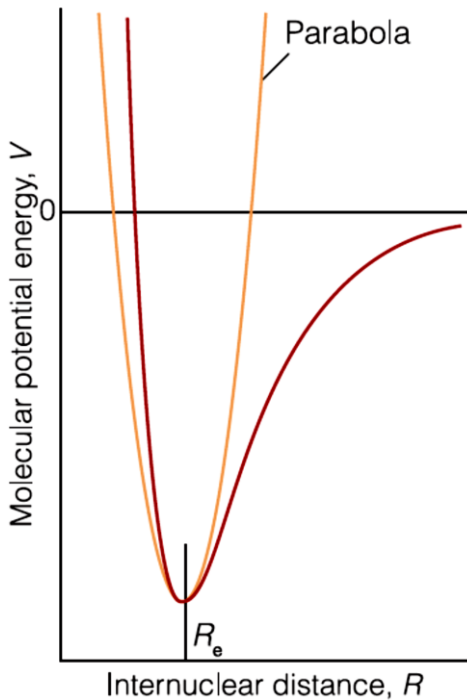
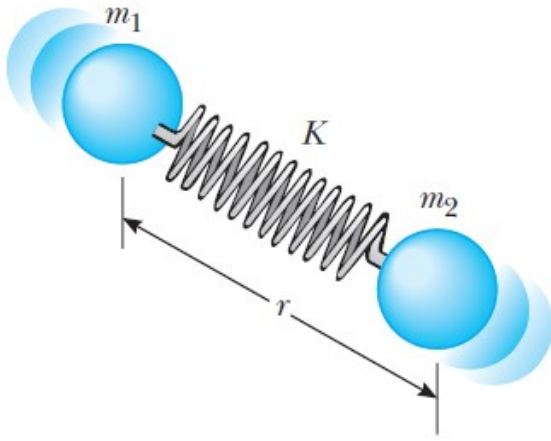
$$[A] = \frac{\epsilon_{B2}A_1 - \epsilon_{B1}A_2}{(\epsilon_{A1}\epsilon_{B2} - \epsilon_{A2}\epsilon_{B1})L} \quad [B] = \frac{\epsilon_{A1}A_2 - \epsilon_{A2}A_1}{(\epsilon_{A1}\epsilon_{B2} - \epsilon_{A2}\epsilon_{B1})L}$$

Το λ για το οποίο $\epsilon_1 = \epsilon_2$, ονομάζεται **ισοσβεστικό**

$$A^0 = \epsilon^0([A] + [B])L$$



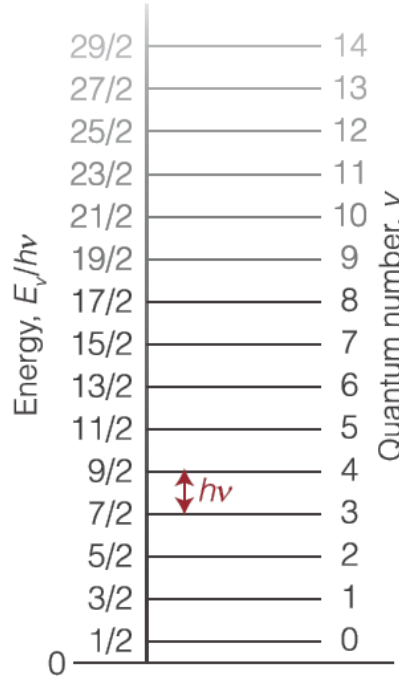
Μοριακές ταλαντώσεις



Εξίσωση
Schrödinger

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} + \frac{1}{2}k_f x^2 \psi = E\psi$$

Τα ενεργειακά επίπεδα του αρμονικού ταλαντωτή



$$E_v = (v + \frac{1}{2})h\nu \quad v = 0, 1, 2, \dots$$

where

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k_f}{\mu} \right)^{1/2}$$

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

(ανηγμένη μάζα)

Κανόνας επιλογής
 $\Delta v = \pm 1$ για χαμηλές
στάθμες (γιατί;)

Table 11.2 Fundamental Vibrational Frequencies and Effective Force Constants for Some Diatomic Molecules

Molecule	Frequency (Hz), $v = 0$ to $v = 1$	Force Constant (N/m)
HF	8.72×10^{13}	970
HCl	8.66×10^{13}	480
HBr	7.68×10^{13}	410
HI	6.69×10^{13}	320
CO	6.42×10^{13}	1860
NO	5.63×10^{13}	1530

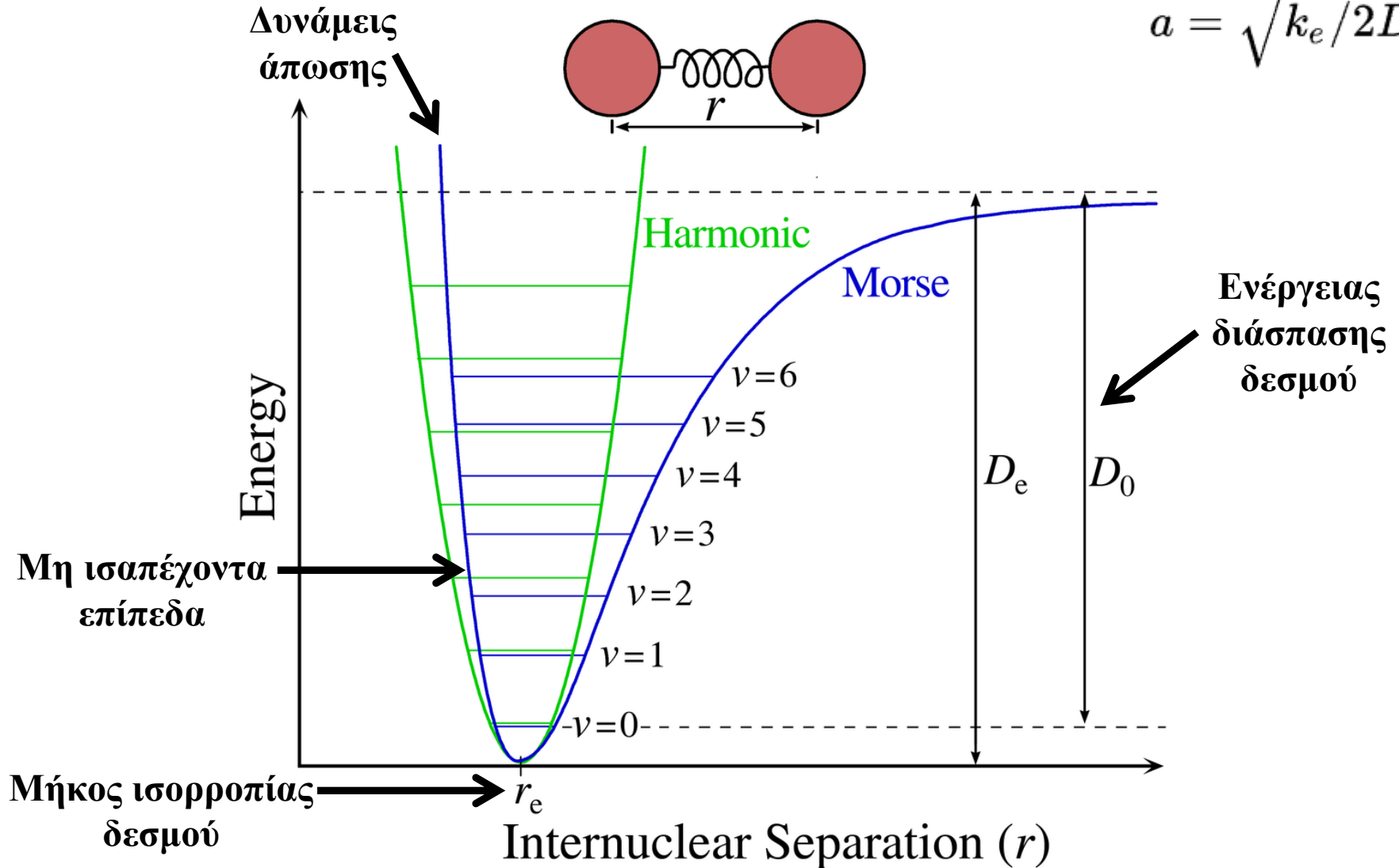
From G. M. Barrows, *The Structure of Molecules*, New York, W. A. Benjamin, 1963.



Μοριακό δυναμικό Morse

$$V(r) = D_e(1 - e^{-a(r-r_e)})^2$$

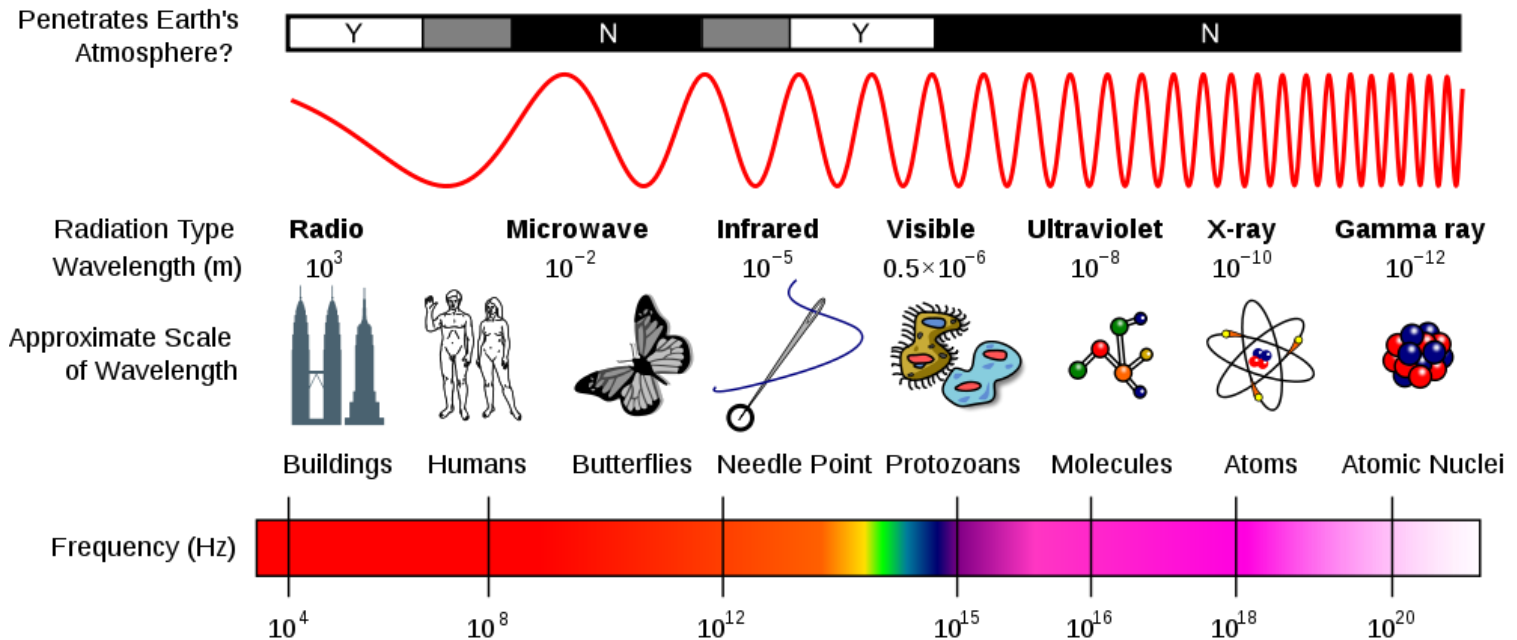
$$a = \sqrt{k_e/2D_e}$$



Δονητικές μεταβάσεις



Μια τυπική ενέργεια διέγερσης δόνησης του μορίου είναι της τάξης των 10^{-20} – 10^{-19} J (~ 0.1 eV), πράγμα που σημαίνει πως η συχνότητα του φωτονίου θα είναι της τάξης των 10^{13} – 10^{14} Hz, δηλαδή στην περιοχή του υπέρυθρου ($30 - 3000 \text{ cm}^{-1}$)



Για να παρατηρήσουμε το φάσμα υπέρυθρης απορρόφησης θα πρέπει το μόριο να μεταβάλλει την ηλεκτρική διπολική ροπή του κατά τη δόνηση. Ένα ομοπυρηνικό διατομικό μόριο είναι ανενεργό στο υπέρυθρο (π.χ., O_2 , N_2), ενώ ένα ετεροπυρηνικό είναι ενεργό στο υπέρυθρο (π.χ., CO_2 , H_2O)



Αριθμός κανονικών τρόπων
ταλάντωσης μορίων

for nonlinear molecules: $N_{\text{vib}} = 3N - 6$
for linear molecules: $N_{\text{vib}} = 3N - 5$

Spectroscopy



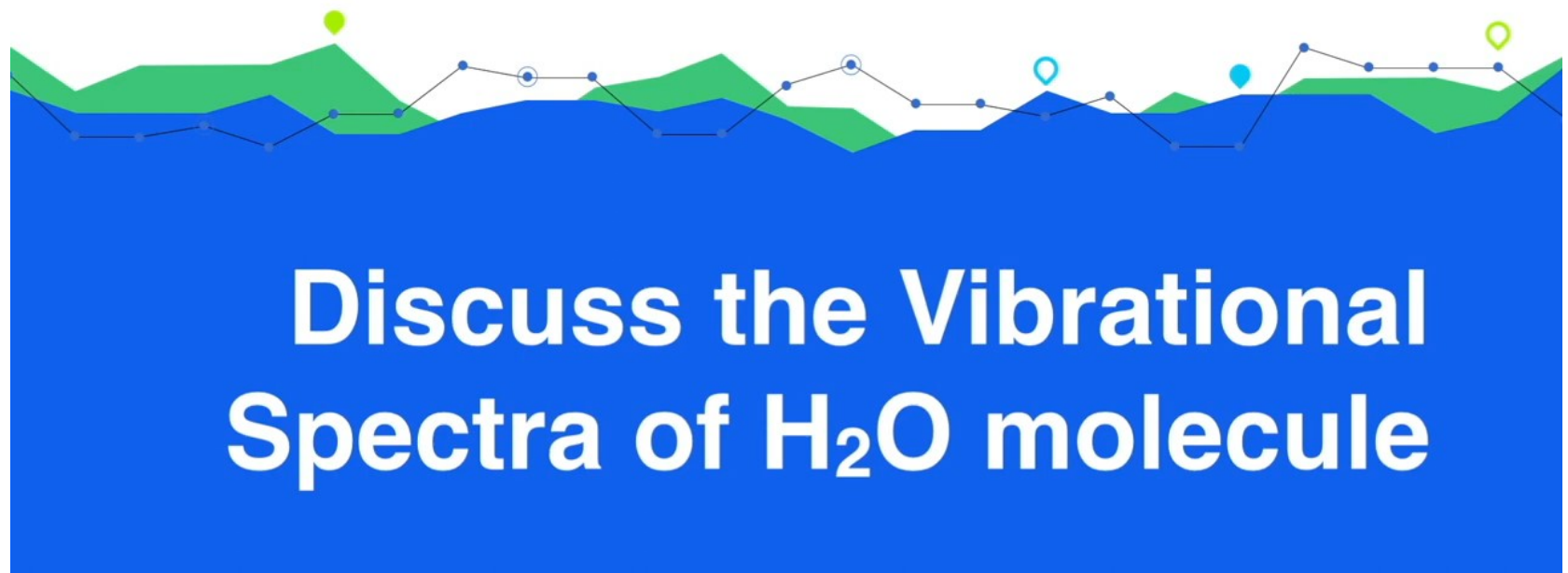
https://youtu.be/K6dSM_nDee8?list=PLiq1pYmhQkxiawe0g_TtwQ-m4CUbTZA2j



Αριθμός κανονικών τρόπων
ταλάντωσης μορίων

for nonlinear molecules: $N_{\text{vib}} = 3N - 6$
for linear molecules: $N_{\text{vib}} = 3N - 5$

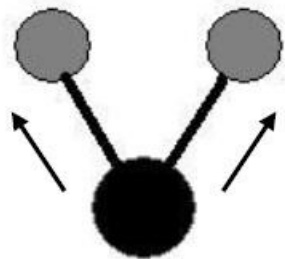
Spectroscopy



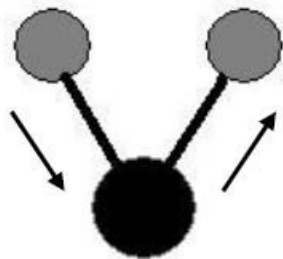
https://youtu.be/9FH9EDhsQvc?list=PLiq1pYmhQkxiawe0g_TtwQ-m4CUbTZA2j



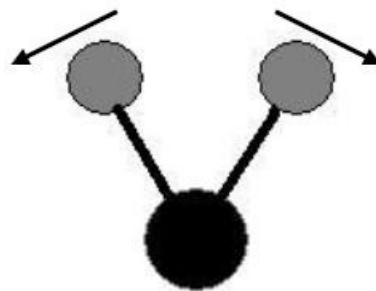
Κανονικοί τρόποι δόνησης μορίων



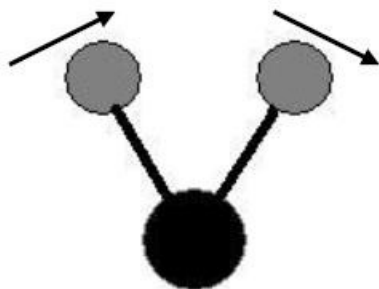
Symmetrical stretching
Moving together away from the Carbon atom



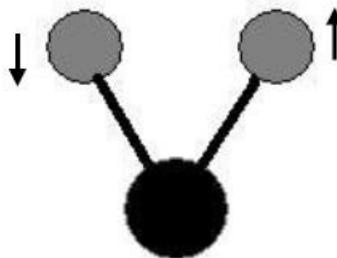
Anti-Symmetrical stretching
Opposing movement to/away from the Carbon atom



Scissoring
Moving apart perpendicular to the Carbon atom



Rocking
Moving together perpendicular to the Carbon atom



Twisting
Moving together in a 'Helicopter' fashion above the Carbon atom (Left H moves out from the page, right H moves into the page)

Table 12.1 Typical vibrational wavenumbers

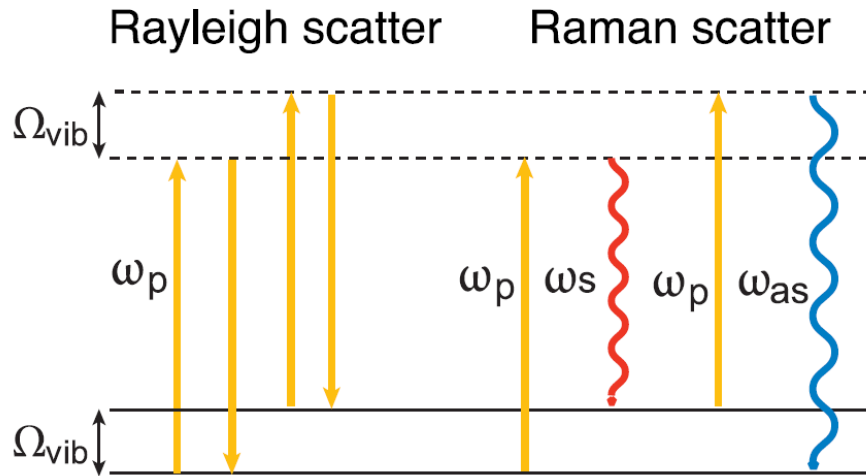
Vibration type	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$
C-H	2850–2960
C-H	1340–1465
C-C stretch, bend	700–1250
C=C stretch	1620–1680
C≡C stretch	2100–2260
O-H stretch	3590–3650
C=O stretch	1640–1780
C≡N stretch	2215–2275
N-H stretch	3200–3500
Hydrogen bonds	3200–3570



Μπορούν να συνδεθούν με την παρουσία **συγκεκριμένων βιολογικών μορίων** (π.χ., λιπίδια, πρωτεΐνες)



Φάσματοσκοπία Raman



Ισχύει ότι:

$$\omega_s = \omega_p - \Omega_{\text{vib}}$$

$$\omega_{\text{as}} = \omega_p + \Omega_{\text{vib}}$$

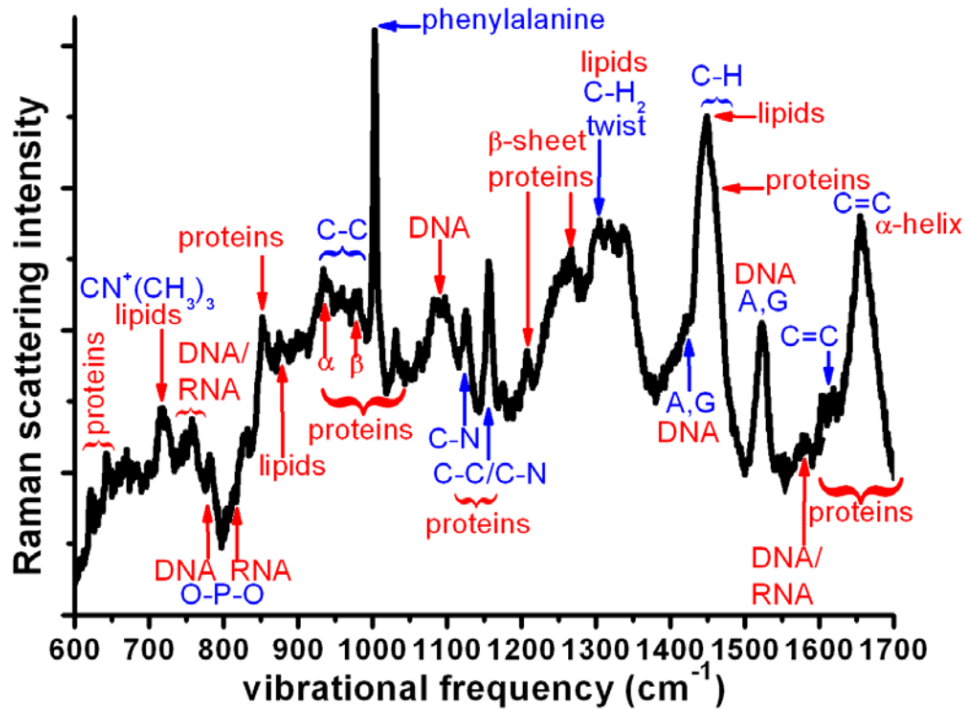


Συνεπώς, από τη μετατόπιση της συχνότητας του καταγραφόμενου φωτός σε σχέση με το προσπίπτον, μπορούμε να προσδιορίσουμε τις χαρακτηριστικές συχνότητες δόνησης του μορίου!

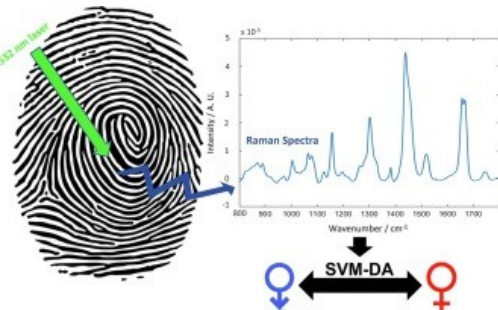
- Στο ενεργειακό διάγραμμα οι διακοπτόμενες γραμμές αναπαριστούν εικονικές στάθμες (virtual states), ενώ οι μη διακοπτόμενες τις δονητικές καταστάσεις του μορίου
- Ω_{vib} είναι η συχνότητα που αντιστοιχεί στη μετάβαση από τη θεμελιώδη στη διεγερμένη δονητική κατάσταση
- Στη σκέδαση Rayleigh, τα προσπίπτοντα φωτόνια ω_p (pump) σκεδάζονται ελαστικά διατηρώντας την αρχική τους ενέργεια (1 στα 10.000 φωτόνια)
- Στη σκέδαση Raman, ένα πολύ μικρό ποσοστό φωτονίων (1 στα 10.000.000) ανταλλάσσει ενέργεια με το μόριο και σκεδάζεται ανελαστικά
- Το φωτόνιο ω_p σκεδάζεται διεγείροντας το μόριο σε μια υψηλότερη δονητική στάθμη, με αποτέλεσμα την εκπομπή ενός φωτονίου χαμηλότερης ενέργειας ω_s (Stokes)
- Ένα ακόμα μικρότερο ποσοστό φωτονίων ω_{as} (anti-Stokes) θα σκεδαστεί σε υψηλότερες ενέργειες από το ω_p



Ερμηνεία φασμάτων Raman

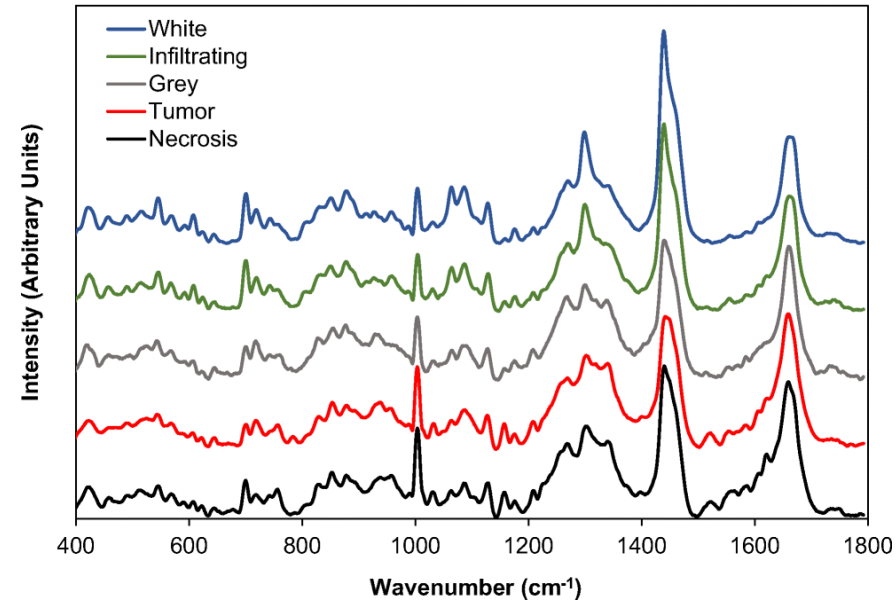


Unprocessed Raman spectrum of live MCF-7 breast cancer cells



Φάσμα Raman → “Δακτυλικό αποτύπωμα” ενός μορίου

Raman Spectra of Brain Tissue



Mean Raman spectra of interoperative brain tissue samples in the spectral range of 400–1800 cm⁻¹ deemed as normal, white matter, gray matter, tumor (GBM), infiltrating tumor, and necrosis

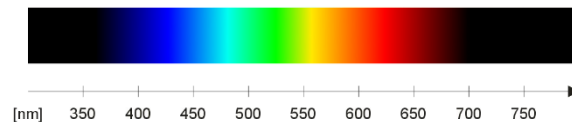


Το φαινόμενο του φθορισμού

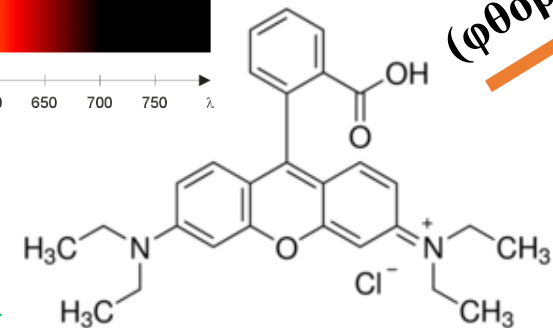


- Φθορισμός ονομάζεται η εκπομπή φωτός από μια ουσία που έχει απορροφήσει φως ή αλλου είδους ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.
- Στις περισσότερες περιπτώσεις που αφορούν βιολογικές παρατηρήσεις, το εκπεμπόμενο φως φθορισμού έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος, και άρα μικρότερη ενέργεια σε σχέση με την απορροφούμενη ακτινοβολία.

Εκπομπή φθορισμού από διάφορα διαλύματα μέσω διέγερσης με UV φως



Διέγερση
(532 nm)

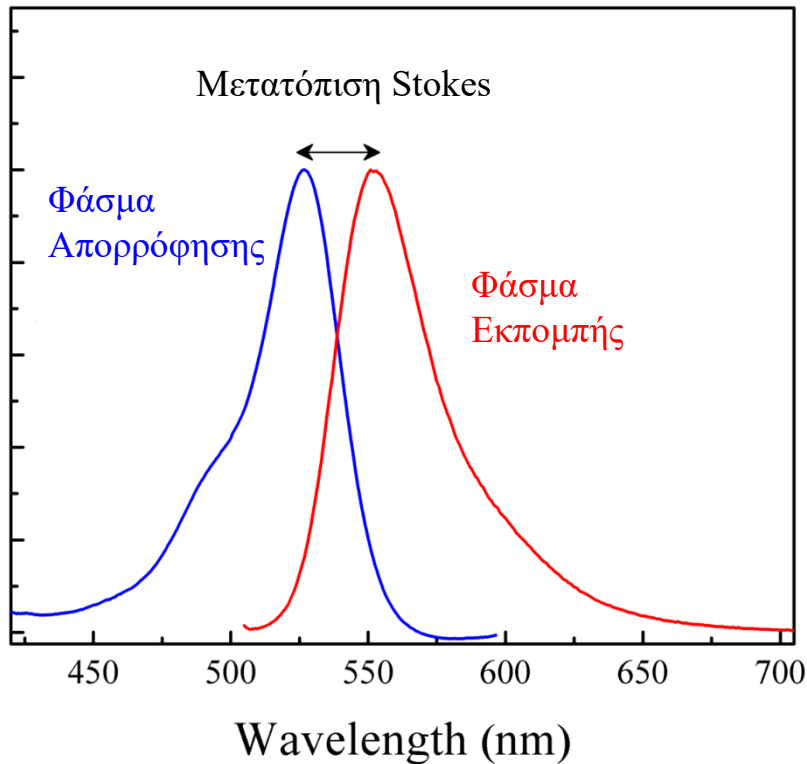


Εκπομπή
(φθορισμός)

Μόριο Ροδαμίνης Β



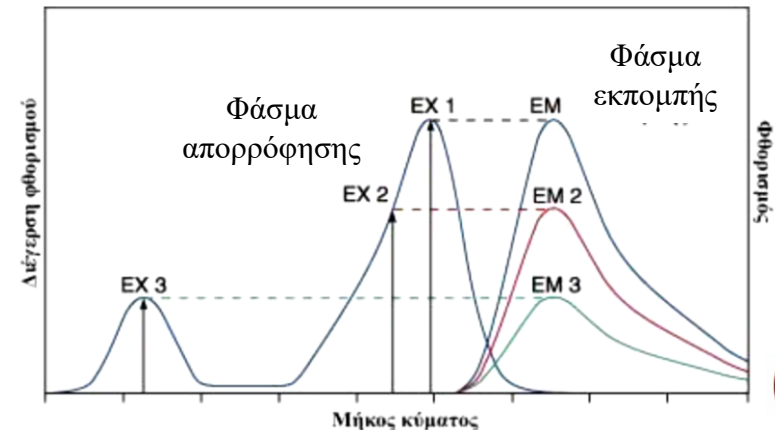
Μετατόπιση Stokes



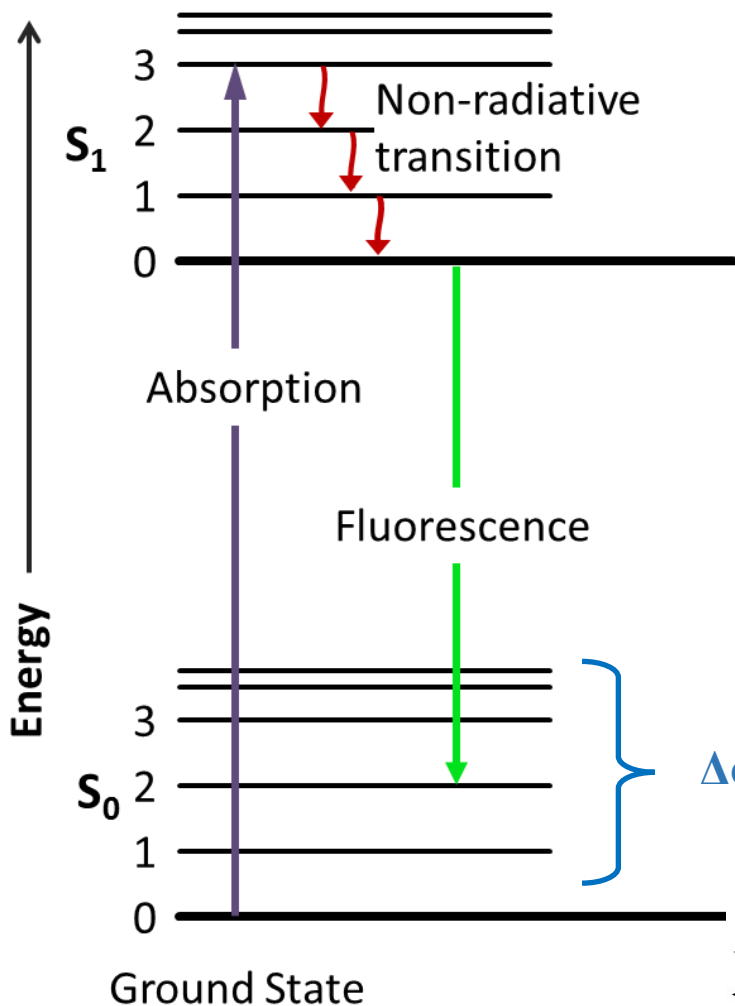
- Μετατόπιση Stokes ονομάζεται η διαφορά στα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού μιας ουσίας
- Το φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι σχεδόν κατοπτρικό συγκριτικά με το αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης
- Το σχήμα του φάσματος εκπομπής φθορισμού είναι ανεξάρτητο του μήκους κύματος διέγερσης
- Αντίθετα, η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης



Γιατί προκύπτει η ενεργειακή διαφορά μεταξύ φωτονίων φθορισμού και φωτονίων διέγερσης; Που χάνεται η ενέργεια;



Το διάγραμμα Jablonski για το φθορισμό



Χρόνος απορρόφησης:
 $\sim 1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s} \rightarrow 0.3 \mu\text{m}$

Χρόνος δονητικής αποδιέγερσης:
 $\sim 1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s} \rightarrow 0.3 \text{ mm}$

Χρόνος ηλεκτρονιακής αποδιέγερσης:
 $\sim 10 \text{ ns} = 10^{-8} \text{ s} \rightarrow 3 \text{ m}$

Δονητικές στάθμες



Μέρος της ενέργειας των φωτονίων διέγερσης μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω των μη ακτινοβολητικών διαδικασιών με αποτέλεσμα τα φωτόνια φθορισμού να έχουν μεγαλύτερα μήκη κύματος και μικρότερες ενέργειες (Stokes shift)

Κβαντική απόδοση φθοροφόρου:

Φωτόνια φθορισμού

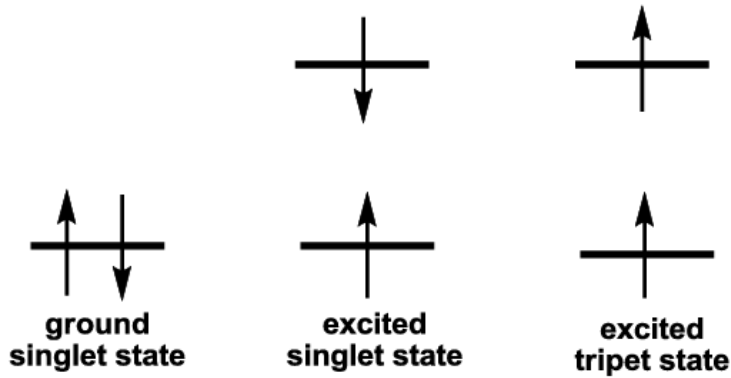
Φωτόνια απορρόφησης

Συνεπώς:

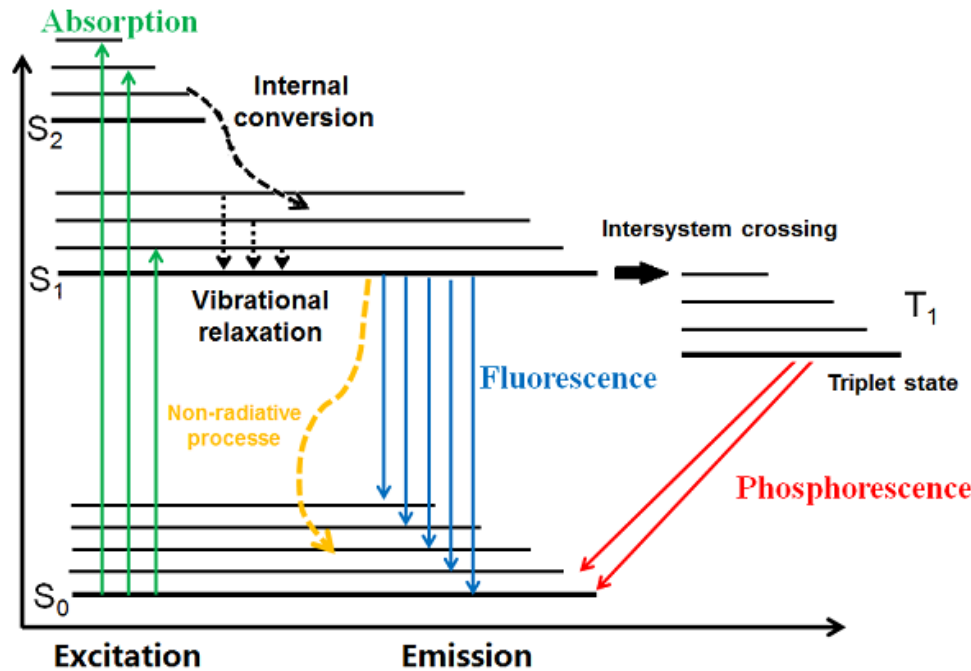
Η εκπομπή φθορισμού θα εξαρτάται α) από το συντελεστή απορρόφησης για συγκεκριμένο μήκος κύματος και β) τη κβαντική απόδοση



Φθορισμός και φωσφορισμός



- Η εσωτερική μεταπήδηση (Intersystem Crossing – ISC) είναι το πέρασμα από μια μονή σε μια τριπλή (triplet) κατάσταση (ή το αντίστροφο) μέσω της σύζευξης spin – τροχιάς (παρατηρείται σε βαριά άτομα όπως ο φώσφορος και το θείο)
- Η τριπλή κατάσταση δρα ως μια δεξαμενή ενέργειας που ακτινοβολεί με αργό ρυθμό διότι η επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση είναι **κβαντομηχανικά απαγορευμένη**



Immunofluorescence

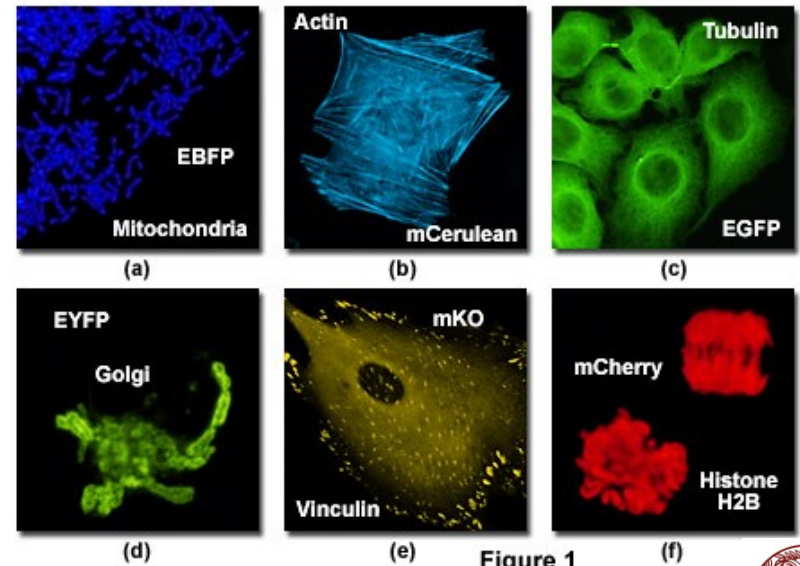
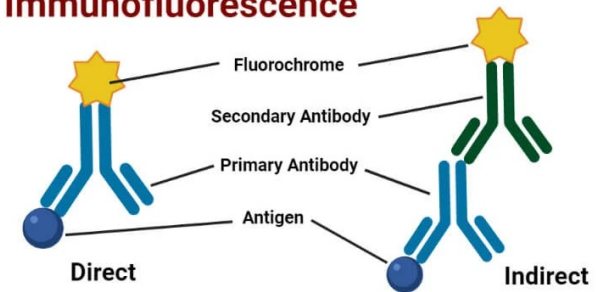
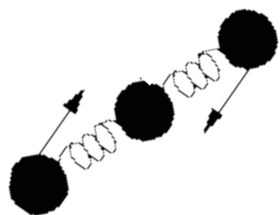
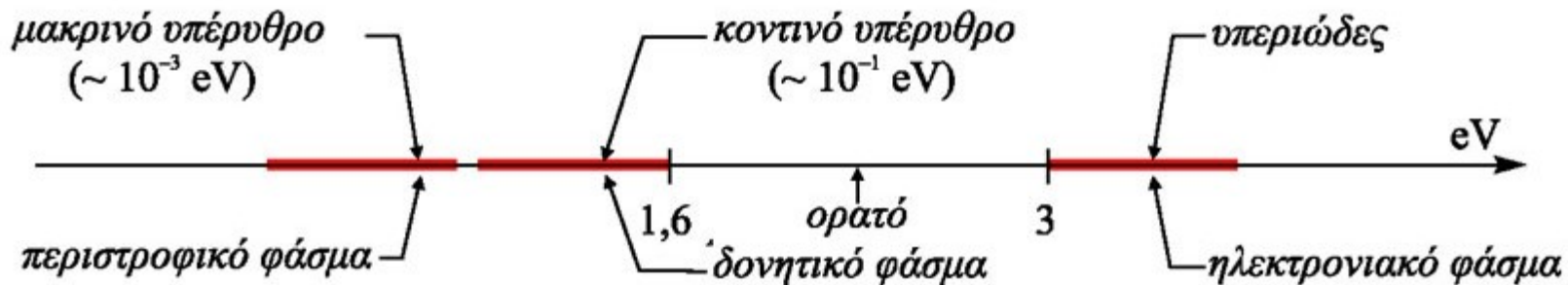


Figure 1



Τα τρία είδη μοριακών φασμάτων



Περιστροφή μορίου



Ταλάντωση μορίου



Διάσπαση μορίου

