

Laboratorium Fizykochemii Nowych Materiałów

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Semestr zimowy 2011/2012

Ćwiczenie nr 4

Badanie dystrybucji substancji czynnych w tabletkach leku przeciwbólowego techniką mapowania ramanowskiego

Prowadzący: dr Agata Królikowska

e-mail: akrol@chem.uw.edu.pl

ZJAWISKO ROZPRASZANIA RAYLEIGHA I RAMANA

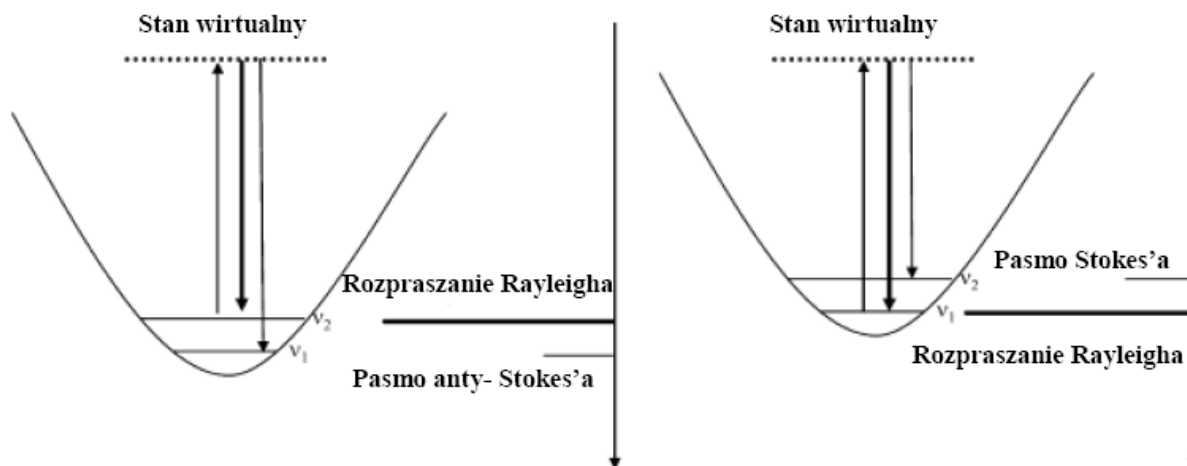
Gdy oświetlimy próbkę promieniowaniem monochromatycznym, część promieniowania zostanie pochłonięta, część zaś ulegnie rozproszeniu. Ten pierwszy proces nosi nazwę absorpcji i zachodzi z dużą wydajnością wówczas, gdy energia padającego fotonu jest dopasowana do różnicy między poziomami energetycznymi molekuł próbki. Z kolei rozpraszanie promieniowania może zachodzić na dwa sposoby:

- *elastycznie*, tzn. z zachowaniem energii padającego fotonu, tzw. **rozpraszanie Rayleigha** - dotyczy ono niewielkiego ułamka promieniowania, ok. **0.1%**,
- *nieelastycznie*, tzn. ze zmianą energii, tzw. **rozpraszanie Ramana** – zaledwie **1 na 10^6 lub 10^7** fotonów ulega temu procesowi, a promieniowanie rozproszone może mieć energię niższą (**rozpraszanie Stokesa**) lub wyższą (**rozpraszanie antystokesowskie**) niż promieniowanie padające.

Efekt ramanowski jest zjawiskiem dwukwantowym – oznacza to, że w jego powstawanie zaangażowane są dwa fotony: jeden ulega anihilacji, podczas gdy drugi zostaje wygenerowany i co istotne - procesów tych nie można rozdzielić. W tradycyjnym modelu rozpraszania ramanowskiego pojawienie się przejścia ramanowskiego tłumaczy się wzbudzeniem i deekscytacją „wirtualnego” stanu energetycznego molekuly, a powstające widmo jest konsekwencją wymiany energii między fotonem, a rozpraszającą cząsteczką. Przy rozpraszaniu Rayleigha mamy do czynienia ze zderzeniem sprężystym, podczas którego nie dochodzi do wymiany energii, dlatego częstotliwość promieniowania rozproszonego pozostaje niezmienną. Podczas zderzenia niesprężystego możliwa jest dwojaka sytuacja:

- *przekazanie energii z fotonu na molekułę* i w konsekwencji **zmniejszenie energii** (obniżona częstotliwość, większa długość fali) promieniowania rozproszonego (w porównaniu do padającego), zwanego **promieniowaniem stokesowskim**
- *przekazanie energii z molekuly do fotonu* i w konsekwencji **zwiększenie energii** (podwyższona częstotliwość, mniejsza długość fali) promieniowania rozproszonego (w porównaniu do padającego), zwanego **promieniowaniem antystokesowskim**

Jako że podczas rozpraszania cząsteczka wykonuje jednocześnie rotacje i oscylacje, zatem właśnie zmiana tego typu energii będzie obserwowalna w widmie ramanowskim. Tutaj skupimy się jedynie na krótkim omówieniu mechanizmu powstawania widma oscylacyjnego Ramana. Schemat przejść energetycznych odpowiedzialnych za powstawanie składowej



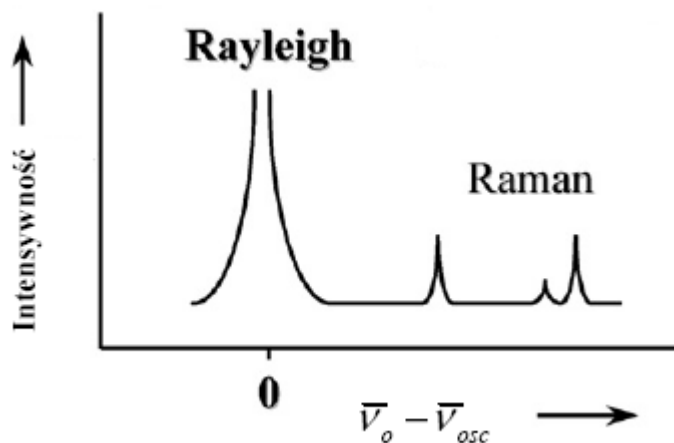
Rys. 1

Schematyczne przedstawienie elastycznego (Rayleigha) i nieelastycznego (po prawej stokesowskiego i po lewej : antystokesowskiego) rozpraszania na pojedynczym poziomie oscylacyjnym [1].

stokesowskiej i antystokesowskiej w oscylacyjnym widmie Ramana jest przedstawiony na Rys. 1. Jak widać, różnica energii fotonu wzbudzającego (oznaczymy ją jako $h\nu_0$, gdzie h jest stałą Plancka, a ν_0 częstotliwością promieniowania wzbudzającego) i obu rozpraszanych fotonów jest taka sama, równa energii oscylacji cząsteczki $h\nu_{osc}$ (gdzie ν_{osc} odpowiada różnicy poziomów energetycznych $\nu_2 - \nu_1$) na Rys. 1. W widmie ramanowskim pojawiają zatem pasma o częstotliwości $\nu_0 - \nu_{osc}$, nazywane **pasмами stokesowskimi** oraz pasma o częstotliwości $\nu_0 + \nu_{osc}$, nazywane pasmami **antystokesowskimi**. Jak wspomniano we wstępie, intensywność promieniowania rozproszonego ramanowsko jest około 6-7 rzędów mniejsza niż intensywność promieniowania wzbudzającego. Ponadto obsadzenie poziomów oscylacyjnych, wynikające z rozkładu Boltzmanna sprawia, że w temperaturze pokojowej bardziej intensywne są pasma stokesowskie:

$$\frac{I_{Stokes}}{I_{anti-Stokes}} = \frac{(\nu_0 - \nu_{osc})^4}{(\nu_0 + \nu_{osc})^4} \exp\left(\frac{h\nu}{kT}\right)$$

Dlatego widma ramanowskie są zazwyczaj mierzone w obszarze przesunięcia stokesowskiego i przedstawiane w skali względnych wartości liczb falowych (zdefiniowanych jako $\bar{\nu} = c/\nu$, gdzie c - prędkość światła w próżni), której zero odpowiada rozpraszaniu Rayleigha (zobacz schemat na Rys. 2).



Rys. 2

Schematyczna prezentacja widma Ramana pokazująca pasmo Rayleigha oraz obszar stokesowski [1].

Aby jakiegokolwiek pasmo było dozwolone w widmie, musi mieć ono niezerowy moment przejścia. W przypadku widm ramanowskich decyduje o tym *zmiana tensora polaryzowalności podczas przejścia ze stanu oscylacyjnego n do m* :

$$\alpha_{nm} = \langle \Psi_n | \hat{\alpha} | \Psi_m \rangle \neq 0,$$

gdzie α_{nm} jest tensorem polaryzowalności, Ψ_n i Ψ_m funkcjami falowymi opisującymi odpowiednio stany oscylacyjne n i m , a $\hat{\alpha}$ jest operatorem polaryzowalności. Z kolei o intensywności pasma ramanowskiego (I) decydują intensywność promieniowania wzbudzającego (I_0), częstość promieniowania wzbudzającego w czwartej potęgę oraz kwadrat momentu przejścia:

$$I \propto I_0 (\nu_0 \pm \nu_{osc})^4 \cdot |\alpha_{nm}|^2$$

LASERY JAKO ŹRÓDŁO WZBUDZENIA W SPEKTROSKOPII RAMANA

Ze względu na niski przekrój czynny większości molekuł na rozpraszanie ramanowskie, spektroskopia Ramana zyskała popularność dopiero w momencie, gdy zaczęto stosować lasery jako źródło promieniowania wzbudzającego. Promieniowanie laserowe cechuje:

- **znaczna intensywność** (duża moc wiązki),
- **monochromatyczność** - niemożliwe jest uzyskanie ściśle zdefiniowanej częstotliwości, ale szerokość spektralna wiązki laserowej ($\Delta\nu$) jest bardzo wąska,

- **koherentność** (spójność):
 - a) *przestrzenna* - fale elektromagnetyczne są zgodne w fazie w obrębie poprzecznego przekroju wiązki,
 - b) *czasowa* - fale elektromagnetyczne są zgodne w fazie wzdłuż całej długości wiązki,
- **wysoka kierunkowość** - możliwość wysłania wiązki promieniowania na dużą odległość z minimalną zmianą jej rozmiaru (mała rozbieżność kątowna),
- **wysoki stopień kolimacji** – mała rozbieżność wiązki, możliwość silnego jej skupienia.

Powyższe cechy promieniowania laserowego, a zwłaszcza duża moc wiązki uczyniły je atrakcyjnym źródłem wzbudzania przejść ramanowskich, których intensywność jest wprost proporcjonalna do intensywności promieniowania wzbudzającego. Powszechnie stosowane są lasery o **akcji ciągłej** (CW, z ang. *continuous wave*). Używane są również **lasery impulsowe**, zdolne do generacji impulsów o bardzo dużej mocy oraz krótkim czasie trwania (nawet femtosekundy), które znajdują zastosowanie w pomiarach spektroskopii rozdzielczej w czasie, dającej możliwość śledzenia ultraszybkich procesów chemicznych, fizycznych i biologicznych.

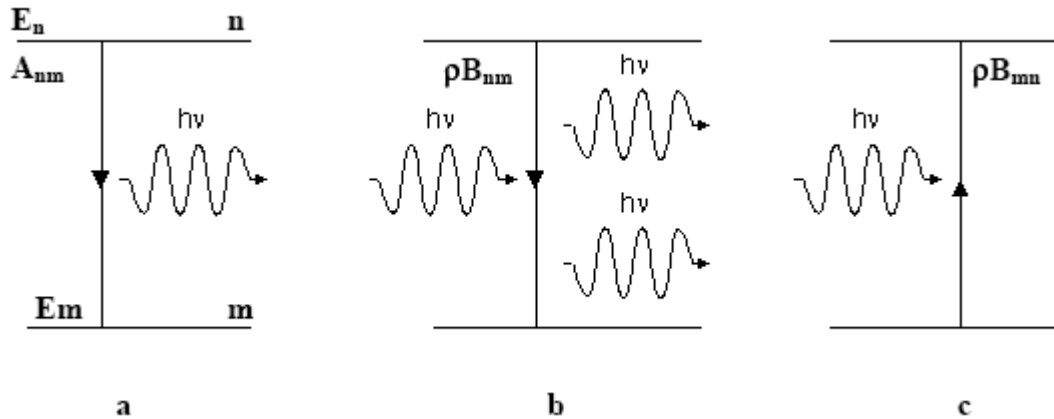
Nazwa laser pochodzi od akronimu ***light amplification by stimulated emission of radiation***, czyli wzmocnienie światła przez wymuszoną emisję promieniowania. Aby zrozumieć na czym polega emisja wymuszona, rozważmy trzy procesy: emisję spontaniczną i emisję oraz absorpcję wymuszoną, zachodzące między poziomami n i m o energii E_n i E_m .

Emisja spontaniczna (patrz Rys. 3a) to samorzutne przejście molekuly ze stanu wyższego do stanu niższego połączone z emisją fotonu $h\nu$ o energii odpowiadającej różnicy $E_n - E_m$. Prawdopodobieństwo powrotu z poziomu n na m z równoczesnym wyemitowaniem fotonu o takiej samej energii jaka została zaabsorbowana jest proporcjonalne do współczynnika Einsteina A_{nm} .

Emisja wymuszona (patrz Rys. 3b) - przejście molekuly ze stanu wyższego (n) do stanu niższego (m), połączone z emisją fotonu pod wpływem padającego promieniowania. Wyemitowane zostaje promieniowanie o tych samych właściwościach, które ma promieniowanie wymuszające (*jednakową częstość, fazę, płaszczyznę polaryzacji i kierunek*

rozchodzenia). Prawdopodobieństwo emisji wymuszonej zależy od współczynnika Einsteina B_{nm} oraz od gęstości promieniowania padającego (ρ).

Absorpcja wymuszona (patrz Rys. 3c) - odpowiada przejściu molekuly z niższego stanu energetycznego (m) do wyższego (n) z pochłonięciem fotonu, a molekula przez pewien czas pozostaje w tym stanie wzbudzonym. Prawdopodobieństwo absorpcji wymuszonej zależy od współczynnika Einsteina B_{mn} oraz od gęstości promieniowania padającego (ρ).



Rys. 3

Schemat ilustrujący procesy:

- a) emisji spontanicznej*
- b) emisji wymuszonej*
- c) absorpcji wymuszonej*

Obok strzałek naniesiono od czego zależy prawdopodobieństwo danego procesu.

Prawdopodobieństwo emisji wymuszonej równa się prawdopodobieństwu absorpcji wymuszonej, zatem:

$$B_{nm} = B_{mn},$$

a co za tym idzie, dla ośrodków o dużym współczynniku absorpcji można się również spodziewać dużej emisji wymuszonej.

Z kolei dla emisji spontanicznej i wymuszonej spełniona jest relacja:

$$\frac{A_{nm}}{B_{nm}} = \frac{\omega^3 \hbar}{\pi c^3},$$

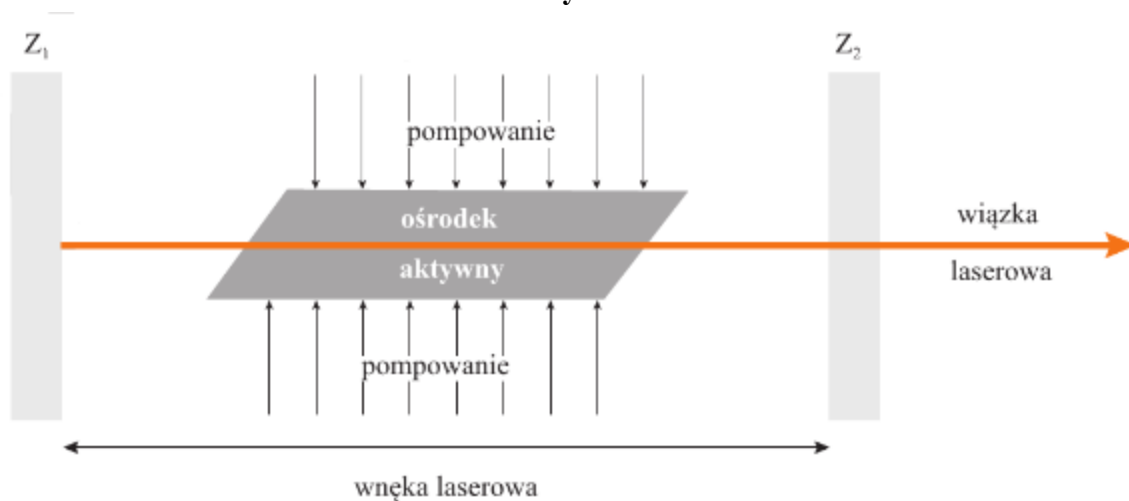
(gdzie $\omega = 2\pi\nu$, $\hbar = h/2\pi$, zaś c - prędkość światła w próżni) czyli w ośrodku, w którym nie ma emisji spontanicznej, nie ma też wymuszonej.

Zasada działania lasera opiera się na wykorzystaniu dwóch zjawisk: **emisji wymuszonej** oraz **rezonansu optycznego**. Gdy wiązkę promieniowania o długości fali λ wprowadzimy pomiędzy dwa zwierciadła Z_1 i Z_2 odległe o L , to w takim rezonatorze może powstać fala stojąca, o ile długość rezonatora jest całkowitą wielokrotnością połowy długości fali:

$$L = n \frac{\lambda}{2}, \text{ gdzie } n \text{ jest liczbą całkowitą, dodatnią.}$$

Schemat ideowy lasera jest pokazany na Rys. 4. Pomiedzy **zwierciadłami Z_1 i Z_2** umieszczamy **ośrodek aktywny** (inaczej **czynny**), tj. substancję, dla której będą zachodzić procesy emisji spontanicznej i wymuszonej. Aby **emisja wymuszona** zachodziła z dużą wydajnością, niezbędne jest doprowadzenie do **inwersji obsadzeń** ośrodka aktywnego, tzn. zaburzenia rozkładu boltzmannowskiego tak, by liczba molekuł w wyższym stanie energetycznym była większa niż w niższym. Inwersja obsadzeń jest realizowana za pomocą energii dostarczanej z zewnątrz, czyli tzw. **pompowania optycznego**. Obszar między dwoma zwierciadłami nosi nazwę **wnęki laserowej** lub **optycznej**. Z_1 jest zwierciadłem **prawie nieprzepuszczalnym** dla promieniowania (współczynnik odbicia $R > 99\%$), Z_2 jest **częściowo przepuszczalne** ($90\% < R < 99\%$), co pozwala wydostać się wygenerowanej wiązce laserowej poza wnękę. Ośrodek czynny i zwierciadła (**rezonator optyczny**) stanowią układ laserowy.

Rys. 4



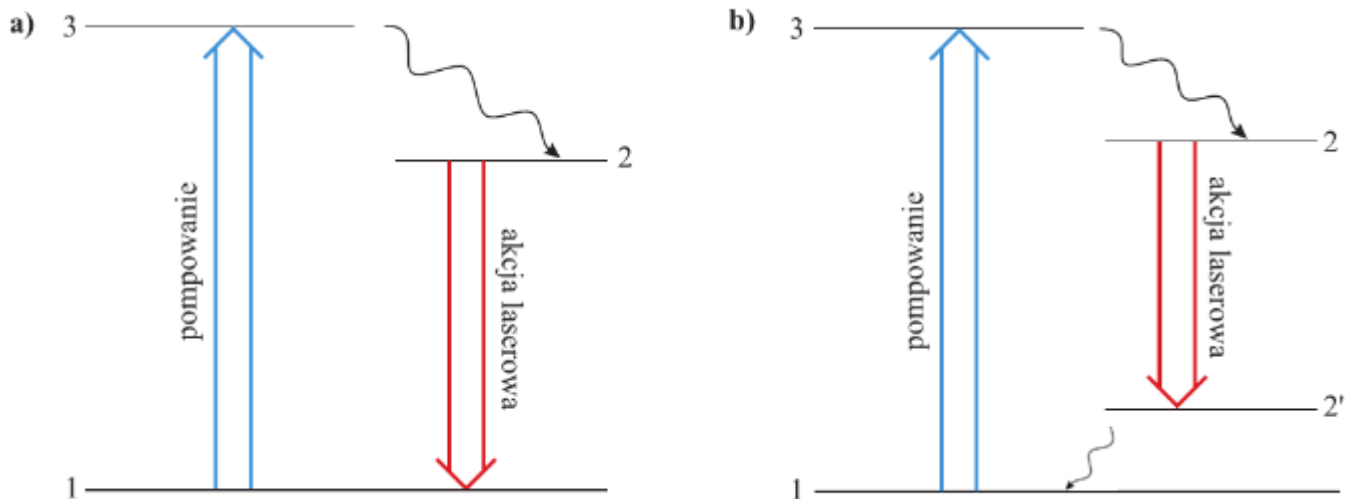
Schemat ilustrujący kluczowe elementy składowe lasera [2]

Dla układu dwupoziomowego stosunek obsadzeń poziomu wyższego do niższego w równowadze termicznej jest dany wzorem:

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{1}{\exp(\Delta E / k_B T) + 1},$$

gdzie N_1 i N_2 są liczbą atomów/molekuł na jednostkę objętości odpowiednio w stanie podstawowym i wzbudzonym, ΔE różnicą między tymi poziomami, T temperaturą, a k_B oznacza stałą Boltzmanna. Z powyższego równania wynika, że nie jest praktycznie możliwe uzyskanie inwersji obsadzeń poprzez ogrzewanie materiału czy też wzbudzanie układu promieniowaniem niespójnym, gdyż w najlepszym razie możemy doprowadzić do wyrównania obsadzeń, a co za tym idzie tyle samo fotonów jest emitowanych, co absorbowanych. Dlatego w praktyce inwersję obsadzeń realizuje się wykorzystując układy trój- lub czteropoziomowe (patrz Rys. 5). W układzie trójpoziomowym (Rys. 5a) układ jest wzbudzany ze stanu 1 do stanu przejściowego 3, z którego następuje przejście bezpromieniste do metastabilnego stanu 2, z którego wreszcie następuje przejście promieniste do stanu 1. To ostatnie przejście ($2 \rightarrow 1$) jest przejściem promienistym, odpowiedzialnym za **akcję laserową**. Przejście $1 \rightarrow 3$ jest indukowane zewnątrz (błyskiem światła, wyładowaniem elektrycznym w Xe lub światłem innego lasera) i proces ten nazywa się **pompowaniem optycznym**. **Inwersja obsadzeń** zachodzi między stanem 2 a 1, dzięki temu, że **stan 2 jest metastabilny**, tzn. molekuly zostają w nim spulapkowane na czas rzędu mikro-, a nawet milisekund. W układzie czteropoziomowym (Rys. 5b) inwersja obsadzeń jest uzyskiwana dzięki zmniejszeniu obsadzenia stanu niższego, na który przechodzi cząsteczka po wyemitowaniu promieniowania laserowego. W układzie tym **pompowanie** zachodzi między poziomem 1 a 3, następnie zachodzi **przejście bezpromieniste do metastabilnego stanu 2**, z którego zachodzi **akcja laserowa do również metastabilnego poziomu 2'**. Ze stanu 2' ma miejsce kolejne **przejście bezpromieniste z powrotem do stanu 1**. Inwersja obsadzeń między poziomem 2 a 2' jest możliwa dzięki temu, że stan 2' początkowo nie jest w ogóle obsadzony, więc każde obsadzenie stanu 2 prowadzi do inwersji obsadzeń. Przejście bezpromieniste $2' \rightarrow 1$ utrzymuje stan 2' w stanie nieobsadzonym. Jeśli stan 2 jest również metastabilny, to układ nie wymaga silnego pompowania.

Aby rezonator optyczny stał się laserem, wzmocnienie spowodowane emisją wymuszoną musi rekompensować straty wynikające z absorpcji, odbicia, rozpraszania, dyfrakcji, grzania ośrodka etc. Rolą pompowania jest zatem wywołanie inwersji obsadzeń, która zainicjuje akcję



Rys. 5

Schemat poziomów energetycznych w laserze:

a) trójpoziomowym

b) czteropoziomowym

Liniami falistymi oznaczono przejścia bezpromieniste [2]

laserową. Wzmocnieniu ulegną fale rozchodzące się wzdłuż osi rezonatora, pozostałe ulegną wygaszeniu. Zwielokrotnione odbicie od zwierciadeł wywoła efekt sprzężenia zwrotnego, gdyż każde przejście przez ośrodek aktywny będzie wzmacniało wiązkę. Ośrodkiem czynnym lasera może być:

- **ciało stałe** – pojedynczy kryształ lub szkło; np.: laser rubinowy ($\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{Cr}^{3+}$; 694 nm), neodymowy (szkło z domieszką jonów Nd^{3+} lub granat glinowo-itrowy - Nd-YAG, 1064 nm), tytanowo-szafirowy ($\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$, 650 -1100 nm),
- **gaz** (zjonizowany, ale znane są także atomowe lub molekularne lasery) - np. He-Ne (633nm), Ar/Ar+ (488 i 514.5 nm) , laser CO_2 (9.2 do 10.8 μm),
- **ciecz** - lasery barwnikowe wykorzystujące roztwory ciekłych barwników organicznych, np. rodamina 6G w metanolu.

Ponadto lasery mogą wykorzystywać:

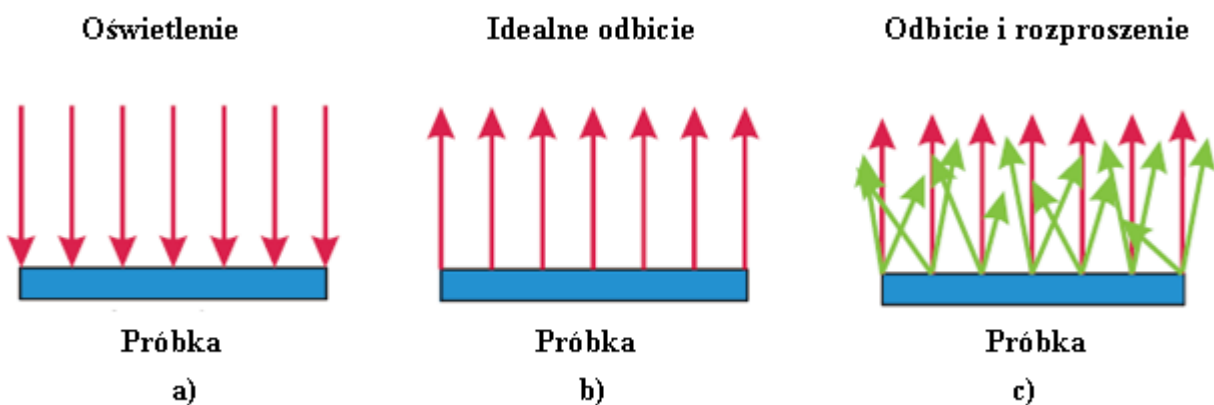
- **reakcję chemiczną** – np. fotoliza Cl_2 w mieszaninie z H_2 , prowadząca do powstania atomu Cl, atakującego cząsteczkę H_2 , z wytworzeniem HCl i atomu H, który z kolei atakuje cząsteczkę Cl_2 i powstaje oscylacyjnie wzbudzone, „gorące” HCl^* ; to utworzenie nowych cząsteczek HCl prowadzi do nierównomiernego obsadzenia poziomów oscylacyjnych – inwersji obsadzeń,

- **półprzewodniki** - rekombinacji „dziury” i elektronu w złączu typu p-n towarzyszy emisja promieniowania , np. GaAs.

BUDOWA SPEKTROMETRU RAMANOWSKIEGO I IDEA MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

Lasery stanowią jedyne źródła stabilnego promieniowania, stosowanego do wzbudzenia widma ramanowskiego. W tym opracowaniu skupimy się na opisie mikroskopu ramanowskiego o konfiguracji „**back-scattered**”, tzn. takie w którym analizowane jest światło rozpraszane wstecznie, a więc jest to konfiguracja dogodna do analizowania próbek odbijających światło. Użycie mikroskopu konfokalnego pozwala na oświetlenie podczas danego pomiaru niewielkiego obszaru analizowanej próbki. Odkrywcą obrazowania konfokalnego był Marvia Minsky w 1961. W zwykłej mikroskopii (tzw. szerokiego pola) cała próbka jest oświetlana przez źródło światła. W odpowiedzi na to (ograniczając się do spektroskopii ramanowskiej) odbija i rozprasza światło, a te sygnały są zbierane przez

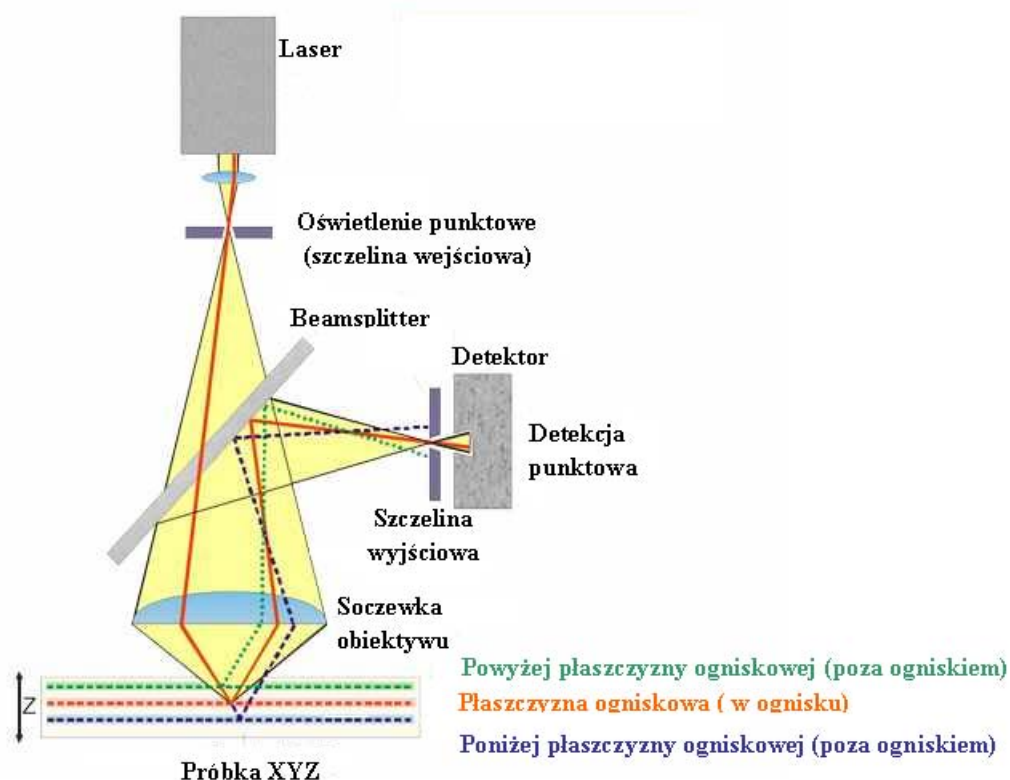
Rys. 6



Schemat ukazujący różnicę między idealnym odbiciem a rzeczywistym procesem rozpraszania i odbicia

obiektyw (patrz Rys. 6 pokazujący różnicę między tym procesem, a idealnym odbiciem). W związku z tym do obiektywu dociera sygnał nie tylko z miejsca ogniskowania, ale z całego przekroju próbki. Powoduje to, że tło w stosunku do sygnału z miejsca ogniskowania jest dość wysokie, co obniża kontrast. Zastosowanie przesłony z małym otworem (szczelinę tę nazywa się często pochodzącym z języka angielskiego określeniem „**pinhole**”) przed detektorem eliminuje sygnał dochodzący spoza płaszczyzny ogniskowania, co znacznie powiększa kontrast i jakość uzyskanego obrazu. Aby wyeliminować światło rozproszone pochodzące ze źródła, stosuje się również analogiczną szczelinę przed wejściem światła do mikroskopu, a więc bezpośrednio za źródłem. Schemat ilustrujący ideę mikroskopii

konfokalnej jest zaprezentowany na Rys. 7. Wiązka laserowa przechodzi przez **szczelinę wejściową**, której rolą jest **zapewnienie oświetlenia punkowego**. Następnie przechodzi ona przez **beamsplitter**, czyli płytkę światłdzielącą, która częściowo przepuszcza, częściowo odbija promieniowanie. Obiektyw ogniskuje wiązkę na małym obszarze próbki, w płaszczyźnie ogniskowej soczewki obiektywu. Światło rozproszone przez próbkę z oświetlonej objętości jest zbierane przez obiektyw i odbite przez beamsplitter w stronę szczeliny wyjściowej (przed **detektorem**). **Pinhole wyjściowy** jest odpowiedzialny za **konfokalność systemu**, czyli odfiltrowanie sygnału spoza poziomu ogniskowej obiektywu. Światło z płaszczyzny ogniskowej jest skupione na tejże szczelinie i trafia na detektor. Na Rys. 7 pokazane są promienie rozogniskowane w pionie, ale analogiczny proces zachodzi również w poziomie (tj. w płaszczyźnie próbki).



Rys. 7

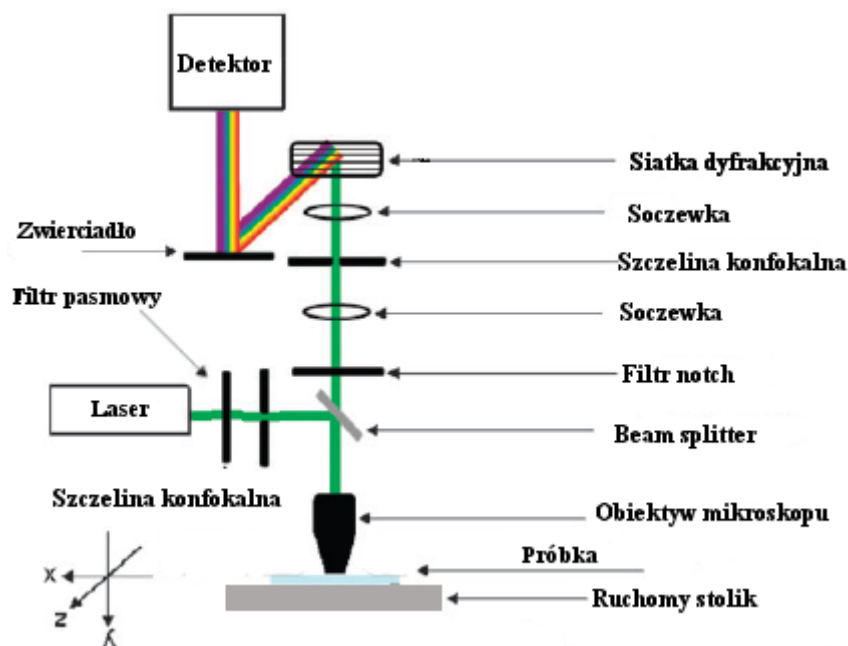
Schemat ukazujący ideę mikroskopii konfokalnej

Zalety sprzężenia mikroskopu konfokalnego ze spektrometrem ramanowskim są następujące:

- geometria szczeliny zapewnia, że tylko wybrane fotony rozproszone docierają do detektora, co zwiększa możliwość lokalnej, selektywnej analizy,

- możliwość zebrania trójwymiarowego obrazu (dzięki skanowaniu powierzchni i zbieraniu sygnału ramanowskiego), który daje możliwości przypisania obrazowi optycznemu (powiększenie analizowanego obszaru próbki uzyskiwane jest dzięki obiektywowi mikroskopu) informacji chemicznej; obraz ten cechuje dobry kontrast oraz rozdzielczość przestrzenna,
- niewielka inwazyjność mikroskopii Ramana gwarantuje zachowanie integralności analizowanej próbki.

Schemat ideowy mikrospektrometru ramanowskiego można zobaczyć na Rys. 8. Światło laserowe przechodzi najpierw przez **filtr pasmowy** (lub interferencyjny), którego rolą jest zapewnienie **wysokiej monochromatyczności** promieniowania wzbudzającego. Następnie wiązka biegnie przez wejściową **szczelinę konfokalną** i trafia na **beamsplitter**. Tam odbija się i przez **obiektyw mikroskopu** trafia na **próbkę**, gdzie ulega rozproszeniu. Rozproszone wstecznie promieniowanie wraca przez obiektyw, przechodzi przez **beamsplitter**



Rys. 8

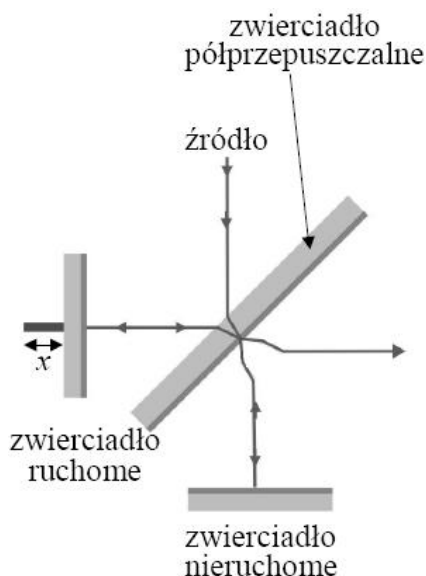
Schemat ideowy budowy spektrometru ramanowskiego

i pada na **filtr notch**. Jego zadaniem jest odfiltrowanie linii wzbudzającej, czyli pasma Rayleigha. Rozproszone promieniowanie skupiane za pomocą soczewek trafia na wyjściową **szczelinę konfokalną** i dalej na siatkę **dyfrakcyjną**, która jest **elementem dyspersyjnym**

monochromatora. Rolą monochromatora jest rozszczepienie światła, a co za tym idzie wydzielenie z całego widma promieniowania padającego tylko niewielkiego, interesującego nas fragmentu. Używając siatki dyfrakcyjnej, wykorzystujemy fakt, że kąt ugięcia wiązki światła zależy od długości fali. Monochromator posiada także szczelinę wejściową i wyjściową, pomiędzy którymi umieszczona jest siatka dyfrakcyjna. **Szczelina wejściowa** determinuje **geometrię wiązki**, podczas gdy **szczelina wyjściowa** odpowiedzialna jest za **zdolność rozdzielczą** monochromatora. Monochromator może też posiadać elementy optyczne, kształtujące wiązkę oraz jej drogę optyczną. W końcowym etapie wiązka trafia na czuły **detektor**. Najczęściej stosowane są **detektory CCD** (z ang. charge coupled device), będące układem wielu elementów światłoczułych, z których każdy rejestruje, a następnie pozwala odczytać sygnał elektryczny proporcjonalny do ilości padającego na niego światła. Detektor CCD wykorzystuje zjawisko fotoelektryczne polegające na wybiciu nośników ładunku z materiału przez padający foton. Nośniki te gromadzone są przez kondensatory, by potem zostać przesunięte w miarowych impulsach elektrycznych przez obwód kontrolny do sąsiadującego elementu. Następnie są one zliczane przez obwód, który wyłapuje nośniki z każdego elementu światłoczułego, wzmacnia ładunek i przelicza go na napięcie, po czym ponownie opróżnia kondensatory. Liczba nośników zebranych w ten sposób w danym przedziale czasu zależy od natężenia padającego światła. Inną metodę detekcji stanowi wykorzystanie **fotopowielacza**. Fotopowielacz zamienia strumień fotonów na impulsy elektryczne. Składa się z obudowy szklanej z wysoką próżnią w środku, w której mieści się **fotokatoda, układ dynod** (katod elektronów wtórnych) oraz anoda. Dynody są wykonane z materiału o dużym współczynniku wtórnej emisji elektronowej $N (>1)$. Na skutek zjawiska fotoelektrycznego foton padając na fotokatodę wybija z niej elektron. Elektron jest przyspieszany napięciem elektrycznym w kierunku pierwszej dynody wybijając z niej N elektronów. N elektronów jest przyspieszane w kierunku drugiej dynody, gdzie ponownie każdy z nich wybija N nowych elektronów, co daje N^2 elektronów. Wybite elektrony są następnie przyspieszane do trzeciej dynody, itd. Proces ten powtórzony w obrębie układu składającego się z M dynod wytworzy impuls złożony z N^M elektronów. W końcu elektrony docierają do fotoanody, a akumulacja ładunku skutkuje pojawieniem się ostrego impulsu prądowego.

Warto w tym miejscu podkreślić, że oprócz **przyrządów dyspersyjnych**, stosowane są także spektrometry Ramana z **transformatą Fouriera** (FT Raman), których kluczowym elementem jest **interferometr**. Schemat budowy interferometru jest przedstawiony na Rys. 9. Jest on

zbudowany z dwóch płaskich zwierciadeł ustawionych względem siebie pod kątem prostym. Jedno z nich jest ruchome, drugie nieruchome. Promieniowanie ze źródła pada na zwierciadło półprzepuszczalne (beamsplitter), które część natężenia wiązki padającej kieruje do nieruchomego zwierciadła, (przepuszczenie światła), część do ruchomego (odbicie



Rys. 9

Schemat budowy interferometru

światła). Następnie obie wiązki odbite od zwierciadeł po ponownym przejściu przez beamsplitter interferują ze sobą i trafiają do detektora. Kontrolowany przesuw (x) ruchomego zwierciadła powoduje zmianę różnicy dróg optycznych. Przesuw ten odbywa się czasie, otrzymujemy zatem zależność intensywności sygnału od czasu, czyli tzw. **interferogram**. Następnie ma miejsce przetworzenie interferogramu z domeny czasu na domenę częstości, by otrzymać właściwe widmo.

Przyrządy FT Raman zapewniają dwa zyski:

- **multipleksowy** - całe widmo jest rejestrowane jednocześnie – dlatego przyrządy z transformatą Fouriera cechuje krótszy czas pomiaru niż przyrządy siatkowe,
- **aperturowy** - szczelina monochromatyczna w spektrometrach dyspersyjnych powoduje straty natężenia.

MAPOWANIE RAMANOWSKIE I JEGO WYKORZYSTANIE W ANALIZIE LEKÓW

WSTĘP

Środki farmaceutyczne pełnią niezwykle ważną rolę w ochronie zdrowia: są stosowane zarówno w profilaktyce, jak i terapii wielu chorób. Reaktywność substancji czynnej leku zależy chociażby od sposobu jej izolacji czy metody jej oczyszczania. Dlatego wszelkie badania pozwalające zrozumieć mechanizmy oddziaływań leków oraz rozpoznać strukturę molekularną substancji bioaktywnej w zależności od otoczenia są niezwykle cenne. Z tego powodu niezmiernie ważne są badania związków bioaktywnych zarówno w środowisku naturalnym, wyizolowanych oraz po obróbce niezbędnej do wykorzystania w preparatach leczniczych. W polu zainteresowania znajdują się zarówno identyfikacja ewentualnych przekształceń polimorficznych, jak i dystrybucji substancji czynnej. Zmiany polimorficzne substancji czynnej leku mogą powstać na którymś z etapów wytwarzania tabletki, zaś analiza dystrybucji składników (zależna chociażby od mieszania czy kompresji składników tabletki) stanowi metodę kontroli jakości środka farmaceutycznego.

ZASADA POMIARU

Kiedy stolik mikroskopu ramanowskiego (patrz Rys.8) jest zmotoryzowany, może on zostać użyty do poruszania próbką. Zbierane jest widmo z niewielkiego obszaru, a następnie próbka zostaje przesunięta, aby umieścić nowy obszar pod obiektywem mikroskopu i zebrać kolejne widmo. Czynność jest powtarzana, aż widma z wybranego obszaru zostaną zebrane.

Po zebraniu zestawu widm wybierane są pasma diagnostyczne i wykreślana jest mapa zmian intensywności tego drgania w obrębie przeskanowanego obszaru próbki. Pierwsza mapa ramanowska została opublikowana w roku 1975 przez Delhave i Dhamelincourt [3]. Autorzy zademonstrowali mikroografię próbki ukazującą jej morfologię oraz "chemiczne" obrazy, skonstruowane przez analizę pasm charakterystycznych dla odpowiednio chromianów i cyjanków, ukazując tym samym ich dystrybucję przestrzenną.

Ramanowska mikroskopia konfokalna umożliwia zarówno skanowanie obszarów w płaszczyźnie XY próbki jak i rejestrację profili głębokości, czyli rozdzielczość wzdłuż osi Z , dzięki temu, że **pinhole** umożliwia zmianę głębokości próbkowania. Jednocześnie jest ona czuła na zmiany natury chemicznej analizowanej substancji oraz rozróżnia poszczególne polimorfy, co jest o tyle cenne, że są to odmiany krystaliczne tej samej substancji, nie różniące się składem chemicznym. Daje także możliwość oceny poziomu krystaliczności

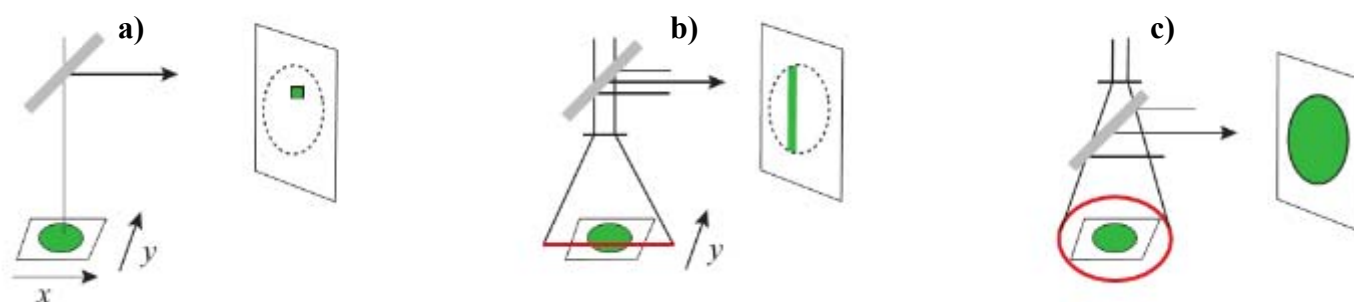
substancji. Stanowi zatem doskonale narzędzie do identyfikacji, badań stanu chemicznego i strukturalnego substancji aktywnej farmaceutyku, które są niezwykle istotne dla procesu rozpuszczania tabletki oraz jej skuteczności. Z kolei mapowanie ramanowskie pozwala na rozpoznanie dystrybucji oraz rozmiarów ziaren substancji aktywnej/substancji aktywnych oraz substancji pomocniczych w obrębie tabletki.

W powszechnym użyciu są trzy techniki mapowania ramanowskiego (patrz Rys. 10):

a) *punktowa*

b) *liniowa*

c) *powierzchniowa*



Rys. 10

Techniki mapowania ramanowskiego:

a) punktowa, b) liniowa i c) powierzchniowa [2]

Technika punktowa lub liniowa polega na otrzymywaniu zbioru widm, z którego konstruowana jest mapa ramanowska. Z kolei mapowanie powierzchniowe umożliwia naświetlenie określonego obszaru próbki. Zestaw przestrajalnych filtrów pozwala dobrać zakres spektralny promieniowanie rozpraszane rejestrowane przez detektor, co w rezultacie daje zestaw obrazów, z których mogą być rekonstruowane widma ramanowskie. Ta ostatnia technika jest dlatego często nazywana obrazowaniem, w odróżnieniu od mapowania seryjnego (techniką punktową lub liniową). Zalety i wady poszczególnych technik są zestawione w poniższej tabeli [2]:

TECHNIKA	ZALETY	WADY
PUNKTOWA	<ul style="list-style-type: none"> • pomiar widma w całym zakresie • możliwość detekcji konfokalnej • dobry stosunek sygnału do szumu • możliwość użycia mniej czułych detektorów 	<ul style="list-style-type: none"> • długi czas pomiaru (przy skanowaniu dużego obszaru lub z wysoką rozdzielczością) • rozdzielczość przestrzenna rzędu od jednego do kilku μm
LINIOWA	<ul style="list-style-type: none"> • krótszy czas pomiaru i zbliżona rozdzielczość przestrzenna do t. punktowej • pomiar widm w całym zakresie spektralnym • bardzo dobry stosunek sygnału do szumu 	<ul style="list-style-type: none"> • rozdzielczość przestrzenna gorsza niż w technice powierzchniowej • konieczność stosowania czułych detektorów (CCD)
POWIERZCHNIOWA	<ul style="list-style-type: none"> • bardzo wysoka rozdzielczość przestrzenna (limit dyfrakcyjny) • metoda prawdziwie „obrazująca” – przy pojedynczym pomiarze 	<ul style="list-style-type: none"> • słabszy stosunek sygnału do szumu • czas pomiaru zależy od liczby mierzonych zakresów spektralnych (tzw. „okienek spektralnych”)

ROZDZIELCZOŚĆ MAPY RAMANOWSKIEJ

W powyższej tabeli dyskutowana jest rozdzielczość mapy ramanowskiej. Zwiększenie liczby punktów pomiarowych, czyli gęstsze próbkowanie badanego obszaru próbki polepsza rozdzielczość przestrzenną mapy ramanowskiej. Jednakże rozdzielczość mapy ramanowskiej jest determinowana limitem dyfrakcyjnym. **Wg Abbego minimalna rozdzielczość (d)** zależy od długości fali wzbudzającej (λ) oraz rozmiaru szczeliny, określonej przez aperturę numeryczną obiektywu (NA) i jest dana wzorem:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA} = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \theta} \approx \frac{\lambda}{2}$$

Z kolei **apertura numeryczna (NA)** zależy od współczynnika załamania światła (n) ośrodka, w którym pracuje obiektyw oraz kąta θ , który jest półkątem maksymalnego stożka światła który może wejść do/wyjść z soczewki. Dla nowoczesnych obiektywów o NA wynoszącej około 1.3-1.4 przyjmuje się zazwyczaj graniczną rozdzielczość odpowiadającą połowie długości fali. Innymi słowy: nie da się uzyskać rozdzielczości lepszej niż kilkaset nanometrów, podczas gdy czasem w polu zainteresowania badaczy są znacznie mniejsze obiekty.

Polepszenie możliwości rozdzielczych mapowania ramanowskiego jest możliwe dzięki sprzężeniu mikroskopu ramanowskiego z mikroskopem skanującej sondy, tzn. mikroskopem sił atomowych; **AFM (z ang. atomic force microscopy)** lub skaningowym mikroskopem tunelowania; **STM (z ang. scanning tunneling microscopy)**.

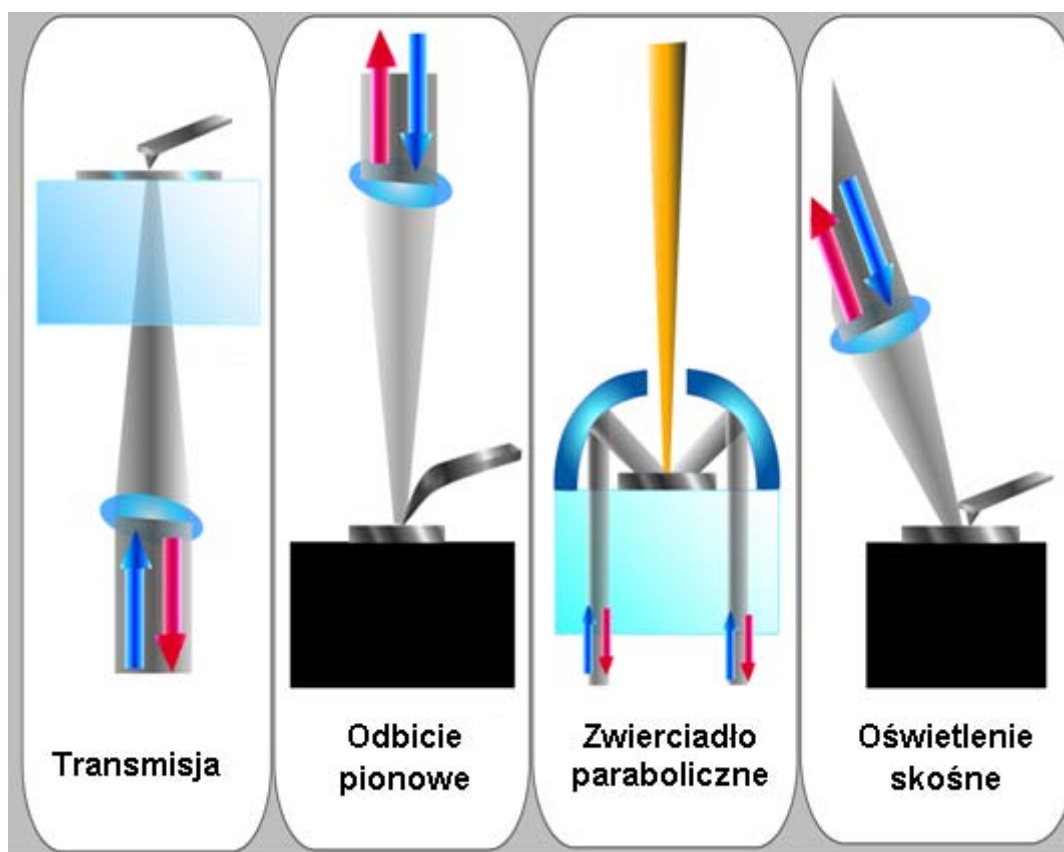
W tym miejscu musimy przypomnieć, że źródłem rozproszonego promieniowania ramanowskiego jest drgający indukowany dipol (μ_{ind}), którego wielkość jest dana iloczynem polaryzowalności molekuly (α) oraz pola elektrycznego (E):

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

Zatem wzmocnienie sygnału ramanowskiego jest możliwe albo przez efekt chemiczny (zwiększenie polaryzowalności) lub elektromagnetyczny (wygenerowanie silnego pola elektromagnetycznego). Oświetlenie nanostruktur metalicznych o odpowiednich rozmiarach (zależnych od długości fali) wzbudza w paśmie przewodnictwa metalu (luźno związane elektrony) **kolektywne drgania plazmy elektronowej**. Warunkiem jest, by padający foton był w rezonansie z częstotliwością tychże drgań, nazywanych **plazmonami**. W rezultacie przy powierzchni metalicznej indukowane jest bardzo silne pole elektryczne. Promieniowanie z zakresu światła widzialnego ma energię wystarczającą do wzbudzenia plazmonów na powierzchni metalu, czyli tak zwanych plazmonów powierzchniowych. Wyidukowane pole może posłużyć do znacznego wzmocnienia (kilka rzędów) sygnału ramanowskiego cząsteczki znajdującej się w pobliżu nanostruktur plazmonowych.

Zenobi et al. [4] i Anderson [5] zademonstrowali, że gdy ostro zakończono metalowa sonda (igła STM lub dźwignia AFM), zdolna do wzbudzenia plazmonów powierzchniowych, znajdzie się w zasięgu kilku nanometrów od próbki, wówczas ma miejsce silne wzmocnienie sygnału ramanowskiego molekuł znajdujących się blisko sondy. Szacuje się, że wzmocnienie to może być nawet rzędu 10^{10} - 10^{12} , co umożliwiłoby rejestrację widm pojedynczych molekuł. Dla takiego układu rozdzielczość mapy ramanowskiej zebranej podczas skanowania próbki,

tak by sygnał kolejnych punktów mógł być wzmocniony przez metaliczną sondę, zależy od **rozmiarów ostrej końcówki sondy**, powiększonej o **odległość na jakiej zanika fala plazmonów powierzchniowych**. Technikę tę nazywa się z ang. **tip enhanced Raman scattering, TERS** (rozpraszanie ramanowskie wzmocnione tipem). Do tej pory udało się zarejestrować mapy TERS z **rozdzielczością sięgającą ok. 10 nm** [6]. Dodatkową zaletą spektroskopii TERS jest możliwość korelacji informacji chemicznej uzyskanej z mapy ramanowskiej z topografią próbki, otrzymaną dzięki obrazowaniu STM/AFM odpowiadającego jej obszaru. Dostępne konfiguracje pomiarowe TERS (patrz Rys. 11) pozwalają na analizę zarówno próbek transparentnych, jak i nieprzejrzyстых.



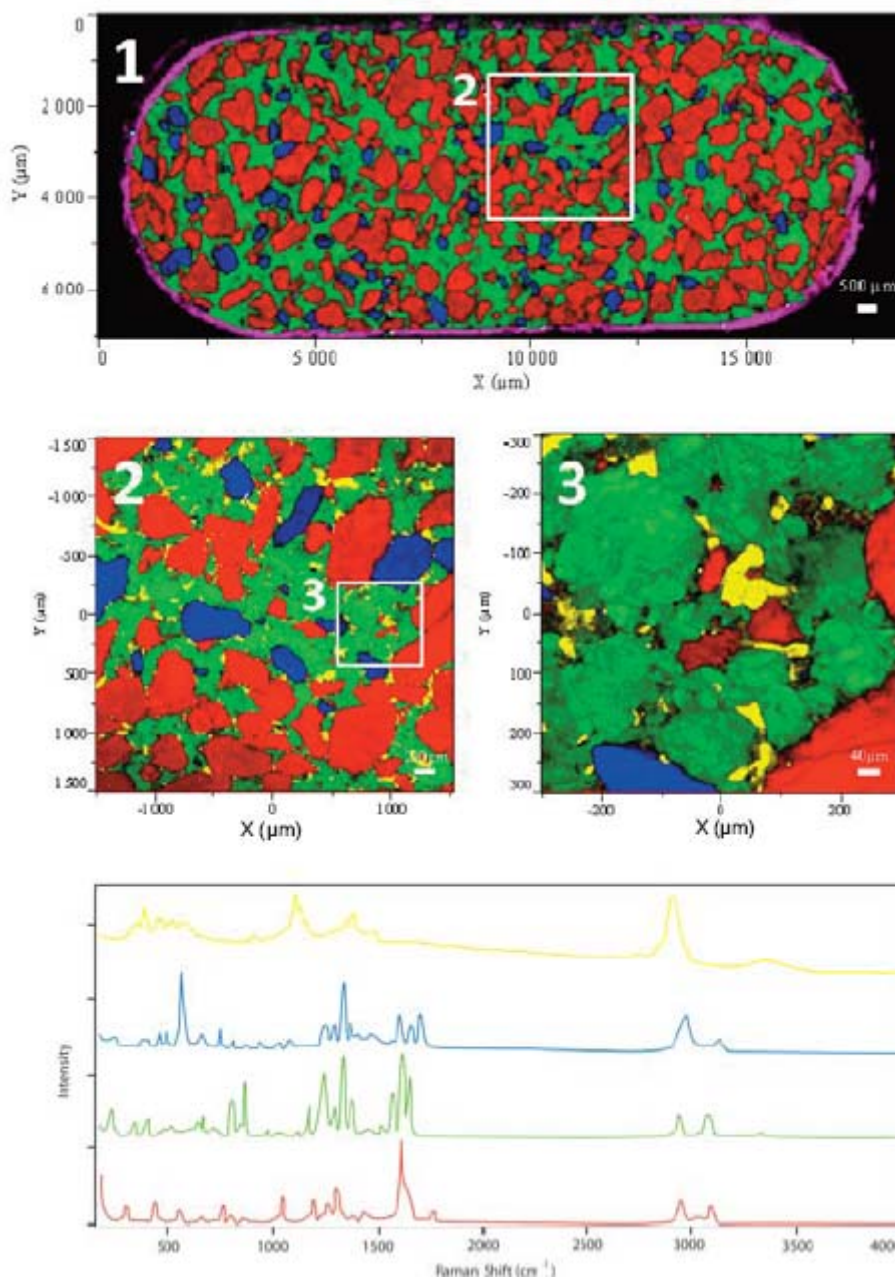
Rys. 11

Stosowane konfiguracje TERS (bez apertury)

ANALIZA MAPY SPEKTRALNEJ

Mapy ramanowskie (klasyczne i TERS) najczęściej otrzymuje się w wyniku pomiaru intensywności integralnej pasma markerowego (charakterystycznego dla danej substancji). Możliwa jest też analiza dystrybucji dokonana poprzez pomiar intensywności w maksimum danego pasma. Istotna jest też wstępna obróbka danych: korekcja linii bazowej, normalizacja, redukcja szumów poprzez wygładzenie, wybór zakresu całkowania. Stosowana jest także konstrukcja map ilustrujących wielkość stosunku intensywności wybranych pasm. W przypadku chemometrii niezbędna jest często korelacja z widmami substancji wzorcowych. Z bardziej zaawansowanych metod należy wymienić analizę głównych składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA), która umożliwia badanie korelacji pomiędzy poszczególnymi widmami i tworzenie map obszarów o zbliżonym i najmniej podobnym do siebie składzie. Mapa ramanowska może być skorelowana z obrazem optycznym (mapowanie klasyczne i TERS) oraz topograficznym (TERS) próbki. Niewątpliwą zaletą mapowania jest jego brak destrukcyjności, możliwość tworzenia wielu map z jednego eksperymentu oraz badania zmian zachodzących pod wpływem pewnych czynników (np.: temperatury, pH itp.).

Przykładowe mapy ramanowskie ukazujące dystrybucję substancji czynnych dla tabletki przeciwbólowej na bazie aspiryny są przedstawione na Rys. 12. Pokazana jest mapa całej tabletki o słabej rozdzielczości, mniejszego fragmentu o lepszej rozdzielczości oraz szczegółów pojedynczych ziaren. Na mapie o słabej rozdzielczości widać jedynie główne składniki: aspirynę, paracetamol i kofeinę, podczas gdy te o lepszej rozdzielczości pozwalają dostrzec substancję pomocniczą, czyli celulozę, a nawet wizualizować jej poszczególne ziarna.



Rys. 12

*Kodowane kolorem mapy ramanowskie tabletki ukazujące dystrybucje przestrzenną poszczególnych składników na obszarach o różnej skali. Widma na dole odpowiadają: **aspirynie**, **paracetamolowi**, **kofeinie** oraz **celulozie** [7].*

CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA:

APARATURA: Dyspersyjny spektrometr ramanowski firmy Horiba ze wzbudzeniem 532, 633 i 785 nm. Przyrząd wyposażony jest w detektor CCD, chłodzony powietrzem (zjawisko termoelektryczne). Promieniowanie rozproszone jest zbierane pod kątem 180 stopni (rozpraszanie wsteczne) w stosunku do promieniowania padającego. Linia Rayleigha jest

usuwana przez odpowiedni filtr. Ruch stolika mikroskopu ramanowskiego jest zmotoryzowany i umożliwia rejestrację widm 2D i 3D, tj. wraz z profilami głębokości próbki. Mapowanie odbywa się metodą punktową.

MATERIAŁY:

Tabletki leków przeciwbólowych np.: apap, scorbolamid, febrisan, cefalgin.

WYKONANIE ĆWICZENIA:

Ćwiczenie obejmuje:

- 1) mapowanie ramanowskie leku (w zależności od wskazań prowadzącego w płaszczyźnie XY lub XZ),
- 2) opracowanie wyników za pomocą dostępnego oprogramowania (LabSpec, CytoSpec).

W pierwszej części ćwiczenia zebrany zostanie zestaw widm wybranej tabletki leku przeciwbólowego. Tabletka została uprzednio przygotowana, tzn. wyrównano jej powierzchnię i ewentualnie przygotowano jej wycinek. Mapowaniem zostanie objęta cała tabletka lub jej fragment. Liczba kroków pomiarowych oraz liczba i czas akumulacji w danym punkcie pomiarowym zostanie dobrana tak, by czas zbierania mapy nie przekraczał 2-2.5 godziny. Widma zostaną zarejestrowane w zakresie od 100 do 4000 cm^{-1} .

Druga część ćwiczenia poświęcona będzie analizie otrzymanych wyników. Celem jest uzyskanie danych ilościowych o zawartości poszczególnych składników w badanych punktach. Dla poszczególnych składników należy:

- a) znaleźć pasma charakterystyczne analityczne (markerowe),
- b) wykonać ich całkowanie,
- c) sporządzić mapy spektralne ilustrujące dystrybucję substancji czynnych.

Analiza może być poprzedzona wstępnym przygotowaniem widm: korekcją linii bazowej, normalizacją itp.

OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Zestawić i porównać pojedyncze widma poszczególnych składników badanego leku przeciwbólowego. Spróbować dokonać przypisania ważniejszych pasm i zaproponować pasma markerowe dla substancji aktywnych leków.
2. Przedstawić i omówić otrzymane mapy ramanowskie dystrybucji składników aktywnych tabletki.

3. Przeprowadzić dyskusję wpływu parametrów pomiarowych oraz metodyki przeprowadzonej analizy na otrzymane mapy.

ODNOŚNIKI:

1. W. R. Browne, J. J. McGarvey, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 454
2. Fotochemia i spektroskopia optyczna. Ćwiczenia laboratoryjne, Redakcja naukowa: Jan Najbar, Andrzej Turek 2009, Wydawnictwo Naukowe PWN
3. M. Delhave, D. Dhamelincourt. *J. Raman Spectrosc.* 3 (1975) 33
4. R. M. Stockle, Y. D. Suh, V. Deckert, R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.* 318 (2000) 131
5. M. S. Anderson, *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000) 3130
6. J. Stadler, T. Schmid, R. Zenobi, *Nano Lett.* 10, (2010), 4514
7. Horiba, materiały komercyjne

Zakres tematów:

- a) rozproszenie promieniowania Rayleigha i Ramana:
 - mechanizm zjawiska, prawdopodobieństwo przejść, reguły wyboru,
- b) budowa i zasada działania mikroskopu ramanowskiego:
 - schemat ideowy i zasada działania lasera (plus cechy promieniowania laserowego) i spektrometru ramanowskiego, mikroskopia konfokalna,
- c) zasada pomiaru mapy ramanowskiej, rozdzielczość klasycznej mapy ramanowskiej i możliwość jej polepszenia (technika TERS; tip enhanced Raman spectroscopy),
- d) porównanie wad i zalet mapowania techniką iluminacji punktowej, liniowej i powierzchniowej.

Literatura:

1. Kęcki Z., *Podstawy spektroskopii molekularnej*, PWN, W-wa, 1992 (rozdziały 3.4.3-3.4.5 oraz 3.5.4 i 3.5.5)
2. Sadlej J., *Spektroskopia molekularna*, WNT, W-wa, 2002, (rozdziały 3.4.1, 3.4.2 oraz 4.3.1 i 4.3.2)

Opracowanie: dr Agata Królikowska