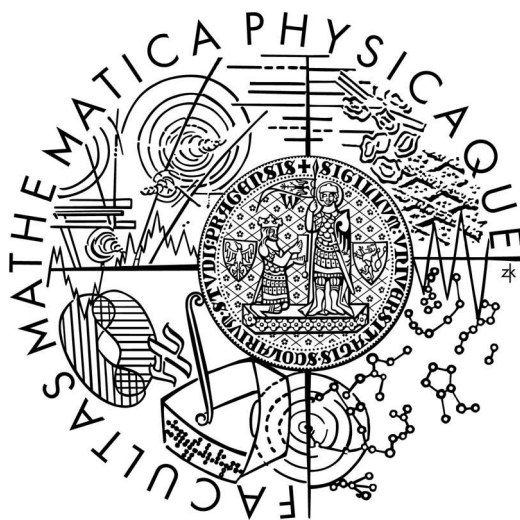


Univerzita Karlova v Praze

Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



David Zoul

**Charakterizace vibračních módů složek nukleových kyselin
pomocí variabilní proton – deuteriové výměny**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: FYZIKA
Studijní plán: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2010

Rád bych poděkoval prof. Josefu Štěpánkovi za vedení této diplomové práce, dále pak všem zaměstnancům oddělení fyziky biomolekul za ochotu kdykoli mi v nesnázích pomoci a poradit. Jmenovitě doc. Peteru Mojzešovi a doc. Petru Prausovi za pomoc při řešení problémů souvisejících s provozem spektrometru. Dále pak panu Miloši Richterovi, za perfektně odvedenou práci při výrobě termostatovaného revolverového držáku kyvet.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 6.8.2010

David Zoul

OBSAH

1. Úvod.....	5
2. Teoretická část.....	6
2.1 Klasická teorie Ramanova rozptylu	6
2.1.1 Vlastnosti kmitajícího dipólu	6
2.1.2 Indukované oscilující elektrické dipóly jako zdroje rozptýleného záření.....	10
2.1.3 Tenzorový popis Rayleighova a Ramanova rozptylu	12
2.2 Kvantová teorie Ramanova rozptylu	15
2.2.1 Neezonanční přiblížení.....	18
2.2.2 Rezonanční přiblížení.....	20
2.3 Symetrie a molekulové vibrace.....	21
2.3.1 Operace symetrie a jejich vlastnosti.....	21
2.3.2 Grupové postuláty	22
2.3.3 Třídy konjugovaných prvků	23
2.3.4 Maticové reprezentace grup	24
2.3.5 Podobnostní transformace	26
2.3.6 Charakter reprezentace	27
2.3.7 Reducibilní a ireducibilní reprezentace.....	28
2.3.8 Analýza reducibilní reprezentace	29
2.3.9 Charakter reprezentace Γ^{3N}	31
2.3.10 Molekula H ₂ O	31
2.3.11 Normální vibrace a normální souřadnice	32
2.3.12 Typy vibračních přechodů.....	34
2.3.13 Symetrie vlnových funkcí fundamentálních stavů.....	35
2.3.14 Vylučovací pravidlo	36
2.4 Poměr signál/šum v Ramanově spektroskopii	36
2.5 Metody zpracování spekter	37
2.5.1 Metoda ortogonálních diferencí	37
2.5.2 Faktorová analýza	39
2.5.3 Zpracování výsledků faktorové analýzy	42
3. Použité vzorky, experimentální zařízení a postup měření.....	45
3.1 Vzorky	45
3.2 Zpracování dat.....	45
3.3 Ramanův spektrometr.....	45

4. Testování a úpravy spektrometru	47
4.1 Řídící počítač a nastavování excitační dráhy	47
4.2 Přídavné světlotěsné kryty spektrometru	47
4.3 Spektrální kalibrace	49
4.4 Výběr excitační vlnové délky	50
4.5 Návrh a realizace revolverového termostatovaného držáku skupiny kyvet.....	52
4.6 Testované tepelných vlastností termostatovaného kyvetového držáku.....	57
5. Experimentální část	61
5.1. Pilotní měření Ramanova rozptylu složek nukleových kyselin při proton-deuteronové výměně.....	61
5.1.1 Sledování proton-deuteronové výměny na cytosinu	61
5.1.2 Sledování proton-deuteronové výměny na uracilu.....	71
5.2 Sledování proton-deuteronové výměny na nukleosidech	75
5.2.1 Získání referenčních spekter pro měření na uridinu, sledováním proton-deuteronové výměny u vody	75
5.2.2 Sledování proton-deuteronové výměny na uridinu	94
6. Závěr	110
Použitá literatura.....	112

Abstrakt

Autor: David Zoul

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc

e-mail vedoucího: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: Přes dlouhé období, kdy se studují vibrační spektra nukleových kyselin, není ještě uspokojivě interpretovaná řada vibračních módů a jejich citlivosti na geometrii a slabé vazby. Jednou z možností, jak rozšířit experimentální data sloužící k těmto interpretacím, je srovnání vibračních spekter molekul s určitou izotopovou záměnou. Zdánlivě nejjednodušší je záměna proton-deuteron. Při rozpuštění molekul v těžké vodě dochází sice k rychlé výměně na heteroatomech, ale ta je téměř současná pro řadu poloh a výsledkem je dynamická rovnováha mezi řadou různých izotopových forem. Metody statistické analýzy časového vývoje Ramanových spekter dávají však nyní principiální možnost analyzovat spektra jednotlivých forem a tím získat unikátní experimentální data. U složitějších úseků nukleových kyselin je pak tato technika perspektivní pro rozšíření strukturních informací.

Předkládaná diplomová práce představuje pilotní studii pro vypracovávání uvedené metodiky. Jejím cílem bylo provést adaptaci Ramanova spektrometru pro dané typy experimentu a provést první série měření, které by vyjasnily meze použitelnosti navrhovaného přístupu s ohledem na citlivost měření, časové konstanty příslušných výměn a náročnost metod vyhodnocení na dosaženou přesnost měření.

Klíčová slova: Raman, spektrometr, spektroskopie, deuterium, deuteron, nukleová kyselina.

Title: Vibrational modes of nucleic acids components characterized by means of variable proton-deuterium exchange

Autor: David Zoul

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc

Supervisor's e-mail: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: Although the nucleic acid oscillatory spectra have been studied for a long period of time, many of oscillating modes have not been properly explained regarding their geometric sensitivity and weak binding. One of the possibilities how to acquire experimental data for interpretation of these modes is to confront oscillating spectra of isotopes. The simplest is proton - deuteron exchange. When molecules dissolve in heavy water they rapidly exchange the heteroatoms, but this is simultaneous for more stages, which leads to dynamic equilibrium state among various isotope forms. Statistic analysis of temporal progression of Raman spectra give us the possibility to analyze the spectra and to obtain unique experimental data. This technique is very promising for more complex nucleic acid segments to gain more structural information.

This diploma thesis represents pilot study of introduced methodics. The objective is to implement adaptation of Raman spectrometer for given types of experiments and undertake first series of measurements. The results should clarify application bounds of proposed method referring to sensitivity, time constant of incident isotope exchange, severity of read-out in comparison of achieved accuracy of the measurement.

Keywords: Raman, spectrometer, spectroscopy, deuterium, deuteron, nucleic acid.

1. Úvod

Při studiu struktury a interakcí nukleových kyselin je významnou metodou Ramanova spektroskopie, která citlivě reaguje na změny geometrického uspořádání jednotlivých molekulárních komponent. Jedním z klíčových bodů této metodiky je interpretace Ramanových spekter, tj. přiřazení linií jednotlivým vibračním módům. Významným zdrojem informací při detailní analýze vibračních stavů pomocí teoretických výpočtů jsou spektra složek nukleových kyselin s různým izotopickým složením, především různým obsazením vodíkových pozic protony nebo deuterony.

Doposud publikovaná měření vibračních spekter (např. [13], [17], [18]) byla většinou prováděna „staticky“, tedy tak, že byly nejprve připravené formy složek nukleových kyselin, například bází, v různě deuterovaném stavu a potom byla změřena jejich spektra. Tím bylo možné vedle spektra formy obsahující pouze protony získat i spektrum formy se všemi lehce vyměnitelnými vodíky nahrazenými deuterony. K lehce vyměnitelným vodíkům patří v případě nukleových kyselin všechny vodíky na aminoskupinách a iminoskupinách dusíkatých bází, dále na OH skupinách v ribóze nebo deoxyribóze, případně vodík na fosfátové skupině u mononukleotidů. Vodíky kovalentně vázané na uhlíkové atomy bází a cukrů jsou naopak těžko vyměnitelné. V některých případech se podařilo při dlouhodobém vystavení roztoku v těžké vodě dosáhnout záměny i na těchto pozicích, ale deuterace byla poměrně nedokonalá.

Na oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu UK byla v posledních letech rozpracovaná metodika využití faktorové analýzy ke zpracování sérií spekter Ramanova rozptylu, umožňující extrahovat spektra čistých spektrálních forem ze spekter jejich směsí, pokud se její složení definovaným způsobem mění vlivem postupně modifikovaných vnějších podmínek. To vedlo k myšlence vypracování originální metodiky získávání spekter různě deuterovaných forem složek nukleových kyselin na základě změn deuterace buď v čase při skokové změně složení poměru H_2O a D_2O v rozpouštědle, nebo při titračním experimentu při postupné změně poměru H_2O a D_2O . Využití měření kinetik proton-deuteriové výměny v Ramanově spektroskopii nukleových kyselin zavedl ve svých studiích již G. J. Thomas Jr. se svými spolupracovníky (např. [14], [15], [16]), ale v jeho případě se používala proton-deuteronová výměna zejména pro získání informací o prostorové struktuře velkých úseků nukleových kyselin a byla založena na analýze několika Ramanových pásů. Nejednalo se tedy o získávání kompletních Ramanových spekter.

Předkládaná diplomová práce představuje pilotní studii pro vypracovávání uvedené metodiky. Jejím cílem bylo provést adaptaci Ramanova spektrometru pro dané typy experimentu a provést první sérii měření, které by vyjasnily meze použitelnosti navrhovaného přístupu s ohledem na citlivost měření, časové konstanty příslušných výměn a náročnost metod vyhodnocení na dosaženou přesnost měření.

Pro dané experimenty byl určen starší Ramanův spektrometr získaný darem ze zahraničního pracoviště. Prvním úkolem práce bylo proto ověření jeho funkcí, doplnění přídatnými kryty, kalibračním zdrojem a především konstrukce termostatovaného držáku kyvet. Druhým úkolem bylo provedení a vyhodnocení pilotních experimentů.

2. Teoretická část

2.1 Klasická teorie Ramanova rozptylu

Ačkoliv klasická teorie nedokáže vysvětlit všechny aspekty Rayleighova a Ramanova rozptylu, nevystihuje kvantování energetických stavů molekul a jejich interakcí a nedovede vysvětlit např. rozdíl intenzit Stokesovy a anti-Stokesovy oblasti, dokáže uspokojivě vysvětlit především frekvenční závislost a částečně i výběrová pravidla [2].

Jak v klasickém, tak i v kvantově-mechanickém přístupu jsou za původce rozptýleného záření považovány oscilující elektrické a magnetické multipólové momenty indukované v molekule elektromagnetickým polem dopadajících světelných vln. Běžně je nejdůležitějším multipólovým zdrojem oscilující elektrický dipól. Oscilující magnetický dipól a elektrický kvadrupól jsou dalšími nejdůležitějšími zdroji v řadě, ale velikost jejich příspěvku je typicky o několik řádů menší ve srovnání s oscilujícím elektrickým dipólem. Proto se zde omezíme pouze na oscilující indukovaný elektrický dipól jako zdroj rozptýleného záření.

2.1.1 Vlastnosti kmitajícího dipólu

Elektrický dipól, sestávající z dvojice bodových nábojů $-q$ a $+q$ vzdálených od sebe R , je charakterizován dipólovým momentem \mathbf{d} definovaným jako

$$\mathbf{p} = q\mathbf{R} \quad (2.1.1.1)$$

kde \mathbf{R} je vektor mířící od $-q$ k $+q$. Jestliže takový dipól kmitá s frekvencí $\nu = \frac{\omega}{2\pi}$ nebo

vlnočtu $\bar{\nu} = \frac{\nu}{c}$, potom emituje elektromagnetické záření o stejné frekvenci.

Mějme elektrický dipól v počátku soustavy souřadné, který kmitá ve směru osy z .

V tzv. vlnové zóně, tj. při splnění podmínky $r \gg \lambda$ (kde je vzdálenost bodu, ve kterém vyšetřujeme pole generované kmitajícím dipólem od počátku, a λ je vlnová délka) bude pro intenzitu elektrické a magnetické komponenty pole generovaného dipólem platit

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \frac{\mu_0 q}{4\pi r} \left[\ddot{\mathbf{R}} \left(t - \frac{r}{c} \right) \times \mathbf{s} \right] \times \mathbf{s} \quad (2.1.1.2)$$

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}, t) = \frac{q}{4\pi cr} \left[\ddot{\mathbf{R}} \left(t - \frac{r}{c} \right) \times \mathbf{s} \right]$$

kde

$$\mathbf{s} = \frac{\mathbf{r}}{r} \quad (2.1.1.3)$$

je jednotkový vektor definující směr šíření.

Poyntingův vektor potom můžeme vyjádřit jako

$$\mathbf{S} = \mathbf{E} \times \mathbf{H} = \mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \frac{\mu_0 q^2}{16\pi^2 cr^2} \left[\ddot{\mathbf{R}} \left(t - \frac{r}{c} \right) \times \mathbf{s} \right]^2 \cdot \mathbf{s}. \quad (2.1.1.4)$$

Jestliže

$$\mathbf{R} = (0, 0, Z_0 \cos \omega t), \quad (2.1.1.5)$$

potom

$$\mathbf{E} = \frac{\mu_0 q}{4\pi r} \left(-\omega^2 Z_0 \cos \omega \left(t - \frac{r}{c} \right) s_x s_z; -\omega^2 Z_0 \cos \omega \left(t - \frac{r}{c} \right) s_y s_z; \omega^2 Z_0 \cos \omega \left(t - \frac{r}{c} \right) (s_x^2 + s_y^2) \right) \quad (2.1.1.6)$$

a

$$\begin{aligned} E^2 = \mathbf{E}\mathbf{E} &= \left(\frac{\mu_0 q}{4\pi r} \right)^2 \left[\omega^2 Z_0 \cos \omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right]^2 (s_x^2 s_z^2 + s_y^2 s_z^2 + (s_x^2 + s_y^2)^2) = \\ &= \left(\frac{\mu_0 q}{4\pi r} \right)^2 \left[\omega^2 Z_0 \cos \omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right]^2 (s_x^2 + s_y^2 + s_z^2) (s_x^2 + s_y^2) = \\ &= \left(\frac{\mu_0 q}{4\pi r} \right)^2 \left[\omega^2 Z_0 \cos \omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right]^2 (s_x^2 + s_y^2) \end{aligned} \quad (2.1.1.7)$$

V polárních souřadnicích (r, φ, ϑ) můžeme jednotkový vektor \mathbf{s} vyjádřit jako

$$\mathbf{s} = (s_x, s_y, s_z) = (\cos \varphi \sin \vartheta; \sin \varphi \sin \vartheta; \cos \vartheta). \quad (2.1.1.8)$$

Potom

$$(s_x^2 + s_y^2) = (\cos^2 \varphi + \sin^2 \varphi) \sin^2 \vartheta = \sin^2 \vartheta \quad (2.1.1.9)$$

a

$$E = \frac{\mu_0 q Z_0 \omega^2}{4\pi r} \sin \vartheta \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] = \frac{\mu_0 p_0 \omega^2}{4\pi r} \frac{\sin \vartheta}{r} \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] \quad (2.1.1.10)$$

kde

$$p_0 = q Z_0 \quad (2.1.1.11)$$

je amplituda dipólového momentu.

S užitím vztahů pro vlnové číslo a rychlost šíření elektromagnetického záření

$$\begin{aligned} k &\equiv \frac{2\pi}{\lambda}, \\ c &= \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}}, \end{aligned} \quad (2.1.1.12)$$

potom dostáváme

$$E = \frac{p_0 k^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{\sin \vartheta}{r} \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] = E_0 \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right], \quad (2.1.1.13)$$

kde E_0 je velikost amplitudy intenzity elektrického pole oscilujícího dipólu

$$E_0 = \frac{p_0 k^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{\sin \vartheta}{r}. \quad (2.1.1.14)$$

Analogicky pro vektor \mathbf{H} :

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}, t) = \frac{q}{4\pi cr} \left(\omega^2 Z_0 \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] s_y; -\omega^2 Z_0 \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] s_x; 0 \right), \quad (2.1.1.15)$$

$$H^2 = \left\{ \frac{q\omega^2 Z_0}{4\pi cr} \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] \right\}^2 (s_x^2 + s_y^2) = \left\{ \frac{p_0 \omega^2}{4\pi cr} \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] \right\}^2 \sin^2 \vartheta, \quad (2.1.1.16)$$

$$H = \frac{p_0 \omega^2}{4\pi c} \frac{\sin \vartheta}{r} \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] = \frac{p_0 k^2 c}{4\pi} \frac{\sin \vartheta}{r} \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] = H_0 \cos \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right], \quad (2.1.1.17)$$

kde H_0 je velikost amplitudy intenzity magnetického pole oscilujícího dipólu

$$H_0 = \frac{p_0 k^2 c}{4\pi} \frac{\sin \vartheta}{r}. \quad (2.1.1.18)$$

Pro Poyntingův vektor udávající hustotu toku energie potom dostáváme

$$\begin{aligned} \mathbf{S} = \mathbf{E} \times \mathbf{H} &= \frac{\mu_0 p_0^2 \omega^4}{16\pi^2 cr^2} \cos^2 \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] \left[s_x (s_x^2 + s_y^2); s_y (s_x^2 + s_y^2) s_z (s_x^2 + s_y^2) \right] = \\ &= \frac{\mu_0 p_0^2 \omega^4}{16\pi^2 cr^2} \cos^2 \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] (s_x; s_y; s_z) \sin^2 \vartheta = \frac{p_0^2 \omega^4}{16\pi^2 \epsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \vartheta}{r^2} \cos^2 \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] \mathbf{s} \end{aligned} \quad (2.1.1.19)$$

a pro časovou střední hodnotu velikosti Poyntingova vektoru (střední hodnota energie přenesené za jednotku času přes jednotkovou plochu)

$$\langle S \rangle = \frac{p_0^2 \omega^4}{16\pi^2 \epsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \vartheta}{r^2} \left\langle \cos^2 \left[\omega \left(t - \frac{r}{c} \right) \right] \right\rangle = \frac{p_0^2 \omega^4}{32\pi^2 \epsilon_0 c^3} \frac{\sin^2 \vartheta}{r^2}. \quad (2.1.1.20)$$

Budeme-li používat, jak je v Ramanově spektroskopii obvyklé, namísto frekvence ω vlnčet $\tilde{\nu}$

$$\tilde{\nu} = \frac{\omega}{2\pi c}, \quad (2.1.1.21)$$

potom můžeme vztahy (2.1.1.13), (2.1.1.17), (2.1.1.20) psát ve tvaru

$$\begin{aligned}
 E_0 &= \frac{\pi \tilde{v}^2 p_0 \sin \vartheta}{\epsilon_0 r}, \\
 H_0 &= \pi c \tilde{v}^2 p_0 \frac{\sin \vartheta}{r}, \\
 \langle S \rangle &= \frac{\pi c \tilde{v}^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta}{2 \epsilon_0 r^2}.
 \end{aligned}
 \tag{ 2.1.1.22 }$$

Časová střední hodnota hustoty energie záření v daném bodě ve směru šíření je

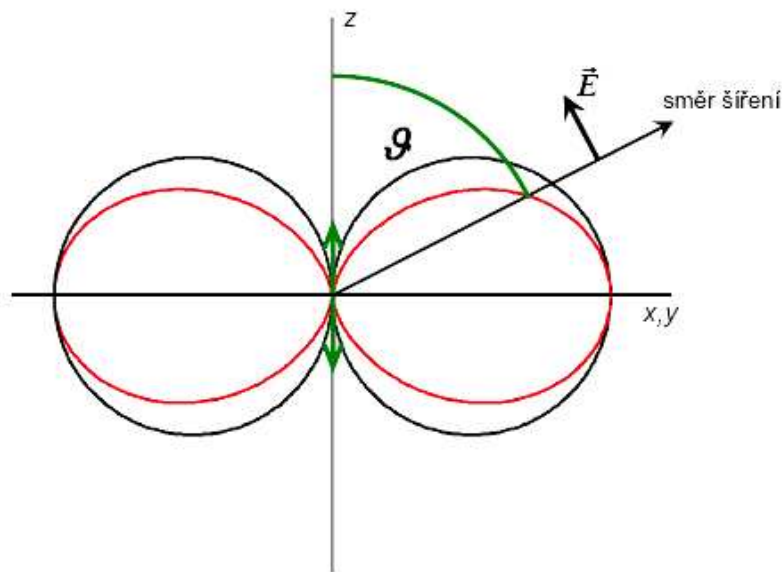
$$\langle u \rangle = \frac{1}{2} \epsilon_0 E_0^2 = \frac{\pi^2 \tilde{v}^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta}{2 \epsilon_0 r^2}.
 \tag{ 2.1.1.23 }$$

Rozdělení hustoty energie má osovou symetrii s rotační osou mířící ve směru kmitů dipólu. Ze vztahu (2.1.1.23) je zřejmé, že hustota energie je maximální v ekvatoriální rovině (rovina xy , $\vartheta = \pi/2$) a směrem k pólům klesá a dosahuje nulové hodnoty na pólech ($\vartheta = 0$). Střední výkon (zářivý tok) $d\Phi$

$$d\Phi = \langle S \rangle dA = \frac{\pi c \tilde{v}^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta}{2 \epsilon_0 r^2} dA = \frac{\pi c \tilde{v}^4 p_0^2}{2 \epsilon_0} \sin^2 \vartheta d\Omega,
 \tag{ 2.1.1.24 }$$

protože element prostorového úhlu

$$d\Omega = \frac{dA}{r^2}.
 \tag{ 2.1.1.25 }$$



Obř. 1: Úhlové rozlišení amplitudy E_0 (černě) a zářivosti I (červeně) kmitajícího elektrického dipólu p . Zdroj [2]

Celkový výkon vyzářený dipólem dostaneme z (2.1.1.24) integrací podle $d\Omega = \sin \vartheta d\vartheta d\varphi$

$$\Phi = \frac{\pi c \tilde{V}^4 p_0^2}{2\epsilon_0} \int \sin^2 \vartheta d\Omega = \frac{\pi c \tilde{V}^4 p_0^2}{2\epsilon_0} \int_{\varphi=0}^{2\pi} \int_{\vartheta=0}^{\pi} \sin^3 \vartheta d\vartheta d\varphi = \frac{4\pi^3 c \tilde{V}^4 p_0^2}{3\epsilon_0}. \quad (2.1.1.26)$$

Pro **zářivost** (irradiance) potom dostáváme

$$I = \frac{d\Phi}{d\Omega} = \frac{\pi^2 c \tilde{V}^4 p_0^2}{2\epsilon_0} \sin^2 \vartheta. \quad (2.1.1.27)$$

V reálném experimentu zpravidla detekujeme zářivý tok v konečném prostorovém úhlu

$$\Delta\Phi = \frac{\pi^2 c \tilde{V}^4 p_0^2}{2\epsilon_0} \int_{\varphi-\Delta\varphi}^{\varphi+\Delta\varphi} \int_{\vartheta-\Delta\vartheta}^{\vartheta+\Delta\vartheta} \sin^2 \vartheta d\vartheta d\varphi. \quad (2.1.1.28)$$

V rozptylových experimentech zavádíme veličinu **účinný průřez rozptylu** (scattering cross-section) σ jako poměr rozptýleného světelného výkonu (totálního, tj. do celého prostorového úhlu) a plošné hustoty zářivého toku dopadajícího záření

$$\sigma \equiv \frac{\Phi}{\langle S \rangle}. \quad (2.1.1.29)$$

Pro soubor rozptylujících molekul zpravidla vztahujeme účinný průřez na jednu molekulu případně i na jednotkový interval vlnočtů. Mimo to ještě zavádíme diferenciální účinný průřez rozptylu vztahem

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{d\Phi}{d\Omega} \frac{1}{\langle S \rangle}. \quad (2.1.1.30)$$

2.1.2 Indukované oscilující elektrické dipóly jako zdroje rozptýleného záření

Jak v klasickém, tak i v kvantově-mechanickém přístupu jsou za původce rozptýleného záření považovány oscilující elektrické a magnetické multipólové momenty indukované v molekule elektromagnetickým polem dopadajících světelných vln. Běžně je nejdůležitějším multipólovým zdrojem oscilující elektrický dipól. Oscilující magnetický dipól a elektrický kvadrupól jsou dalšími nejdůležitějšími zdroji v řadě, ale velikost jejich příspěvku je typicky o několik řádů menší ve srovnání s oscilujícím elektrickým dipólem. Proto se zpočátku omezíme pouze na oscilující indukovaný elektrický dipól jako zdroj rozptýleného záření.

Intenzita I (střední výkon vyzářený oscilujícím dipólem indukovaným v molekule elektrickým polem dopadajícího záření o frekvenci ω_1 do jednotkového prostorového úhlu ve směru svírajícím úhel ϑ s osou dipólu je dán vztahem plynoucím z (2.1.1.20)

$$I \equiv \frac{d\Phi}{d\Omega} = \frac{1}{32\pi^2 \epsilon_0 c^3} \omega_s^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta = k'_m \omega_s^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta, \quad (2.1.2.1)$$

kde jsme označili

$$k'_m = \frac{1}{32\pi^2 \epsilon_0 c^3} \quad (2.1.2.2)$$

a p_0 je amplituda indukovaného dipólového momentu s frekvencí ω_s , která je obecně odlišná od ω_1 a c je rychlost světla. Zde i v následujícím teoretickém popisu je vhodné používat úhlovou frekvenci ω . Avšak v případech, kdy je kladen důraz na polohy pásů ve spektru, používá se ve shodě s běžnou praxí vlnčet

$$\tilde{\nu} = \frac{\omega_s}{2\pi c}. \quad (2.1.2.3)$$

Vztah (2.1.2.1) lze potom psát v alternativním tvaru

$$I = \frac{\pi^2 c}{2\epsilon_0} \tilde{\nu}_s^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta = k'_v \tilde{\nu}_s^4 p_0^2 \sin^2 \vartheta, \quad (2.1.2.4)$$

kde jsme označili

$$k'_v = \frac{\pi^2 c}{2\epsilon_0}. \quad (2.1.2.5)$$

Úkolem teorie rozptylu světla je ukázat, jak ω_s a p_0 souvisí s vlastnostmi rozptylující molekuly a s frekvencí ω_1 dopadajícího elektromagnetického záření. Frekvenčně závislý indukovaný dipólový moment molekuly má tvar

$$\mathbf{d} = \boldsymbol{\alpha} \mathbf{E}, \quad (2.1.2.6)$$

kde \mathbf{E} je vektor elektrické intenzity dopadající rovinné monochromatické vlny o frekvenci ω a $\boldsymbol{\alpha}$ je tenzor polarizovatelnosti molekuly. Vztah (2.1.2.6) je systémem 3 lineárních rovnic

$$\begin{pmatrix} d_x \\ d_y \\ d_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{pmatrix}, \quad (2.1.2.7)$$

kde 9 koeficientů $\alpha_{\rho\sigma}$ tvoří komponenty tenzoru polarizovatelnosti $\boldsymbol{\alpha}$.

V případě nerezonančního rozptylu je tenzor polarizovatelnosti symetrický, tj. $\alpha_{\rho\sigma} = \alpha_{\sigma\rho}$, potom má pouze šest nezávislých složek.

Tenzor polarizovatelnosti molekuly si můžeme graficky vyjádřit jako elipsoid mající v obecném případě tři různé poloosy. Ačkoli tvar elipsoidu polarizovatelnosti molekuly nezávisí na volbě souřadného systému, aktuální hodnoty jeho složek na orientaci os závisí. Pokud osy souřadného systému koincidují s hlavními osami elipsoidu polarizovatelnosti, nabývá tenzor polarizovatelnosti jednodušší diagonální tvar, tj. všechny nediagonální složky vymizí a délky poloos elipsoidu budou

$$\frac{1}{\sqrt{\alpha_{xx}}}; \frac{1}{\sqrt{\alpha_{yy}}}; \frac{1}{\sqrt{\alpha_{zz}}}. \quad (2.1.2.8)$$

Ačkoli jednotlivé složky tenzoru polarizovatelnosti se při rotaci souřadného systému mění, některé jejich kombinace jsou invariantní. V případě symetrického tenzoru polarizovatelnosti existují dva takové invarianty: *střední polarizovatelnost* a definovaná vztahem

$$a = \frac{1}{3}(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (2.1.2.9)$$

a *anizotropie* γ definovaná vztahem

$$\gamma^2 = \frac{1}{2} \left[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 + 6(\alpha_{xy}^2 + \alpha_{xz}^2 + \alpha_{yz}^2) \right]. \quad (2.1.2.10)$$

Pro nesymetrický tenzor polarizovatelnosti existuje ještě třetí *antisymetrický invariant* δ , definovaný vztahem

$$\delta^2 = \frac{3}{4} \left(|\alpha_{xy} - \alpha_{yx}|^2 + |\alpha_{xz} - \alpha_{zx}|^2 + |\alpha_{yz} - \alpha_{zy}|^2 \right). \quad (2.1.2.11)$$

Tyto invarianty získávají na významu v případě souboru náhodně orientovaných molekul, kdy je mohutnost rozptýleného záření dána prostorovým středováním čtverců složek tenzoru polarizovatelnosti. Dá se ukázat, že střední hodnoty čtverců složek tenzoru polarizovatelnosti mohou být vyjádřeny pomocí invariantů a a γ

$$\begin{aligned} \overline{\alpha_{xx}^2} = \overline{\alpha_{yy}^2} = \overline{\alpha_{zz}^2} &= \frac{45a^2 + 4\gamma^2}{45}, \\ \overline{\alpha_{xy}^2} = \overline{\alpha_{xz}^2} = \overline{\alpha_{yz}^2} &= \frac{\gamma^2}{15}, \\ \overline{\alpha_{xx}\alpha_{yy}} = \overline{\alpha_{xx}\alpha_{zz}} = \overline{\alpha_{yy}\alpha_{zz}} &= \frac{45a^2 - 2\gamma^2}{45}. \end{aligned} \quad (2.1.2.12)$$

2.1.3 Tenzorový popis Rayleighova a Ramanova rozptylu

Tenzor polarizovatelnosti bude obecně funkcí jaderných souřadnic a tudíž bude záviset i na frekvencích vibrací molekuly

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + Q_k \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots \quad (2.1.3.1)$$

kde $(\alpha_{\rho\sigma})_0$ je hodnota $\alpha_{\rho\sigma}$ v rovnovážné konfiguraci molekuly, Q_k, Q_l, \dots jsou normální souřadnice vibrací o frekvencích $\omega_k, \omega_l, \dots$ a sčítá se přes všechny normální souřadnice.

Index '0' u derivací znamená, že jsou počítány v rovnovážné konfiguraci. Omezíme se pouze

na první dva členy rozvoje, tj. zanedbáme členy zahrnující vyšší než první mocninu Q . Tato aproximace se nazývá harmonická. Soustředíme se pro začátek pouze na jednu normální vibraci k Q . V tom případě můžeme vztah (2.1.3.1) psát ve tvaru

$$(\alpha_{\rho\sigma})_k = (\alpha_{\rho\sigma})_k + (\alpha'_{\rho\sigma})_k Q_k, \quad (2.1.3.2)$$

kde složky derivace tenzoru polarizovatelnosti tvoří derivace polarizovatelnosti podle normálních souřadnic Q_k

$$(\alpha'_{\rho\sigma})_k = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0. \quad (2.1.3.3)$$

Vztah (2.1.3.2) platí pro všechny složky tenzoru, a proto můžeme psát

$$\mathbf{a}_k = \mathbf{a}_0 + \mathbf{a}'_k Q_k. \quad (2.1.3.4)$$

Uvažujeme-li jednoduchý harmonický pohyb, potom můžeme závislost Q_k na čase vyjádřit jako

$$Q_k = Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k), \quad (2.1.3.5)$$

kde Q_{k0} je amplituda normální vibrace a δ_k je fázový faktor.

Dosazením (2.1.3.5) do (2.1.3.4) dostaneme časovou závislost tenzoru polarizovatelnosti vyplývající z k -tého vibračního módu

$$\mathbf{a}_k = \mathbf{a}_0 + \mathbf{a}'_k Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k). \quad (2.1.3.6)$$

Do rovnice (2.1.2.6) nyní dosadíme frekvenční závislost dopadajícího pole \mathbf{E} danou vztahem

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 \cos \omega t. \quad (2.1.3.7)$$

Potom

$$\mathbf{d} = \mathbf{a}_0 \mathbf{E}_0 \cos \omega t + \mathbf{a}'_k \mathbf{E}_0 Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k) \cos \omega t. \quad (2.1.3.8)$$

Užitím trigonometrické identity

$$\cos A \cos B = \frac{1}{2} [\cos(A+B) + \cos(A-B)] \quad (2.1.3.9)$$

můžeme vztah (2.1.3.8) vyjádřit ve tvaru

$$\begin{aligned}
\mathbf{d} &= \mathbf{d}(\omega_1) + \mathbf{d}(\omega_1 - \omega_k) + \mathbf{d}(\omega_1 + \omega_k) = \\
&= \mathbf{d}_0^{\text{Rayleigh}} \cos \omega_1 t + \mathbf{d}_0^{\text{Raman}} \cos [(\omega_1 - \omega_k)t - \delta_k] + \mathbf{d}_0^{\text{Raman}} \cos [(\omega_1 + \omega_k)t + \delta_k] = \\
&= \boldsymbol{\alpha}_0^{\text{Rayleigh}} \mathbf{E}_0 \cos \omega_1 t + \boldsymbol{\alpha}_k^{\text{Raman}} \mathbf{E}_0 \cos [(\omega_1 - \omega_k)t - \delta_k] + \boldsymbol{\alpha}_k^{\text{Raman}} \mathbf{E}_0 \cos [(\omega_1 + \omega_k)t + \delta_k] = \\
&= \boldsymbol{\alpha}_0^{\text{Rayleigh}} \mathbf{E}_0 \cos \omega_1 t + \frac{1}{2} \{ \boldsymbol{\alpha}'_k Q_{k0} \mathbf{E}_0 \cos [(\omega_1 - \omega_k)t - \delta_k] + \boldsymbol{\alpha}'_k Q_{k0} \mathbf{E}_0 \cos [(\omega_1 + \omega_k)t + \delta_k] \}.
\end{aligned} \tag{2.1.3.10}$$

Kosinové funkce definují frekvence indukovaných dipólů, vztahy pro $\boldsymbol{\alpha}^{\text{Rayleigh}}$ a $\boldsymbol{\alpha}^{\text{Raman}}$ definují klasické *tenzory Rayleighova a Ramanova rozptylu*.

Ze vztahu (2.1.3.10) je zřejmé, že indukovaný lineární dipól má tři složky o různých frekvencích: $\mathbf{d}(\omega_1)$, která je příčinou záření o stejné frekvenci jako je dopadající záření a vysvětluje pružný Rayleighův rozptyl; dále složku $\mathbf{d}(\omega_1 - \omega_k)$, která je příčinou záření o frekvenci $\omega_1 - \omega_k$ a vysvětluje Stokesův Ramanův rozptyl; a nakonec složku $\mathbf{d}(\omega_1 + \omega_k)$, která je příčinou záření o frekvenci $\omega_1 + \omega_k$ a vysvětluje anti-Stokesův Ramanův rozptyl. Povšimněme si, že zatímco indukovaný dipól $\mathbf{d}(\omega_1)$ má stejnou fázi jako dopadající vlna, indukované dipóly $\mathbf{d}(\omega_1 \pm \omega_k)$ jsou fázově posunuty vůči dopadajícímu vlně o δ_k . Tato veličina definuje relativní fázi normální vibrace Q_k vzhledem k dopadající vlně a pro různé molekuly může být různá. Tento jednoduchý klasický přístup nám poskytuje užitečný kvalitativní obrázek mechanismu Rayleighova a Ramanova rozptylu. Rayleighův rozptyl vzniká díky kmitům elektrického dipólu o frekvenci ω_1 indukovaného v molekule elektrickým polem dopadajícího záření, jež samo kmitá s frekvencí ω_1 . Ramanův rozptyl vzniká díky elektrickým dipólům kmitajícím s frekvencemi $\omega_1 \pm \omega_k$, které vznikají následkem modulace elektrického dipólu kmitajícího s frekvencí ω_1 molekulárními vibracemi s frekvencí ω_k . Nezbytnou vazbu mezi pohybem jader a elektrickým polem zajišťují elektrony, jež sledují pohyby jader a způsobují harmonickou modulaci polarizovatelnosti. Užijeme-li analogie s hudbou, můžeme říci, že frekvence pozorované při Ramanově rozptylu jsou frekvence rázů mezi frekvencí záření ω_1 a frekvencí molekulární vibrace ω_k .

Je zřejmé, že nutnou podmínkou pro existenci Rayleighova rozptylu je nenulovost $\boldsymbol{\alpha}^{\text{Rayleigh}}$. Jelikož všechny molekuly jsou v menší či větší míře polarizovatelné, klasický rovnovážný tenzor $\boldsymbol{\alpha}_0$ bude vždy mít nějaké nenulové složky a tudíž $\boldsymbol{\alpha}^{\text{Rayleigh}}$ bude vždy nenulový.

Všechny molekuly tedy vyvolávají Rayleighův rozptyl.

Analogickou podmínkou pro existenci Ramanova rozptylu spojeného s molekulovou vibrací o frekvenci ω_k je nenulovost $\boldsymbol{\alpha}^{\text{Raman}}$. To znamená, že alespoň jedna ze složek derivace tenzoru polarizovatelnosti $\boldsymbol{\alpha}'_k$ musí být nenulová. Podle vztahu (2.1.3.3) je $(\alpha'_{\rho\sigma})_k$ derivací $\rho\sigma$ složky tenzoru polarizovatelnosti podle normální souřadnice Q_k v rovnovážné konfiguraci jader. Podmínkou pro existenci Ramanova rozptylu tedy je, aby alespoň pro jednu ze složek tenzoru polarizovatelnosti měla její závislost na normální souřadnici v rovnovážné konfiguraci nenulový gradient, tedy

$$(\alpha'_{\rho\sigma})_k = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 \neq 0. \tag{2.1.3.11}$$

Takováto vibrace je pak aktivní v Ramanově spektru. Vztah (2.1.3.11) odráží citlivost polarizovatelnosti molekuly na změny konfigurace jader při normální vibraci Q_k .

2.2 Kvantová teorie Ramanova rozptylu

Kvantový popis Ramanova rozptylu [1] vychází z řešení Schrödingerovy rovnice pro pole o dvou frekvencích. Pravděpodobnost P přechodu molekuly ze stavu 1 do stavu 2 mechanismem Ramanova rozptylu je v 1. řádu poruchové teorie pro optické frekvence nulová. Ve druhém řádu poruchové teorie dostáváme pro pravděpodobnost tohoto přechodu spojeného s emisí fotonu o polarizaci \mathbf{e}^R do prostorového úhlu $d\Omega$ vztah

$$\frac{dP_{12}^R}{d\Omega} = \frac{16\pi^4}{hc^4} \left[e_i^R (\alpha_{12}^R)_{ij} e_j^0 \right] F_{12}^R(\nu) \nu_R^3 I_0, \quad (2.2.1)$$

kde

$$(\alpha_{12}^R)_{ij} = \sum_{s \neq 1,2} \left(\frac{\langle \Psi_2 | \hat{D}_i | \Psi_s \rangle \langle \Psi_s | \hat{D}_j | \Psi_1 \rangle}{E_1 - E_s + h\nu_0} + \frac{\langle \Psi_2 | \hat{D}_j | \Psi_s \rangle \langle \Psi_s | \hat{D}_i | \Psi_1 \rangle}{E_2 - E_s - h\nu_0} \right) \quad (2.2.2)$$

je tenzor Ramanova rozptylu pro přechod ze stavu 1 do stavu 2, \mathbf{e}^R resp. \mathbf{e}^0 je jednotkový vektor ve směru rozptýleného resp. dopadajícího záření, F_{12}^R popisuje tvar Ramanovy čáry a $\hat{\mathbf{D}}$ je operátor dipólového momentu skládající se z elektronové $\hat{\mathbf{D}}^e$ a jaderné $\hat{\mathbf{D}}^n$ části

$$\hat{\mathbf{D}} = \hat{\mathbf{D}}^e + \hat{\mathbf{D}}^n = -e \sum_l \mathbf{r}^l + \sum_{p=1}^N Z_p \mathbf{R}^p, \quad (2.2.3)$$

kde \mathbf{r}^l jsou souřadnice elektronů, \mathbf{R}^p souřadnice jader a Z_p je atomové číslo p -tého jádra. Adiabatická aproximace dává

$$\Psi_s(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \Phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \chi_m^u(\mathbf{R}), \quad (2.2.4)$$

kde $\Phi_m(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ jsou elektronové a $\chi_m^u(\mathbf{R})$ jaderné vlnové funkce. Symboly m a u označují elektronový vibrační stav. Dále se omezíme pouze na přechody mezi různými vibračními stavy v základním elektronovém stavu g , neboť s jinými přechody se v molekulární Ramanově spektroskopii prakticky nesetkáváme.

Označme tedy počáteční stav $1 = g\{v_1\}$ a konečný stav $2 = g\{v_2\}$. Za tohoto předpokladu bude řada členů v sumaci (2.2.1) nulová buď z důvodu ortogonality vlnových funkcí, nebo antisymetričnosti v některé souřadnici. Ze sumace tak vypadnou stavy $s = g\{u\}$, ve kterých se kombinuje základní elektronový stav s libovolným vibračním stavem u . Potom můžeme psát Ramanův tenzor ve tvaru

$$(\alpha_{12}^R)_{ij} = \sum_e \sum_{\{u\}} \left(\frac{\langle \Psi_{g\{v_2\}} | \hat{D}_i | \Psi_{e\{u\}} \rangle \langle \Psi_{e\{u\}} | \hat{D}_j | \Psi_{g\{v_1\}} \rangle}{E_1 - E_s + h\nu_0} + \frac{\langle \Psi_{g\{v_2\}} | \hat{D}_j | \Psi_{e\{u\}} \rangle \langle \Psi_{e\{u\}} | \hat{D}_i | \Psi_{g\{v_1\}} \rangle}{E_2 - E_s - h\nu_0} \right) \quad (2.2.5)$$

kde suma probíhá přes všechny excitované elektronové stavy a přes všechny vibrační stavy. Jelikož z důvodu ortogonality elektronových vlnových funkcí platí

$$\langle \Phi_g(r, R) \chi_g^{v_2}(R) | R_i^k | \Phi_e(r, R) \chi_g^u(R) \rangle = \langle \Phi_g | \Phi_e \rangle_r \langle \chi_g^{v_2}(R) | R_i^k | \chi_g^u(R) \rangle_R = 0, \quad (2.2.6)$$

vypadnou z výrazu (2.2.5) všechny členy obsahující jadernou část operátoru dipólového momentu. K Ramanově rozptylu tak může docházet pouze při interakci záření s elektronovým obalem molekuly. Vazba na vibrační přechody je umožněna především tím, že elektrony sledují vibrace jader.

Vazbu mezi elektronovým a jaderným pohybem vyjadřuje závislost elektronové vlnové funkce na souřadnicích jader.

Ve vlnové funkci tak zbudou členy

$$\langle \Phi_g(r, R) \chi_e^{v_2}(R) | R_i^l | \Phi_e(r, R) \chi_e^u(R) \rangle = \langle \chi_e^{v_2} | (D_e)_i | \chi_e^u \rangle_R = 0, \quad (2.2.7)$$

kde

$$(D_e)_i = \langle \Phi_g | \hat{D}_i^e | \Phi_e \rangle_r \quad (2.2.8)$$

je maticový element dipólového momentu elektronového přechodu $g \leftrightarrow e$.

Pro malé výchylky jader z rovnovážných poloh lze závislost elektronové vlnové funkce na souřadnicích jader aproximovat prvními dvěma členy Taylorova rozvoje funkce $\Phi(r, R)$ v okolí hodnot vibračních souřadnic odpovídajících rovnovážné konfigurace jader $\mathbf{R} = \mathbf{R}_0$

$$\Phi_{\mathbf{R}}(\mathbf{r}) = \Phi_{\mathbf{R}_0}(\mathbf{r}) + (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0) \text{grad}_{\mathbf{R}} \Phi_{\mathbf{R}}(\mathbf{r}) \Big|_{\mathbf{R}=\mathbf{R}_0}. \quad (2.2.9)$$

První člen rozvoje představuje tzv. Condonovu aproximaci elektronové vlnové funkce a druhý člen, odpovědný za synchronizaci pohybů jader a elektronů, tzv. Herzberg-Tellerovu aproximaci. Potom se výraz pro tenzor Ramanova rozptylu rozpadne na tři členy (termy)

$$(A_{12}^R)_{ij} = (A_{12}^R)_{ij} + (B_{12}^R)_{ij} + (C_{12}^R)_{ij}, \quad (2.2.10)$$

kde první člen A zahrnuje pouze Condonovu aproximaci:

$$(A_{12}^R)_{ij} = \sum_e (D_e)_i (D_e)_j \sum_{\{u\}} \left\{ \frac{C_{u2}^e C_{u1}^e}{\Delta E_{u1}^e} + \frac{C_{u2}^e C_{u1}^e}{\Delta E_{u2}^e} \right\}, \quad (2.2.11)$$

kde

$$(D_e)_i = \langle \Phi_e(r, R_0) | \hat{D}_i^e | \Phi_g(r, R_0) \rangle_r \quad (2.2.12)$$

je maticový element dipólového momentu elektronového přechodu $e \leftrightarrow g$,

$$C_{uv}^e = \langle \chi_e^u(R) | \chi_g^v(R) \rangle \quad (2.2.13)$$

je Condonův překryvový integrál vibračních funkcí a

$$\begin{aligned}\Delta E_{u1}^e &= E_{gv_1} - E_{eu} + h\nu_0, \\ \Delta E_{u2}^e &= E_{gv_2} - E_{eu} - h\nu_0,\end{aligned}\tag{2.2.14}$$

jsou rezonanční členy

$$\begin{aligned}E_{eu} - E_{gv_1} &\rightarrow h\nu_0 \Rightarrow \Delta E_{u1}^e \rightarrow 0, \\ E_{gv_2} - E_{eu} &\rightarrow h\nu_0 \Rightarrow \Delta E_{u2}^e \rightarrow 0.\end{aligned}\tag{2.2.15}$$

Druhý člen B představuje Herzberg-Tellerovu opravu k elektronové funkci excitovaných elektronových stavů

$$\begin{aligned}(B_{12}^R)_{ij} &= \sum_e \sum_p \left((V_e)_p \right)_i (D_e)_j \sum_{\{u\}} \left[\frac{(G_{u2}^e)_p C_{u1}^e}{\Delta E_{u1}^e} + \frac{C_{u2}^e (G_{u1}^e)_p}{\Delta E_{u2}^e} \right] + \\ &+ \sum_e \sum_p (D_e)_i \left((V_e)_p \right)_j \sum_{\{u\}} \left[\frac{(G_{u1}^e)_p C_{u2}^e}{\Delta E_{u1}^e} + \frac{C_{u1}^e (G_{u2}^e)_p}{\Delta E_{u2}^e} \right],\end{aligned}\tag{2.2.16}$$

kde

$$\left((V_e)_p \right)_i = \left\langle \frac{\partial \Phi_e(r, R)}{\partial R_p} \middle| \hat{D}_i^e \middle| \Phi_g(r, R) \right\rangle_{\mathbf{R}=\mathbf{R}_0}\tag{2.2.17}$$

a

$$(G_{uv}^e)_p = \left\langle \chi_e^u(R) \middle| (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p \middle| \chi_g^v(R) \right\rangle\tag{2.2.18}$$

je maticový element operátoru výchylky souřadnic jader mezi stavy eu a gv , přičemž $(\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p$ je výchylka p -tého jádra z rovnovážné polohy.

Třetí člen C je Herzberg-Tellerovou opravou k elektronové funkci základního elektronového stavu

$$\begin{aligned}(C_{12}^R)_{ij} &= \sum_e \sum_p \left((U)_p \right)_i (D_e)_j \sum_{\{u\}} \left[\frac{(G_{u2}^e)_p C_{u1}^e}{\Delta E_{u1}^e} + \frac{C_{u2}^e (G_{u1}^e)_p}{\Delta E_{u2}^e} \right] + \\ &+ \sum_e \sum_p (D_e)_i \left((U)_p \right)_j \sum_{\{u\}} \left[\frac{(G_{u1}^e)_p C_{u2}^e}{\Delta E_{u1}^e} + \frac{C_{u1}^e (G_{u2}^e)_p}{\Delta E_{u2}^e} \right],\end{aligned}\tag{2.2.19}$$

kde

$$\left((U)_p \right)_i = \left\langle \Phi_e(r, R) \left| \hat{D}_i^e \right| \frac{\partial \Phi_g(r, R)}{\partial R_p} \right\rangle_{\mathbf{R}=\mathbf{R}_0}. \quad (2.2.20)$$

Hodnota této opravy je zpravidla zanedbatelná a proto tento člen nebudeme v další diskusi uvažovat.

Vztahy (2.2.10) představují výchozí vztahy pro výpočet intenzity Ramanova rozptylu na daném vibračním přechodu. O tom, které členy budou dominantní, rozhoduje kromě druhu přechodu a symetrií zúčastněných vibrací i velikost frekvence budícího záření ν_0 s ohledem na vzdálenosti energetických hladin molekuly.

2.2.1 Nerezonanční přiblížení

Je-li frekvence budícího záření dostatečně vzdálená od frekvencí odpovídajících elektronové absorpci dané molekuly, lze užít tzv. nerezonanční přiblížení.

V tomto přiblížení zanedbáváme rozdíly v energiích jednotlivých elektronově vibračních stavů E_{eu} a přiřazujeme jim jednu hodnotu \bar{E}_e odpovídající poloze maxima absorpčního pásu elektronového přechodu.

$$\begin{aligned} \Delta E_{u1}^e &= E_{g\nu_1} - E_{eu} + h\nu_0 \approx \bar{E}_e + h\nu_0, \\ \Delta E_{u2}^e &= E_{g\nu_2} - E_{eu} - h\nu_0 \approx \bar{E}_e - h\nu_0. \end{aligned} \quad (2.2.1.1)$$

Potom bude

$$\left(A_{12}^R \right)_{ij} = \sum_e (D_e)_i (D_e)_j \sum_{\{u\}} \left\{ \frac{C_{u2}^e C_{u1}^e}{\bar{E}_e + h\nu_0} + \frac{C_{u2}^e C_{u1}^e}{\bar{E}_e - h\nu_0} \right\} = \sum_e (D_e)_i (D_e)_j \frac{2\bar{E}_e}{(\bar{E}_e)^2 - (h\nu_0)^2} \sum_{\{u\}} C_{u2}^e C_{u1}^e. \quad (2.2.1.2)$$

Protože ale vibrační vlnové funkce daného elektronového stavu tvoří úplný ortogonální systém, bude platit

$$\sum_{\{u\}} C_{u2}^e C_{u1}^e = \sum_{\{u\}} \langle \chi_g^{\nu_2}(R) | \chi_g^u(R) \rangle \langle \chi_g^u(R) | \chi_g^{\nu_1}(R) \rangle = \langle \chi_g^{\nu_2}(R) | \chi_g^{\nu_1}(R) \rangle = \delta_{\nu_1\nu_2}. \quad (2.2.1.3)$$

V nerezonančním přiblížení je tedy člen $(A_{12}^R)_{ij}$ pro Ramanův rozptyl nulový (nenulový je pouze pro elastický Rayleighův rozptyl). V případě Hezberg-Tellerova členu $(B_{12}^R)_{ij}$ dostáváme

$$\begin{aligned} \sum_{\{u\}} (G_{u2}^e)_p C_{u1}^e &= \sum_{\{u\}} \langle \chi_g^{\nu_2}(R) | (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p | \chi_e^u(R) \rangle \langle \chi_e^u(R) | \chi_e^{\nu_1}(R) \rangle = \langle \chi_g^{\nu_2}(R) | (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p | \chi_g^{\nu_1}(R) \rangle \\ \sum_{\{u\}} C_{u2}^e (G_{u1}^e)_p &= \sum_{\{u\}} \langle \chi_g^{\nu_2}(R) | \chi_e^u(R) \rangle \langle \chi_e^u(R) | (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p | \chi_g^{\nu_1}(R) \rangle = \langle \chi_g^{\nu_2}(R) | (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p | \chi_g^{\nu_1}(R) \rangle \end{aligned} \quad (2.2.1.4)$$

a tedy v nerezonanční aproximaci bude

$$(B_{12}^R)_{ij} = \sum_e \sum_p \frac{2\bar{E}_e}{(\bar{E}_e)^2 - (h\nu_0)^2} \left[((V_e)_p)_i (D_e)_j + (D_e)_i ((V_e)_p)_j \right] \langle \chi_g^{v_2}(R) | (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p | \chi_g^{v_1}(R) \rangle \quad (2.2.1.5)$$

Přejdeme nyní od okamžitých výchylek $\Delta\mathbf{R}$ k normálním souřadnicím Q_k

$$\Delta R_i^p = \sum_k L_i^{pk} Q_k \quad p=1,2,\dots,N \text{ (číslování jader)}, \quad i=x,y,z \text{ (číslování souřadnic)}.$$

Unimodulární matice \mathbf{L} udává transformaci souřadnic jaderných výchylek na normální vibrační

souřadnice plus 6 souřadnic udávajících polohu a orientaci molekuly jako celku a je tedy čtvercová.

Celkový vibrační stav je souhrnem kvantových čísel jednotlivých normálních módů a celková vibrační vlnová funkce součinem vibračních funkcí normálních módů, tedy

$$\chi_g^u = \prod_{a=1}^{3N-6} \xi_{u_a}^a(Q_a), \quad (2.2.1.6)$$

kde ξ_u^a jsou vlnové funkce a -tého normálního módu, tj. lineárního harmonického oscilátoru proměnné Q_a o frekvenci f_a v kvantovém stavu u_a .

Potom

$$\begin{aligned} (B_{12}^R)_{ij} &\approx \sum_k \left\langle \prod_a \xi_{v_2^k}^a(Q_a) | Q_k | \prod_a \xi_{v_1^k}^a(Q_a) \right\rangle \sum_{p,r} L_r^{pk} \sum_e \frac{2\bar{E}_e}{(\bar{E}_e)^2 - (h\nu_0)^2} \left[((V_e)_p)_i (D_e)_j + (D_e)_i ((V_e)_p)_j \right] \\ &= \sum_k \left\langle \xi_{v_2^k}^k(Q_k) | Q_k | \xi_{v_1^k}^k(Q_k) \right\rangle \prod_{a \neq k} \left\langle \xi_{v_2^a}^a(Q_a) | \xi_{v_1^a}^a(Q_a) \right\rangle \sum_{p,r} L_r^{pk} \sum_e \frac{2\bar{E}_e}{(\bar{E}_e)^2 - (h\nu_0)^2} \left[((V_e)_p)_i (D_e)_j + (D_e)_i ((V_e)_p)_j \right]. \end{aligned} \quad (2.2.1.7)$$

Tento výraz připouští pouze fundamentální přechody, tj. přechody, kdy $|v_2^k - v_1^k| = 1$ a

$$v_1^a = v_2^a \quad \forall a \neq k. \quad (2.2.1.8)$$

Z výrazu (2.2.1.7) je zřejmé, že v nerezonančním přiblížení je

$$B_{12}^R = B_{21}^R \quad (2.2.1.9)$$

a

$$(B_{12}^R)_{ij} = (B_{21}^R)_{ji}, \quad (2.2.1.10)$$

tj. symetrický tenzor. Frekvence přechodu se rozpadne na 2 části:

$$\begin{aligned} \nu &= \frac{E_2 - E_1}{h} = f_k \left[\left(\nu_1^k + 1 \right) + \frac{1}{2} \right] - f_k \left[\nu_1^k + \frac{1}{2} \right] = f_k & \text{Stokes} & \quad (E_2 > E_1) \\ \nu &= \frac{E_2 - E_1}{h} = f_k \left[\nu_1^k + \frac{1}{2} \right] - f_k \left[\left(\nu_1^k - 1 \right) + \frac{1}{2} \right] = f_k & \text{antiStokes} & \quad (E_2 < E_1) \end{aligned} \quad (2.2.1.11)$$

2.2.2 Rezonanční přiblížení

Při přibližování frekvence ν_0 budícího záření k frekvenci $(E_g - E_h)/h$ elektronového přechodu $g \leftrightarrow h$ dojde ve vztazích pro Ramanův tenzor (2.2.9) ke snížení jmenovatelů některých členů (tzv. rezonanční členy) termů A a B týkajících se rezonančního stavu h . U sledované čáry nastane prudké zvýšení intenzity rozptylu, pokud je účast dané vibrace v elektronově vibračních přechodech $g \leftrightarrow h$ povolena v Condonově aproximaci (A term) nebo je silná závislost elektronové části vlnové funkce molekuly ve stavu h na daném vibračním pohybu (B term).

V ostatních případech se intenzita čáry zřetelně nezvyšuje a čára zaniká v pozadí jiných rezonančně zesílených linií. Celkově se tedy při přibližování frekvence budícího záření k absorpční hraně intenzita Ramanova rozptylu zvyšuje a mění se i tvar spektra.

V rezonančním přiblížení (2.2.1.2) nabývá tvar

$$\left(A_{12}^R \right)_{ij} = (D_h)_i (D_h)_j \sum_{\{u\}} \frac{C_{u2}^h C_{u1}^h}{E_{g1} - E_{hu} + h\nu_0}, \quad (2.2.2.1)$$

kde

$$C_{uv}^h = \langle \chi_u^h(R) | \chi_v^h(R) \rangle \quad (2.2.2.2)$$

je Condonův překryvový integrál vibračních funkcí stavů u (v rezonančním excitovaném elektronovém stavu h) a v (v základním elektronovém stavu g) a

$$(D_h)_i = \langle \Phi_h(r, R_0) | \hat{D}_i^e | \Phi_g(r, R_0) \rangle_r \quad (2.2.2.3)$$

je maticový element dipólového momentu elektronového přechodu $g \leftrightarrow h$, a (2.2.1.7) nabývá tvar

$$\left(B_{12}^R \right)_{ij} = \sum_p \left((V_e)_p \right)_i (D_h)_j \sum_{\{u\}} \left[\frac{(G_{u2}^h)_p C_{u1}^h}{\Delta E_{u1}^e} \right] + \sum_p (D_h)_i \left((V_h)_p \right)_j \sum_{\{u\}} \left[\frac{(G_{u1}^h)_p C_{u2}^h}{\Delta E_{u1}^e} \right], \quad (2.2.2.4)$$

kde

$$\left((V_e)_p \right)_i = \left\langle \frac{\partial \Phi_h(r, R)}{\partial R_p} \Big|_{\mathbf{R}=\mathbf{R}_0} \hat{D}_i^e \Big| \Phi_g(r, R) \right\rangle \quad (2.2.2.5)$$

a

$$(G_{uv}^e)_p = \langle \chi_e^u(R) | (\mathbf{R} - \mathbf{R}_0)_p | \chi_g^v(R) \rangle \quad (2.2.2.6)$$

je maticový element operátoru výchylky jader mezi stavy hu a gv .

Dva členy A (2.2.2.1) a B (2.2.2.4) odpovídají dvěma mechanismům rezonančního zesílení (na rozdíl od nerezonančního přiblížení je člen A nenulový pokud jsou nenulové překryvové integrály $\langle \chi_h^u(R) | \chi_g^v(R) \rangle$ mezi vibračními funkcemi základního g a rezonančního excitovaného elektronového stavu h). To nastává v případě plně symetrických vibračních módů, pokud při přechodu ze základního do excitovaného elektronového stavu dojde k posunu minima (tj. ke změně rovnovážné konfigurace molekuly). V opačném případě (nulový posun minima) bude vždy jeden z činitelů součinu $C_{u2}^h C_{u1}^h$ a tudíž i celý člen A nulový.

V případě Condonova mechanismu rezonančního zesílení (člen A) nejsou kladeny žádné restriky na změnu vibračního kvantového čísla, v rezonančních Ramanových spektrech mohou být (a jsou) pozorovány posloupnosti vyšších harmonických vibračních přechodů, kdy relativní intenzity pásů v posloupnosti jsou dány pouze velikostí příslušných překryvových integrálů $\langle \chi_h^u(R) | \chi_g^v(R) \rangle$.

2.3 Symetrie a molekulové vibrace

Charakter vibračních módů molekuly je výsledkem určitých symetrií v jejím prostorovém uspořádání. Pro teoretické uchopení těchto vlastností byl v minulosti vypracován rozsáhlý matematický aparát [4] založený na teorii grup.

2.3.1 Operace symetrie a jejich vlastnosti

Operace symetrie (viz tabulka 1) převádějí molekulu do symetricky ekvivalentní polohy.

Tab. 1: Prvky, operátory a operace symetrií. Zdroj [2]

Prvky symetrie	Označení	Operátory symetrie	Označení	Operace symetrie
Identita	E	Operátor identity	$E(I)$	Identita
Rotační osa	C_n	Operátor rotace	C_n^k	rotace o úhel $\frac{2\pi k}{n}$ kolem C_n
Roviny symetrie	$\sigma_v, \sigma_h, \sigma_d$	Operátor zrcadlení	σ	zrcadlení v rovině $\sigma_v, \sigma_h, \sigma_d$
Střed symetrie	i	Operátor inverze	i	inverze vůči středu i
Rotačně reflexní osa	S_n	Operátor nevlastní rotace	S_n^k	kompozice C_n^k a σ v rovině kolmé k C_n

Uvedme si dále některé důležité vlastnosti operací symetrie

Rotace:

$$C_n^n = \underbrace{C_n C_n \dots C_n}_n = E$$

$$C_n^{-1} = C_n^{n-1}$$

$$\forall \frac{n}{l} \in \mathbb{Z}: C_n^{n/l} = C_l$$

z existence n -četné rotační osy vyplývá i existence n/l -četné rotační osy.

Reflexe:

$$P(x, y, z) \xrightarrow{\sigma(xy)} P(x, -y, z)$$

$$\sigma^2 = E$$

$$\sigma^{-1} = \sigma$$

σ_v – vertikální roviny symetrie (obsahují hlavní osu)

σ_h – horizontální roviny symetrie (kolmé na hlavní osu)

σ_d – vertikální roviny symetrie (obsahují hlavní osu – tj. osu s nejvyšší četností – a diagonální dvojčetnou osu)

Inverze:

$$P(x, y, z) \xrightarrow{i} P(-x, -y, -z)$$

$$i^2 = E$$

$$i^{-1} = i$$

Nevlastní rotace:

$$S_n = C_n \sigma_h = \sigma_h C_n$$

$$S_n^k = (C_n \sigma_h)^k = \begin{cases} C_n^k \sigma_h & \forall k \text{ liché} \\ C_n^k & \forall k \text{ sudé} \end{cases}$$

Kompozice operací symetrie

Skládání operací symetrie znamená jejich postupné provádění, přičemž obecně záleží na pořadí. Pro každou molekulu můžeme najít úplnou množinu navzájem různých operací symetrie, v níž libovolný součin dvou operací symetrie je opět nějakou operací z této množiny.

Operace symetrie každé molekuly tvoří tzv. **bodovou grupu symetrie** (bodovou proto, že alespoň jeden bod zůstává při aplikaci libovolné operace symetrie beze změny - všechny prvky symetrie dané molekuly se v tomto bodě protínají).

2.3.2 Grupové postuláty

Množina \mathfrak{S} prvků A, B, \dots, F, \dots tvoří grupu, je-li pro tuto množinu definována grupová operace $*$, která každé uspořádané dvojici prvků grupy \mathfrak{S} jednoznačně přiřazuje prvek $A * B = F$ tak, že jsou splněny následující 4 postuláty:

- 1) uzavřenost vůči grupové operaci
 $A * B = F \quad F \in \mathfrak{S}$
- 2) asociativní zákon
 $(A * B) * C = A * (B * C) = A * B * C \quad A, B, C \in \mathfrak{S}$
- 3) existence jednotkového prvku
 $\forall A \in \mathfrak{S} \exists E \in \mathfrak{S}: \quad A * E = E * A = A$
- 4) existence inverzního prvku
 $\forall A \in \mathfrak{S} \exists A^{-1} \in \mathfrak{S}: \quad A * A^{-1} = A^{-1} * A = E$

izomorfismus a homomorfismus grup

Mějme grupy $\mathfrak{S} = \{A, B, \dots, F, \dots\}$ a $\mathfrak{S}' = \{A', B', \dots, F', \dots\}$.

Lze-li mezi prvky obou grup stanovit vzájemně jednoznačné přiřazení

$A \leftrightarrow A', B \leftrightarrow B', \dots, F \leftrightarrow F', \dots$ takové, že ze vztahu $AB = F$ vyplývá $A'B' = F'$,

kde A, B a A', B' jsou libovolné dvojice grupových prvků, pak grupy \mathfrak{S} a \mathfrak{S}' jsou **izomorfní**.

Není-li vzájemná jednoznačnost přiřazení prvků grup \mathfrak{S} a \mathfrak{S}' zachována, jde o homomorfni přiřazení. Říkáme, že grupa \mathfrak{S} je **homomorfni** s grupou \mathfrak{S}' , když každému prvku $A \in \mathfrak{S}$ odpovídá právě jeden prvek $A' \in \mathfrak{S}'$ a každému prvku z \mathfrak{S}' odpovídá alespoň jeden prvek z \mathfrak{S}

2.3.3 Třídy konjugovaných prvků

Říkáme, že prvek A je konjugován s prvkem B grupy \mathfrak{S} , lze-li najít prvek S téže grupy takový, že platí

$$A = S^{-1} * B * S. \quad (2.3.3.1)$$

Je-li A konjugován s B , je i B konjugován s A .

Je-li kromě prvku A konjugován s B i prvek C téže grupy, potom i prvky A a C jsou navzájem konjugovány.

Množina vzájemně konjugovaných prvků se nazývá třída (konjugovaných) prvků.

Např. z tabulky 2 je zřejmé, že grupa C_{3v} se rozpadá na tři třídy (K_1, K_2, K_3) konjugovaných prvků.

Tab. 2: Multiplikační tabulka grupy C_{3v} . Zdroj [2]

X	$X^{-1}EX$	$X^{-1}C_3X$	$X^{-1}C_3^2X$	$X^{-1}\sigma_v X$	$X^{-1}\sigma_v' X$	$X^{-1}\sigma_v'' X$
E	E	C_3	C_3^2	σ_v	σ_v'	σ_v''
C_3	E	C_3	C_3^2	σ_v''	σ_v	σ_v'
C_3^2	E	C_3	C_3^2	σ_v'	σ_v''	σ_v
σ_v	E	C_3^2	C_3	σ_v	σ_v''	σ_v'
σ_v'	E	C_3^2	C_3	σ_v''	σ_v'	σ_v
σ_v''	E	C_3^2	C_3	σ_v'	σ_v	σ_v''
	$K_1 = \{ E \}$	$K_2 = \{ C_3, C_3^2 \}$		$K_3 = \{ \sigma_v, \sigma_v', \sigma_v'' \}$		

Obecně platí:

- (a) každá třída je jednoznačně určena svým libovolným prvkem,
- (b) grupa je sjednocením tříd konjugovaných prvků, přičemž tyto třídy jsou neprázdné a navzájem disjunktí,
- (c) třídy obsahují obecně různý počet prvků, přičemž počet prvků třídy je dělitelem řádu grupy.

2.3.4 Maticové reprezentace grup

Jestliže $\forall R \in \mathfrak{S}$ přiřadíme matici $\mathbf{D}(R)$ tak, že zobrazení $\mathfrak{S} \rightarrow \Gamma = \{\mathbf{D}(R)\}$ je homomorfní, pak grupa matic Γ je reprezentací grupy \mathfrak{S} .

Grupová operace v Γ je reprezentována operací násobení matic.

Báze reprezentace

například v trojdimenzionální bázi reprezentace $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ bude reprezentace Γ^x bodové grupy C_{2v} tvořena čtveřicí matic

$$\begin{aligned}
 E \rightarrow \mathbf{D}(E) &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & C_2 \rightarrow \mathbf{D}(C_2) &= \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\
 \sigma(xz) \equiv \sigma_v \rightarrow \mathbf{D}(\sigma_v) &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \sigma(yz) \equiv \sigma'_v \rightarrow \mathbf{D}(\sigma'_v) &= \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}
 \end{aligned} \tag{2.3.4.1}$$

jako jinou trojdimenzionální bázi můžeme použít vnitřní souřadnice (r_1, r_2, α) v této bázi bude reprezentace Γ^u bodové grupy C_{2v} tvořena dvěma maticemi

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \tag{2.3.4.2}$$

neboť

$$\begin{aligned}
 E: \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \alpha \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \alpha \end{pmatrix} & \sigma_v: \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \alpha \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} r_2 \\ r_1 \\ \alpha \end{pmatrix} \\
 C_2: \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \alpha \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} r_2 \\ r_1 \\ \alpha \end{pmatrix} & \sigma'_v: \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \alpha \end{pmatrix} &= \begin{pmatrix} r_1 \\ r_2 \\ \alpha \end{pmatrix}
 \end{aligned} \tag{2.3.4.3}$$

Ve vibrační spektroskopii hraje důležitou roli reprezentace Γ^{3N} (kde N je počet atomů v molekule) generovaná množinou jednotkových vektorů $3N$ jednotkových vektorů $(\mathbf{e}_1, \mathbf{e}_2, \mathbf{e}_3)$ (matice $3N \times 3N$).

pro molekulu vody (bodová grupa C_{2v}) bude maticová reprezentace Γ^{3N} tvořena maticemi

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}^{3N}(E) &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \mathbf{D}^{3N}(C_2) &= \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\
\mathbf{D}^{3N}(\sigma'_v) &= \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \mathbf{D}^{3N}(\sigma_v) &= \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}
 \end{aligned}$$

(2.3.4.4)

Lze se snadno přesvědčit, že uvedené čtyři matice tvoří reprezentaci grupy C_{2v} .

Maticové operátory symetrií

V trojdimenzionální bázi reprezentace $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ platí:

$$\begin{aligned}
 \mathbf{D}(E) &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \mathbf{D}(i) &= \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} & \mathbf{D}(\sigma_{xy}) &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \\
 \mathbf{D}(\sigma_{xz}) &= \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \mathbf{D}(\sigma_{yz}) &= \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} & \mathbf{D}(C_n) &= \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\
 \mathbf{D}(S_n) &= \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, & \alpha &= \frac{2\pi}{n}, & C_n, S_n \parallel z
 \end{aligned}$$

(2.3.4.5)

jsou ortogonální matice ($\mathbf{A}^{-1} = \mathbf{A}^T$).

2.3.5 Podobnostní transformace

Nechť \mathbf{X} , \mathbf{Y} jsou čtvercové matice téhož řádu. Existuje-li regulární matice \mathbf{S} taková, že platí

$$\mathbf{Y} = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{X}\mathbf{S}, \quad (2.3.5.1)$$

říkáme, že matice \mathbf{X} a \mathbf{Y} jsou podobné, a předchozí vztah nazýváme **podobnostní transformací**. Jestliže na všechny matice v maticové rovnici aplikujeme tutéž podobnostní transformaci, zůstává v platnosti i pro transformované matice. Je-li například

$$\mathbf{A}\mathbf{B} = \mathbf{C}, \quad \mathbf{A}' = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{S}, \quad \mathbf{B}' = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{B}\mathbf{S}, \quad (2.3.5.2)$$

potom

$$\mathbf{A}'\mathbf{B}' = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{S}\mathbf{S}^{-1}\mathbf{B}\mathbf{S} = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{B}\mathbf{S} = \mathbf{S}^{-1}\mathbf{C}\mathbf{S} = \mathbf{C}'. \quad (2.3.5.3)$$

Někdy je možno k dané čtvercové matici \mathbf{A} nalézt takovou podobnostní transformaci, která tuto matici převede na kvazidiagonální tvar:

$$\mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{S} = \mathbf{D},$$

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} \mathbf{D}_1 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \mathbf{D}_2 & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \mathbf{D}_n \end{pmatrix}, \quad (2.3.5.4)$$

kde $\mathbf{D}_1, \dots, \mathbf{D}_n$ jsou čtvercové submatice obecně různé dimenze. Podobné matice mají stejné stopy

$$\text{Tr } \mathbf{B} = \text{Tr } (\mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{S}) = \text{Tr } (\mathbf{S}^{-1}\mathbf{A})\mathbf{S} = \text{Tr } \mathbf{S}(\mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}) = \text{Tr } (\mathbf{S}\mathbf{S}^{-1}\mathbf{A}) = \text{Tr } \mathbf{A}. \quad (2.3.5.5)$$

Je-li matice \mathbf{D} direktním součinem matic $\mathbf{D}_1, \dots, \mathbf{D}_n$

$$\mathbf{D} = \bigoplus_i^n \mathbf{D}_i \quad (2.3.5.6)$$

pak zřejmě

$$\text{Tr } \mathbf{D} = \sum_i^n (\text{Tr } \mathbf{D}_i). \quad (2.3.5.7)$$

2.3.6 Charakter reprezentace

Stopu operátoru symetrie ve vybrané bázi nazýváme *charakterem reprezentace*.

V trojdimenzionální bázi $\mathbf{x} = (x_1, x_2, x_3)$ budou charaktery

$$\text{Tr } \mathbf{D}(E) = 3 \quad (\text{dimenze reprezentace}) \quad (2.3.6.1)$$

$$\text{Tr } \mathbf{D}(C_n) = 2 \cos \alpha + 1 \quad (2.3.6.2)$$

$$\text{Tr } \mathbf{D}(S_n) = 2 \cos \alpha - 1 \quad (2.3.6.3)$$

$$\text{Tr } \mathbf{D}(\sigma) = 1 \quad (2.3.6.4)$$

$$\text{Tr } \mathbf{D}(i) = -3 \quad (2.3.6.5)$$

Obecněji, vyjdeme-li z nějaké reprezentace grupy, můžeme sestrojít s pomocí podobnostní transformace nekonečně mnoho ekvivalentních reprezentací téže dimenze. Veličinou, která je invariantní vůči podobnostní transformaci je stopa matice, čili charakter.

Uvažujme reprezentaci $\Gamma\{\mathbf{D}(R)\}$ dimenze d , potom stopa matice $\mathbf{D}(R)$ se nazývá charakterem prvku R v reprezentaci Γ a značí se $\chi(R)$

$$\text{Tr } \mathbf{D}(R) = \sum_{k=1}^d D_{kk}(R) = \chi(R). \quad (2.3.6.6)$$

Množina čísel

$$\chi = \{\chi(R), R \in \mathfrak{S}\} \quad (2.3.6.7)$$

je charakterem reprezentace Γ .

Protože jednotkový prvek bodové grupy symetrie je vždy reprezentován jednotkovou maticí, je charakter prvku E vždy roven dimenzi reprezentace. Ukážeme, že charaktery prvků grupy, jež patří do stejné třídy konjugovaných prvků, jsou si rovny. Necht' prvky A, B téže třídy grupy \mathfrak{S} spolu souvisejí vztahem

$$A = S^{-1}BS, \quad (2.3.6.8)$$

kde S je nějaký prvek grupy \mathfrak{S} . Jsou-li $\mathbf{D}(A), \mathbf{D}(B), \mathbf{D}(S)$ odpovídající matice libovolné reprezentace grupy \mathfrak{S} , musí splňovat podmínku

$$\mathbf{D}(A) = [\mathbf{D}(S)]^{-1} \mathbf{D}(B) \mathbf{D}(S). \quad (2.3.6.9)$$

S použitím vlastnosti stopy $\text{Tr}(\mathbf{AB}) = \text{Tr}(\mathbf{BA})$ dostáváme

$$\text{Tr } \mathbf{D}(A) = \text{Tr } \mathbf{D}(B). \quad (2.3.6.10)$$

2.3.7 Reducibilní a ireducibilní reprezentace

Mějme reprezentaci $\Gamma = \{\mathbf{D}(R)\}$ grupy $\mathfrak{S} = \{R\}$. Předpokládejme, že platí vztah

$$\mathbf{D}(A)\mathbf{D}(B) = \mathbf{D}(C). \quad (2.3.7.1)$$

Nechť \mathbf{X} je libovolná regulární čtvercová matice téhož řádu jako $\mathbf{D}(R)$.

S pomocí podobnostní transformace zkonstruujeme matice

$$\bar{\mathbf{D}}(A) = \mathbf{X}^{-1}\mathbf{D}(A)\mathbf{X} \quad \bar{\mathbf{D}}(B) = \mathbf{X}^{-1}\mathbf{D}(B)\mathbf{X}. \quad (2.3.7.2)$$

Snadno ověříme, že pro tyto matice platí stejná multiplikační tabulka jako pro matice původní

$$\bar{\mathbf{D}}(A)\bar{\mathbf{D}}(B) = \mathbf{X}^{-1}\mathbf{D}(A)\mathbf{X}\mathbf{X}^{-1}\mathbf{D}(B)\mathbf{X} = \mathbf{X}^{-1}\mathbf{D}(AB)\mathbf{X} = \mathbf{X}^{-1}\mathbf{D}(C)\mathbf{X} = \bar{\mathbf{D}}(C). \quad (2.3.7.3)$$

To ale znamená, že množina matic $\bar{\Gamma} = \{\bar{\mathbf{D}}(R)\}$ je rovněž reprezentací původní grupy.

Říkáme, že reprezentace Γ a $\bar{\Gamma}$ jsou *ekvivalentní*. Naopak dvě libovolné reprezentace téže grupy jsou neekvivalentní, neexistuje-li žádná podobnostní transformace, která by převáděla jednu reprezentaci v druhou.

Lze ukázat, že je možno najít takovou matici \mathbf{X} , která by převáděla libovolnou matici reprezentace Γ , např. matici $\mathbf{D}(A)$, na kvazidiagonální tvar

$$\mathbf{D}(A) = \begin{pmatrix} \mathbf{D}_1(A) & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \mathbf{D}_2(A) & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \mathbf{D}_n(A) \end{pmatrix}. \quad (2.3.7.4)$$

Má-li matice $\mathbf{D}(A)$ takovou strukturu, potom z pravidel o násobení matic plyne:

1. Všechny matice reprezentace lze stejnou podobnostní transformací (pomocí stejné matice \mathbf{X}) převést na kvazidiagonální tvar. Takto získané matice mají stejnou blokovou strukturu.

2. Pro submatice ve stejnohlých blocích platí též pravidla pro násobení jako pro původní matice $\mathbf{D}(A), \mathbf{D}(B), \mathbf{D}(C), \dots$, tj. je-li splněna rovnice (2.3.7.1), budou splněny i rovnice

$$\begin{aligned} \bar{\mathbf{D}}_1(A)\bar{\mathbf{D}}_1(B) &= \bar{\mathbf{D}}_1(C) \\ \bar{\mathbf{D}}_2(A)\bar{\mathbf{D}}_2(B) &= \bar{\mathbf{D}}_2(C) \\ \bar{\mathbf{D}}_3(A)\bar{\mathbf{D}}_3(B) &= \bar{\mathbf{D}}_3(C) \\ &\vdots \\ \bar{\mathbf{D}}_n(A)\bar{\mathbf{D}}_n(B) &= \bar{\mathbf{D}}_n(C) \end{aligned} \quad (2.3.7.5)$$

To však neznamená nic jiného, než že množiny submatic $\{\bar{\mathbf{D}}_1(R)\}, \{\bar{\mathbf{D}}_2(R)\}, \{\bar{\mathbf{D}}_3(R)\}, \dots, \{\bar{\mathbf{D}}_n(R)\}$ rovněž tvoří reprezentace grupy \mathfrak{S} . Tímto způsobem jsou matice vyšších řádů **redukovány** na matice nižších řádů. V případě, že taková podobnostní transformace existuje, říkáme, že reprezentace Γ je **reducibilní** (redukovatelná), v opačném případě se nazývá **ireducibilní** (neredukovatelná).

Důležité věty pro ireducibilní reprezentace

- 1) Počet neekvivalentních ireducibilních reprezentací grupy se rovná počtu tříd konjugovaných prvků grupy.
- 2) Součet čtverců dimenzí všech neekvivalentních ireducibilních reprezentací Γ^α grupy se rovná řádu grupy

$$\sum_{\alpha} d_{\alpha}^2 = g \quad (2.3.7.6)$$

- 3) Součet čtverců absolutních hodnot charakterů všech prvků grupy v libovolné ireducibilní reprezentaci Γ^α se rovná řádu grupy

$$\sum_R |\chi^{\alpha}(R)|^2 = g \quad (2.3.7.7)$$

- 4) Charaktery dvou neekvivalentních ireducibilních reprezentací Γ^α a Γ^β splňují vztah ortogonality pro charaktery

$$\sum_R \chi^{\alpha}(R) \chi^{\beta}(R) = 0 \quad (2.3.7.8)$$

- 5) Jestliže charaktery $\chi^{\alpha}(R)$ prvků $R \in \mathfrak{S}$ reprezentace Γ^α splňují rovnici (2.3.7.7), potom Γ^α je ireducibilní reprezentací. Proto se tato rovnice označuje jako kritérium ireducibility. V případě reducibilní reprezentace vždy platí

$$\sum_R |\chi^{\alpha}(R)|^2 > g . \quad (2.3.7.9)$$

2.3.8 Analýza reducibilní reprezentace

Nechť

$$\mathbf{D}(R) = \begin{pmatrix} \mathbf{D}^1(R) & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \mathbf{D}^2(R) & \cdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & \mathbf{D}^{\alpha}(R) \end{pmatrix}. \quad (2.3.8.1)$$

Matice $\{\mathbf{D}^{\alpha}(R)\}$ $R \in \mathfrak{S}$ tvoří opět reprezentaci Γ^α grupy \mathfrak{S} .

Předpokládejme, že Γ^α jsou ireducibilní. Potom

$$\chi(R) = \text{Tr } \mathbf{D}(R) = \sum_{\alpha} [\text{Tr } \mathbf{D}^{\alpha}(R)] = \sum_{\alpha} \chi^{\alpha}(R). \quad (2.3.8.2)$$

Ekvivalentní reprezentace mají stejné charaktery:

$$\chi(R) = \sum_{\alpha} a_{\alpha} \chi^{\alpha}(R), \quad (2.3.8.3)$$

kde koeficient a_{α} udává, kolikrát je Γ^{α} obsažena v reducibilní reprezentaci Γ . Tyto veličiny vyjádříme pomocí $\chi(R)$ a $\chi^{\alpha}(R)$:

$$\sum_R \chi(R) \chi^{\beta}(R)^* = \sum_R \sum_{\alpha} a_{\alpha} \chi^{\beta}(R)^* \chi^{\alpha}(R) = \sum_{\alpha} a_{\alpha} \sum_R \chi^{\beta}(R)^* \chi^{\alpha}(R) = g a_{\alpha}, \quad (2.3.8.4)$$

čili

$$a_{\alpha} = \frac{1}{g} \sum_R \chi(R) \chi^{\alpha}(R)^* = \frac{1}{g} \sum_{K_i} n(K_i) \chi(K_i) \chi^{\alpha}(K_i)^*, \quad (2.3.8.5)$$

kde $n(K_i)$ udává počet prvků třídy K_i (využíváme faktu, že charaktery prvků grupy, jež patří do stejné třídy konjugovaných prvků, jsou si rovny).

Tab. 3: Označení ireducibilních reprezentací bodových grup symetrie. Zdroj [2]

Symbol reprezentace			Dimenze reprezentace = $\chi(E)$	
A, B			1	
E			2	
T nebo F			3	
A		symetrická	Vůči rotaci o úhel $2\pi/n$ kolem hlavní osy	$\chi(C_n) = +1$
B		antisymetrická		$\chi(C_n) = -1$
Horní index	'	symetrická	Vůči σ_h	$\chi(\sigma_h) = +1$
	''	antisymetrická		$\chi(\sigma_h) = -1$
1. dolní index	1	symetrická	Vůči σ_v	$\chi(\sigma_v) = +1$
	2	antisymetrická		$\chi(\sigma_v) = -1$
2. dolní index	g	symetrická	Vůči i	$\chi(i) = +1$
	u	antisymetrická		$\chi(i) = -1$

2.3.9 Charakter reprezentace Γ^{3N}

Abychom mohli určit a_α , musíme nejprve určit $\chi(R)$ respektive $\chi(K_i) \forall R$ respektive K_i . Platí: jestliže nějaký atom v molekule a jemu příslušející vektory báze reprezentace mění při aplikaci operace symetrie svoji polohu v prostoru, pak těmto vektorům odpovídají v $\mathbf{D}^{3N}(R)$ nulové diagonální maticové elementy.

Jinými slovy: pouze vektory umístěné na atomech, které zůstaly při působení operace symetrie R beze změny, mohou mít nenulový příspěvek k charakteru dané operace symetrie v reprezentaci Γ^{3N} .

Postup při výpočtu charakterů reprezentace Γ^{3N} je následující:

1. Určit počet atomů invariantních vůči dané operaci symetrie (stačí udělat pro jednotlivé třídy konjugovaných prvků). Prakticky: leží-li atom na prvku symetrie (rovině, rotační ose, ...), potom je vůči této operaci invariantní.
2. Spočítat příspěvek od jednoho invariantního atomu $\chi^0(R)$ pro každou operaci symetrie (třídu).

Tab. 4: Tabulka charakterů reprezentace Γ^{3N} . Zdroj [2]

R	$\chi^0(R)$
C_n^k	$2 \cos \frac{2\pi k}{n} + 1$
S_n^k	$2 \cos \frac{2\pi k}{n} - 1$
E	$\chi^0(C_1)$
σ	$\chi^0(S_1)$
i	$\chi^0(S_2)$

2.3.10 Molekula H_2O

Tab. 5: Bodová grupa C_{2v} , 3 atomy, 3 vibrační stupně volnosti. Zdroj [2]

C_{2v}	E	C_2	$\sigma(xz)$	$\sigma(yz)$		
A_1	1	1	1	1	z, x, y, z	
A_2	1	1	-1	-1	xy	R_z
B_1	1	-1	1	-1	x, xz	R_y
B_2	1	-1	-1	1	y, yz	R_x
n_R	3	1	1	3		
$\chi^0(R)$	3	-1	1	1		
$\chi(R)$	9	-1	1	3		

Redukce:

$$\begin{aligned}a_{A_1} &= \frac{1}{4}[9-1+1+3] = 3, \\a_{A_2} &= \frac{1}{4}[9-1-1-3] = 1, \\a_{B_2} &= \frac{1}{4}[9+1+1-3] = 2, \\a_{B_2} &= \frac{1}{4}[9+1-1+3] = 3.\end{aligned}\tag{2.3.10.1}$$

Tedy

$$\Gamma^{3N} = 3A_1 \oplus A_2 \oplus 2B_1 \oplus 3B_2.\tag{2.3.10.2}$$

Protože

$$\Gamma^{3N} = \Gamma^{trans} \oplus \Gamma^{rot} \oplus \Gamma^{vib},\tag{2.3.10.3}$$

máme

$$\Gamma^{vib} = \Gamma^{3N} - (A_1 \oplus A_2 \oplus 2B_1 \oplus 2B_2) = 2A_1 \oplus B_2.\tag{2.3.10.4}$$

Aktivita: A_1 (IČ, Raman), B_2 (IČ, Raman).

2.3.11 Normální vibrace a normální souřadnice

Teorie malých kmitů molekul vychází z jednoduchého modelu, v němž atomy (hmotné body) kmitají okolo rovnovážných poloh.

V dvouatomové molekule je potenciální energie $V(r)$ vyjádřena vztahem

$$V(r) = \frac{1}{2}k(r-r_0)^2,\tag{2.3.11.1}$$

kde r_0 je rovnovážná mezijaderná vzdálenost a k je silová konstanta.

Energie vibračních hladin dvouatomové molekuly je v aproximaci harmonického oscilátoru kvantována a určena vztahem

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right)h\nu = \left(v + \frac{1}{2}\right)\hbar\nu\sqrt{\frac{k}{\mu}},\tag{2.3.11.2}$$

kde v je vibrační kvantové číslo nabývající hodnot 0, 1, 2, 3, ..., h je Planckova konstanta, ν je frekvence vibrace a μ je redukovaná hmotnost.

V případě víceatomové molekuly můžeme potenciální energii vyjádřit pomocí Taylorova rozvoje

$$V = V_0 + \sum_i \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 q_i + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) q_i q_j + \dots \quad (2.3.11.3)$$

kde V_0 značí potenciální energii rovnovážného stavu molekuly (a pokládáme ji za rovnu nule), druhý člen je roven nule, což odpovídá podmínce pro minimum energie

$$\left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 = 0, \quad (2.3.11.4)$$

q_i jsou souřadnice výchylek z rovnovážné polohy.

Označíme-li druhé parciální derivace ve třetím členu rozvoje k_{ij} (*silové konstanty*) a omezíme-li se pouze na první tři členy (harmonická aproximace), potom dostáváme

$$V_{ij} = \frac{1}{2} \sum_{i,j} k_{ij} q_i q_j. \quad (2.3.11.5)$$

Počet vibračních stupňů volnosti N -atomové nelineární (respektive lineární) molekuly je

$$3N - 6 \quad \text{resp.} \quad 3N - 5. \quad (2.3.11.6)$$

Neboť 3 stupně volnosti připadají na translaci molekuly jako celku a 3 (respektive 2) na její rotaci.

Vnitřní pohyb vibrující molekuly není jednoduchý harmonický pohyb, ale lze jej rozložit na jednoduché harmonické vibrační pohyby – tzv. *normální vibrace* nebo *normální vibrační mody* molekuly. Každému z nich přísluší v dané molekule určitá frekvence. Počet normálních vibrací odpovídá počtu vibračních stupňů volnosti.

Zavedeme *normální souřadnice*: předpokládejme, že existují souřadnice Q_i takové, že hamiltonián pro vibrační pohyb víceatomové molekuly může být vyjádřen pomocí čtverců těchto souřadnic a jejich derivací

$$\hat{H}_v = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \frac{\partial^2}{\partial Q_i^2} + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \lambda_i Q_i^2, \quad (2.3.11.7)$$

kde λ_i jsou konstanty. Schrödingerovu rovnici pro vibrační pohyb molekuly

$$\hat{H}_v \chi_v = E_v \chi_v, \quad (2.3.11.8)$$

kde E_v je celková vibrační energie a χ_v je celková vibrační vlnová funkce, lze separovat na $3N - 6$ rovnic (v případě nelineární molekuly)

$$-\frac{\hbar^2}{2} \frac{\partial^2 \chi_{v_i}^i}{\partial Q_i^2} + \frac{1}{2} \lambda_i Q_i^2 \chi_{v_i}^i(Q_i) = E_{v_i} \chi_{v_i}^i(Q_i) \quad i = 1, 2, \dots, 3N - 6 \quad (2.3.11.9)$$

přičemž celková vibrační energie je rovna součtu vlastních hodnot E_{v_i} a vibrační vlnová funkce molekuly je součinem vibračních funkcí $\chi_{v_i}^i(Q_i)$

$$E_v = \sum_{i=1}^{3N-6} E_{v_i}, \quad (2.3.11.10)$$

$$\chi_v = \prod_{i=1}^{3N-6} \chi_{v_i}^i(Q_i).$$

Rovnice (2.3.11.9) má tvar rovnice harmonického oscilátoru, a tedy vibrační energie E_{v_i} pro jednotlivé normální vibrace jsou dány vztahem

$$E_{v_i} = \left(v_i + \frac{1}{2} \right) h\nu_i, \quad (2.3.11.11)$$

kde v_i je vibrační kvantové číslo a ν_i je vibrační frekvence i -té normální vibrace odpovídající normální souřadnici Q_i , přičemž

$$\nu_i = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\lambda_i}. \quad (2.3.11.12)$$

Vibrační vlnové funkce mají tvar

$$\chi_{v_i}^i(\xi_i) = N_{v_i} H_{v_i}(\xi_i) \exp\left(-\frac{1}{2}\xi_i^2\right) \quad \text{kde} \quad \xi_i = \lambda_i^{1/4} Q_i \quad (2.3.11.13)$$

kde $H_{v_i}(\xi_i)$ je Hermitův polynom stupně v_i .

2.3.12 Typy vibračních přechodů

V základním stavu budou všechna vibrační kvantová čísla rovna nule. Přechody mezi základní vibrační hladinou a jednou excitovanou hladinou

$$\begin{matrix} v_m \\ (0, 0, \dots, 0, \dots, 0) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} v_m \\ (0, 0, \dots, 1, \dots, 0) \end{matrix} \quad (2.3.12.1)$$

se nazývají **fundamentální**; odpovídající pás v Ramanově nebo infračerveném spektru se nazývá fundamentální pás. Kdyby harmonická aproximace platila striktně, byly by povoleny pouze fundamentální přechody. Díky anharmonicitě vibrací reálné molekuly jsou však povoleny i další typy vibračních přechodů – **vyšší harmonické**

$$\begin{matrix} v_m \\ (0, 0, \dots, 0, \dots, 0) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} v_m \\ (0, 0, \dots, n, \dots, 0) \end{matrix} \quad n = 2, 3, \dots \quad (2.3.12.2)$$

a **kombinační**

$$\begin{matrix} v_m & v_n \\ (0, 0, \dots, 0, \dots, 0, \dots, 0) \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} v_m & v_n \\ (0, 0, \dots, 1, \dots, 1, \dots, 0) \end{matrix} \quad (2.3.12.3)$$

2.3.13 Symetrie vlnových funkcí fundamentálních stavů

Vibrační vlnová funkce pro systém $3N - 6$ normálních souřadnic Q_i má v harmonické aproximaci tvar

$$\chi_{\{v_i\}} = N \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \lambda_i^{1/2} Q_i^2\right) \prod_{i=1}^{3N-6} H_{v_i}(\lambda_i^{1/4} Q_i). \quad (2.3.13.1)$$

V základním stavu je $v_i = 0$ pro všechna i , a tedy

$$\chi_{\{0\}} = N \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \lambda_i^{1/2} Q_i^2\right), \quad (2.3.13.2)$$

kde N je normalizační konstanta. Pro vlnovou funkci k -tého fundamentálního stavu platí

$$\chi_{\{0, \dots, 1, \dots, 0\}} \sim \chi_{\{0\}} H_1(\lambda_k^{1/4} Q_k) \sim \chi_{\{0\}} Q_k. \quad (2.3.13.3)$$

Z tohoto vztahu plyne, že vibrační vlnová funkce k -tého fundamentálního stavu a k -tá normální souřadnice Q_k mají stejné transformační vlastnosti.

Vibrační Ramanův přechod ze základního do i -tého fundamentálního stavu je dovolený jen tehdy, když jeden ze šesti integrálů

$$\int \chi_{\{0\}} \alpha_{kl} \chi_{\{i\}} \quad k, l = x, y, z \quad (2.3.13.4)$$

je nenulový.

Integrál bude nenulový (a tedy $0 \rightarrow i$ bude dovolený přechod), pokud bude integrand totálně symetrický, tj. když charakter reprezentace

$$\Gamma(\chi_{\{0\}}) \otimes \Gamma(\alpha_{ik}) \otimes \Gamma(\chi_{\{i\}}). \quad (2.3.13.5)$$

je roven jedné pro všechny prvky bodové grupy symetrie dané molekuly.

Ze vztahu (2.3.13.2) je zřejmé, že vibrační vlnová funkce základního stavu $\chi_{\{0\}}$ je vždy plně symetrická. Z podmínky, aby integrand (2.3.13.4) byl plně symetrický, potom plyne, že součin $\alpha_{kl} \chi_{\{i\}}$ musí být rovněž plně symetrický a tedy že funkce α_{kl} a $\chi_{\{i\}}$ musí mít stejnou symetrii, tj. musí patřit téže ireducibilní reprezentaci.

Lze odvodit, že α_{kl} se transformuje stejným způsobem (tj. přísluší téže ireducibilní reprezentaci bodové grupy symetrie dané molekuly) jako kvadratická funkce kartézských souřadnic (například α_{xx} jako x^2 , α_{yz} jako yz atd.).

Má-li tedy normální vibrace tutéž symetrii jako jeden z výrazů x^2, xy, \dots, z^2 uvedených v tabulce charakterů bodové grupy symetrie molekuly, potom fundamentální přechod $0 \rightarrow i$ bude v Ramanově spektru aktivní.

2.3.14 Vylučovací pravidlo

Obecně lze říci, že vibrační přechod může být aktivní jak v infračerveném, tak i v Ramanově spektru nebo jenom v jednou z nich popřípadě může být zcela inaktivní. V případě molekul se středem symetrie však platí vylučovací pravidlo (alternativní zákaz): žádná vibrace nemůže být aktivní v obou spektrech současně.

Kartézské souřadnice jsou totiž vždy antisymetrické vůči inverzi (vibrace typu u), zatímco funkce x^2, xy , atd. jsou vždy symetrické (vibrace typu g). Toto se využívá při řešení molekulové struktury. Dochází-li ke shodě v nějaké vibrační frekvenci molekuly jak v IČ, tak i v Ramanově spektru, nemá molekula střed symetrie, a naopak.

2.4 Poměr signál/šum v Ramanově spektroskopii

Jelikož je Ramanův signál velmi slabý, zpravidla o 6 řádů slabší nežli budící signál, je dosažení dostatečného poměru signál/šum, významně ovlivňujícího kvalitu experimentálních dat, v Ramanově spektroskopii obzvláště náročné a je třeba mu věnovat velikou pozornost [2]. Poměr signál/šum (SRN) je definován vztahem

$$SRN = \frac{\bar{S}}{\sigma_y}, \quad (2.4.1)$$

kde \bar{S} je střední výška ramanovského pásu nad pozadím a

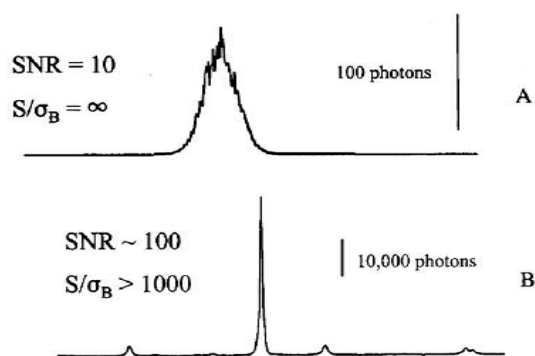
$$\sigma_y = \sqrt{S + B + \phi_d(T) + \sigma_F^2 + \sigma_r^2} \quad (2.4.2)$$

je standardní odchylka výšky pásu, přičemž S je výstřelový šum signálu, B je výstřelový šum pozadí, $\phi_d(T)$ je temný signál detektoru, σ_F je mihotavý šum, σ_r je šum odečtu.

Vliv výstřelového šumu (který nastává u vzorků s fluoreskujícími příměsemi, kdy slabý Ramanův pás je překryt vysokým pozadím), na SNR je limitován výrazem

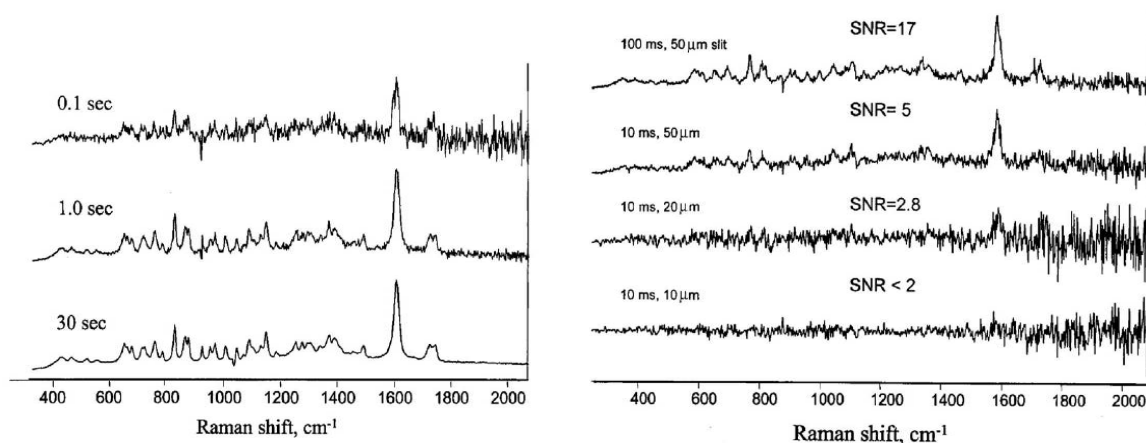
$$SNR_B = \frac{S}{\sigma_B} = \frac{t \frac{dS}{dt}}{\sqrt{t \frac{dB}{dt}}} = \frac{\sqrt{t} \frac{dS}{dt}}{\sqrt{\frac{dB}{dt}}}. \quad (2.4.3)$$

Šum pozadí nelze odečíst a příliš vysoké pozadí může způsobit, že signál nebude možné pozorovat. Pomoci může zvýšení signálu+pozadí např. delší akumulací



Obr. 2: Závislost poměru signál/šum na počtu detekovaných fotonů. Zdroj [2]

Kromě samotné intenzity ramanovského signálu, ovlivnitelné např. výkonem budícího laseru, volenou excitační frekvencí a kvalitou justace celé aparatury, je SRN rovněž výrazně ovlivněn šířkou vstupní štěrbinu spektrometru a dobou akumulace signálu, jak dokládají obrázky 3.



Obr. 3: Vlevo: Zlepšení SRN s rostoucí dobou akumulace je způsobeno poklesem výstřelového šumu Vpravo: SRN klesající se zkracující se dobou akumulace signálu a se snižující se šířkou vstupní štěrbinu. Zdroj [2]

2.5 Metody zpracování spekter

Na závěr teoretické části jsou uvedeny složitější matematické postupy, zavedené na pracovišti [3], které byly používány při zpracování experimentálních dat.

2.5.1 Metoda ortogonálních diferencí

Metoda ortogonálních diferencí je vhodná pro eliminaci nežádoucích spektrálních složek v Ramanových spektrech při jejich kvantitativní analýze. Pro její použití je nutné, aby všechna spektra byla vyjádřena v m stejných spektrálních bodech. V následujících odstavcích vysvětlíme princip metody. Se spektry se zachází jako s m -dimenzionálními vektory. Skalární součin dvou spekter **A** a **B** označený $\{A, B\}$ odpovídá standardnímu násobení po složkách. Změřené spektrum **R** je možno rozdělit na součet dvou spekter **S** a **N** :

$$\mathbf{R} = \mathbf{S} + \mathbf{N} . \quad (2.5.1.1)$$

kde složka \mathbf{S} představuje užitečné spektrum. Abychom jej mohli využít pro kvantitativní analýzu, je nutno ze změřeného spektra \mathbf{R} eliminovat nežádoucí spektrální příspěvek \mathbf{N} . K tomu je právě možné použít metodu ortogonálních diferencí. Ortogonální diferenci $(\mathbf{A})_{\text{OD}}$ spektra \mathbf{A} vůči ortonormální bázi \mathbf{O}_k ($k = 1 \dots s$) definujeme jako:

$$(\mathbf{A})_{\text{OD}} = \mathbf{A} - \sum_{k=1}^s \{\mathbf{A}, \mathbf{O}_k\} \mathbf{O}_k. \quad (2.5.1.2)$$

Ortogonalní diference změřeného spektra \mathbf{R} vůči obecné ortonormální bázi bude součtem ortogonalizovaného spektra \mathbf{S} a ortogonalizovaného spektra \mathbf{N} :

$$(\mathbf{R})_{\text{OD}} = (\mathbf{S})_{\text{OD}} + (\mathbf{N})_{\text{OD}}. \quad (2.5.1.3)$$

Bázi pro ortogonální diferenci volíme tak, aby vymizela složka $(\mathbf{N})_{\text{OD}}$:
Toho lze dosáhnout tehdy, jestliže platí:

$$\mathbf{N} = \sum_{k=1}^s \{\mathbf{N}, \mathbf{O}_k\} \mathbf{O}_k, \quad (2.5.1.4)$$

t.j. parazitní složka \mathbf{N} musí být lineární kombinací spekter \mathbf{O}_k ($k = 1 \dots s$) ortonormální báze, vůči které ortogonalizaci provádíme. Spektrum \mathbf{N} můžeme psát jako lineární kombinaci určitého počtu nežádoucích spekter. Ortogonalizační bázi pak snadno sestavíme, pokud známe spektra těchto nežádoucích složek. Po seřazení těchto složek aplikujeme Gram-Schmidtův ortogonalizační proces, čímž dostaneme ortonormální bázi vektorů \mathbf{O}_k .

Pomocí ortogonalizace se zcela zbavíme parazitní složky \mathbf{N} ze spektra \mathbf{R} za cenu ortogonalizace spektrální složky \mathbf{S} . Spektrum $(\mathbf{S})_{\text{OD}}$ není obecně totožné se spektrem \mathbf{S} a jeho tvar závisí na bázi, vůči které ortogonalizujeme.

Ilustrujme si proto nyní na jednoduchém problému důležitou vlastnost ortogonalizovaných spekter. Mějme směs, v níž jsou zastoupeny určité známé komponenty, ale jejich poměrné zastoupení ve směsi neznáme. Předpokládáme přitom, že tyto komponenty spolu vzájemně neinteragují. Pokud známe Ramanovo spektrum směsi a jejich jednotlivých složek \mathbf{S}_i ($i = 1 \dots n$) (všechna spektra normujeme na jednotkovou koncentraci), pak můžeme určit poměrné zastoupení složek a_i ve směsi ze vztahu:

$$\mathbf{S} = \sum_{i=1}^n a_i \mathbf{S}_i. \quad (2.5.1.5)$$

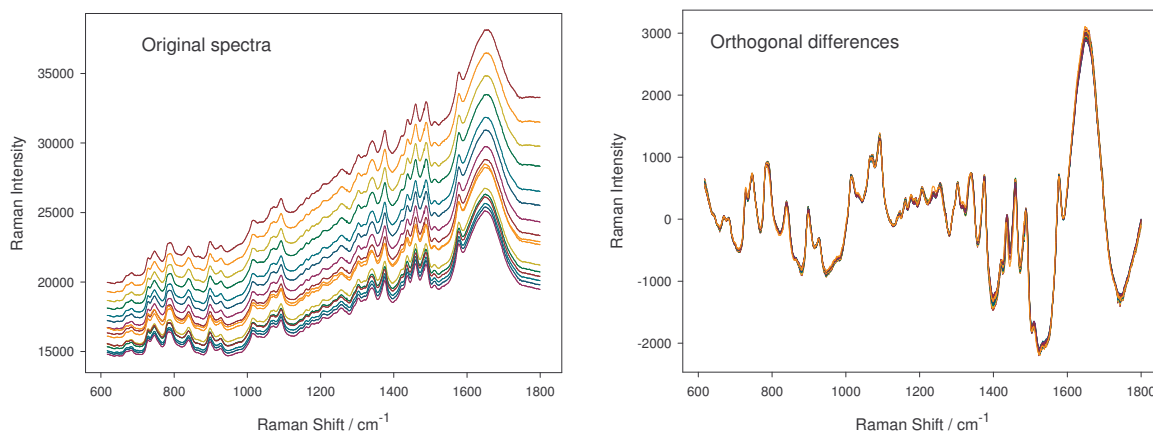
Změřená Ramanova spektra však neodpovídají skutečným spektrům \mathbf{S} a \mathbf{S}_i , neboť obsahují především nežádoucí příspěvek fluorescenčního pozadí, temnotní signál, spektrum rozpouštědla, stopy parazitního signálu ze stěn kyvety, atd. Pro určení poměrného zastoupení složek ve směsi tedy nelze vztah (2.5.1.5) přímo použít, protože nemáme k dispozici spektra \mathbf{S} , ale naměřená spektra \mathbf{R} , pro která platí:

$$(\mathbf{R} - \mathbf{N}) = \sum_{i=1}^n a_i (\mathbf{R}_i - \mathbf{N}_i). \quad (2.5.1.6)$$

Ortogonalní diferencí naměřených spekter vůči vhodné bázi lze ale přejít k ortogonalizovaným spektrům $(\mathbf{R})_{\text{OD}}$ a $(\mathbf{R}_i)_{\text{OD}}$. Z definice (2.5.1.2), vztahu (2.5.1.3) a (2.5.1.5) plyne, že pro ortogonalizovaná spektra platí:

$$(\mathbf{R})_{\text{OD}} = (\mathbf{S})_{\text{OD}} = \sum_{i=1}^n a_i (\mathbf{S}_i)_{\text{OD}} = \sum_{i=1}^n a_i (\mathbf{R}_i)_{\text{OD}}, \quad (2.5.1.7)$$

kde koeficienty a_i jsou stejné jako ve vztahu (2.5.1.5). Jelikož se ortogonalizací zachovávají lineární vztahy mezi spektry, je možné určit zastoupení složek ve směsi přechodem od naměřených spekter k ortogonalizovaným spektrům bez nutnosti ručního odečtu nežádoucích příspěvků od jednotlivých naměřených spekter.



Obr. 4: Grafická demonstrace výsledku metody ortogonálních diferencí. Vpravo originální série naměřených spekter Ramanova rozptylu, vlevo ortogonální diference vůči obecné polynomiální funkci pátého stupně. Zdroj [5]

2.5.2 Faktorová analýza

Faktorová analýza je statistická metoda, která umožňuje charakterizovat objemné série dat pomocí několika málo společných faktorů a eliminovat tak bez ztráty užitečné informace jejich velikost [11]. V dnešní době nachází uplatnění v řadě spektroskopických metod ke zpracování sérií spekter, které většinou odpovídají jednomu, případně dvěma systematicky se měnícím parametrům. V našem případě jsme faktorovou analýzu aplikovali na sérii mnoha Ramanových spekter získaných v různých časech nebo pro různou kompozici rozpoštědla. Faktorovou analýzu je možné provádět pomocí několika různých postupů, které však poskytují ekvivalentní výsledky. Patří sem například algoritmus PCA (principal component analysis) nebo SVD (singular value decomposition).

Uvažujme matici \mathbf{A} typu $m \times n$. Algoritmus PCA je založen na diagonalizaci matice $\mathbf{Y}^T \mathbf{Y}$. Platí:

$$\mathbf{Q}^{-1} (\mathbf{Y}^T \mathbf{Y}) \mathbf{Q} = \mathbf{B}, \quad (2.5.2.1)$$

kde \mathbf{Q} je ortogonální matice sestavená z vlastních vektorů matice $\mathbf{Y}^T \mathbf{Y}$. Pomocí matice \mathbf{Q} lze ortogonální transformací převést matici $\mathbf{Y}^T \mathbf{Y}$ na diagonální matici \mathbf{B} . Algoritmus SVD rozkládá matici \mathbf{Y} typu $m \times n$ ($m \geq n$) na součin tří matic. Platí:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \mathbf{W} \mathbf{V}^T, \quad (2.5.2.2)$$

kde \mathbf{U} je ortogonální sloupcová matice typu $m \times n$, \mathbf{V} je ortogonální matice typu $n \times n$ a \mathbf{W} je diagonální matice $n \times n$ s nezápornými prvky. Diagonální prvky matice \mathbf{W} se nazývají singulární hodnoty. Součin matic se uvádí většinou tak, aby singulární hodnoty byly uspořádány sestupně na diagonále. Vztah mezi SVD a PCA lze vyjádřit jako:

$$\mathbf{Y}^T \mathbf{Y} = (\mathbf{U} \mathbf{W} \mathbf{V}^T)^T \mathbf{U} \mathbf{W} \mathbf{V}^T = \mathbf{V} \mathbf{W} \mathbf{U}^T \mathbf{U} \mathbf{W} \mathbf{V}^T = \mathbf{V} \mathbf{W}^2 \mathbf{V}^T. \quad (2.5.2.3)$$

Tedy platí:

$$\mathbf{W}^2 = \mathbf{B}, \quad \mathbf{V} = \mathbf{Q}, \quad \mathbf{U} = \mathbf{Y} \mathbf{V} \mathbf{W}^{-1}. \quad (2.5.2.4)$$

Algoritmus SVD je v porovnání s metodou PCA preferovaným algoritmem díky numerické stabilitě umožňující aplikaci na řadu různých problémů, přesnosti a možnosti použití i na velmi objemná data. Pro zpracování dat v rámci diplomové práce byl použit právě program založený na algoritmu SVD.

Dané spektrum po kalibraci představuje soubor m dvojic zahrnujících vlnočety a odpovídající intenzitu (maximálně 1024 dvojic bodů vzhledem k typu použitého CCD čipu s 1024×256 detekčními elementy. Data je nutno upravit tak, aby každé spektrum bylo definováno ve stejném spektrálním rozsahu a pro stejné hodnoty vlnočtů. Intenzity n změřených spekter pak seřadíme do sloupců, které tvoří matici \mathbf{Y} typu $m \times n$. Tuto matici lze rozložit pomocí vztahu (2.5.2.2) a maticový součin přepsat do složkového tvaru:

$$Y_i(v_r) = \sum_{j=1}^n W_j V_{ij} U_j(v_r) \quad r=1 \dots m, \quad i=1 \dots n, \quad j=1 \dots n \quad (2.5.2.5)$$

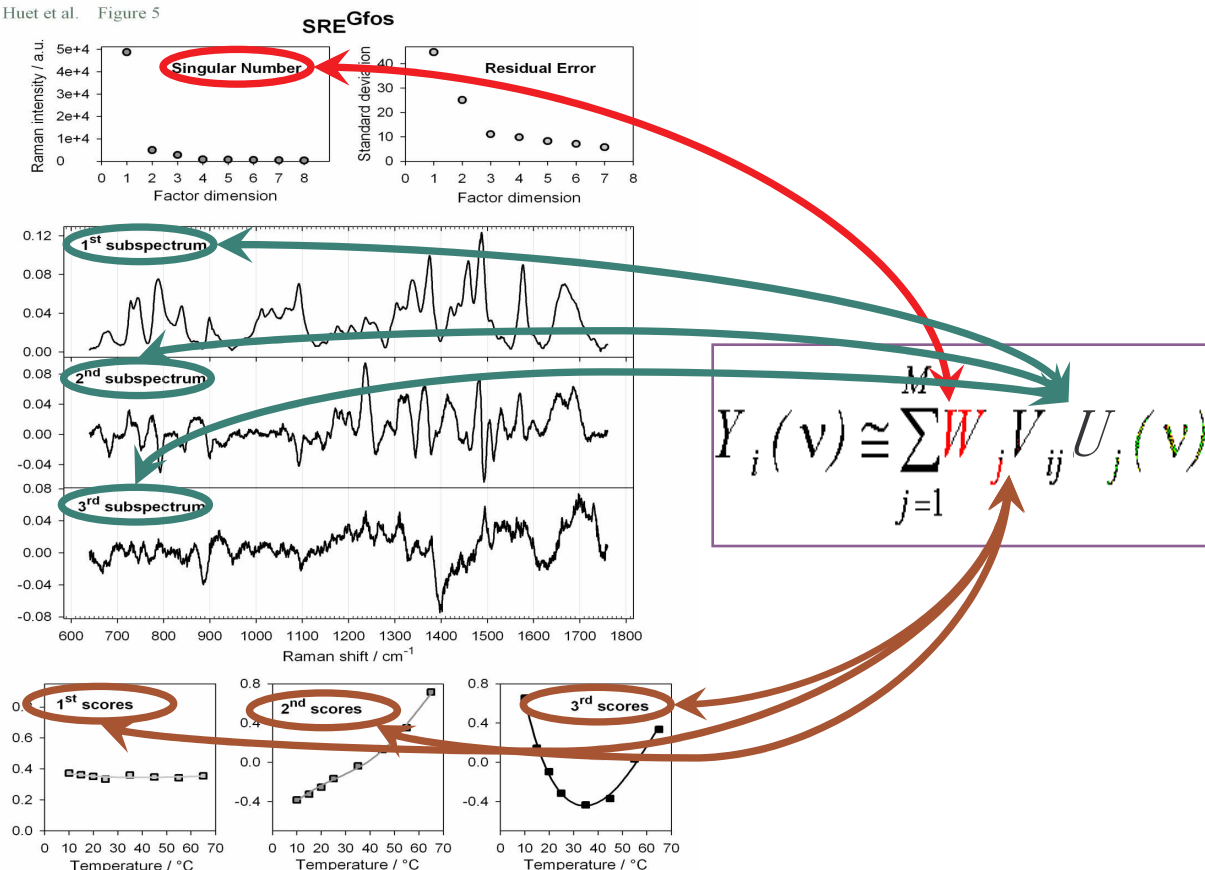
kde $Y_i(v_r)$ značí prvek v r -tém řádku a i -tém sloupci matice \mathbf{Y} (dle zavedené notace pak značí hodnotu intenzity i -tého spektra pro vlnočety v_r), W_j jsou singulární hodnoty diagonální matice \mathbf{W} , V_{ij} značí prvek v i -tém řádku a j -tém sloupci matice \mathbf{V} a $U_j(v_r)$ prvek matice \mathbf{U} v r -tém řádku a j -tém sloupci.

Dané i -té spektrum $Y_i(v_r)$ ($r = 1 \dots m$) lze napsat jako lineární kombinaci n spektrálních komponent (subspekter), přičemž j -té subspektrum je j -tým sloupcovým vektorem matice \mathbf{U} ($U_j(v_r)$, $r = 1 \dots m$). Z ortogonality matice \mathbf{U} plyne, že subspektra jsou ortogonální

$$\sum_{r=1}^m U_i(v_r) U_j(v_r) = \delta_{ij}. \quad (2.5.2.6)$$

Koeficienty příslušné lineární kombinace subspekter do daného i -tého spektra jsou dány prvky i -tého řádku matice \mathbf{V} . Příslušné j -té subspektrum je ale ještě násobeno váhovým faktorem W_j (pro další úvahy se předpokládá varianta sestupného uspořádání singulárních hodnot na diagonále matice \mathbf{W}).

Huet et al. Figure 5



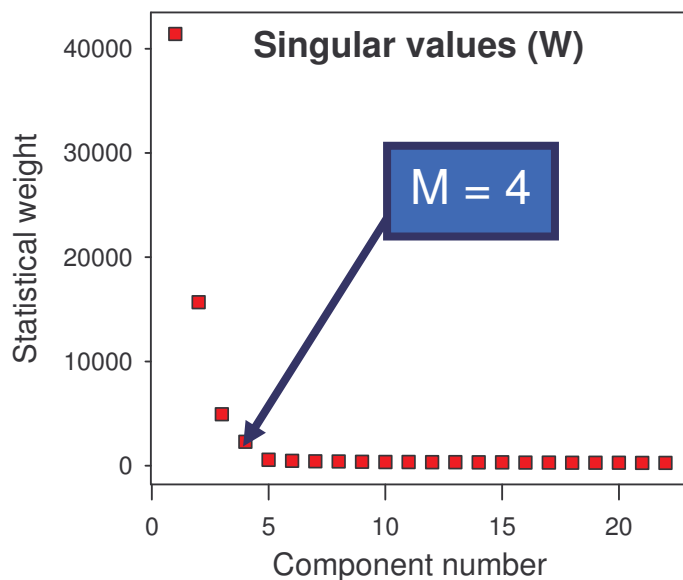
Obr. 5: Grafické znázornění výsledků metody SVD, aplikované na sérii teplotně závislých spekter Ramanova rozptylu. Zdroj [5], použitá experimentální data z [12].

Dá se ukázat, že vyjádření experimentálních spekter pouze pomocí prvního subspektra aproximuje spektrální sadu jedním spektrem nejlepším možným způsobem ve smyslu metody nejmenších čtverců. Pomocí prvního subspektra tak popíšeme nejdůležitější společné charakteristiky spekter. Pomocí druhého subspektra pak popíšeme nejlepším možným způsobem ty změny ve spektrech, které nejsou popsány prvním subspektrům (optimalizujeme ve smyslu metody nejmenších čtverců rozdíl originálních spekter a spekter vyjádřených pomocí prvního subspektra). Obdobně postupujeme k vyšším subspektrům, přičemž z ortogonality subspekter plyne, že každé z nich nese nezávislou informaci. Čím větší počet subspekter se v sumaci (2.5.2.5) uvažuje, tím lépe jsou pomocí faktorové analýzy experimentální spektra aproximována. Pomocí všech subspekter popíšeme naše data přesně, ale nedojde tím k redukci jejich objemu. Ve skutečnosti je ale každé fyzikální měření zatíženo šumem, který pro nás nenese užitečnou informaci. V případě Ramanova rozptylu se jedná především o Poissonovský šum, který je úměrný druhé odmocnině velikosti signálu. Smysl faktorové analýzy spočívá v redukci dat tím, že se omezíme ve vztahu (2.5.2.5) na lineární kombinaci pouze několika prvních subspekter. Vyšší subspektra, která popisují malé spektrální změny v důsledku šumu, vyloučíme. V případě časových závislostí Ramanových spekter nukleových kyselin bylo možno všechna experimentální spektra z dané teplotní série (v některých případech i stovka spekter) dobře aproximovat maximálně pěti subspektry. Zbylá subspektra popisovala šum.

Experimentální chybu naměřených dat můžeme porovnat s tzv. reziduální chybou, která je funkcí pokusné faktorové dimenze (počtu uvažovaných subspekter) M a je dána vztahem:

$$\sigma_r(M) = \sqrt{\frac{\sum_{j=d+1}^n (W_j)^2}{m(n-M)}}, \quad (2.5.2.7)$$

kde m je počet spektrálních bodů a n celkový počet spekter. Skutečná faktorová dimenze je pak dána jako minimální hodnota M , při níž reziduální chyba převyšuje chybu experimentální. V praxi ale většinou experimentální chybu určit neumíme. Faktorovou dimenzi pak často určujeme z hodnoty M , kde strmá závislost daná vztahem (2.5.2.7) přechází v pozvolně klesající lineární závislost. Často však bereme do úvahy menší počet subspekter, než je odpovídající hodnota faktorové dimenze. V tom případě neuvažujeme subspektra, která popisují různé těžko interpretovatelné jevy ve vzorku. Může jít o různé artefakty jako nepatrný posun kalibrace, vliv fluorescenčních příměsí atd. Často tyto jevy můžeme zanedbat díky tomu, že odpovídající subspektra mají velmi malou statistickou váhu (singulární hodnotu).



Obr. 6: Způsoby určování faktorové dimenze. Zdroj [5]

2.5.3 Zpracování výsledků faktorové analýzy

Samotná faktorová analýza umožňuje zredukovat experimentální data a konvertovat je do dobře matematicky zpracovatelné formy, ale ještě neposkytuje rozklad naměřených spekter do čistých spektrálních složek. To je náplní následného matematického zpracování. Uvažujme sérii n Ramanových spekter s -složkové směsi, přičemž podíl každé z nich odpovídá určitému systematicky se měnícímu parametru. Může jít například o sérii Ramanových spekter změřených v různých časech. Předpokládejme, že každé spektrum směsi \mathbf{Y}_i ($i = 1 \dots n$) můžeme vyjádřit ve tvaru lineární kombinace spekter \mathbf{Z}_p jejich jednotlivých složek, normovaných na jednotkovou koncentraci:

$$\mathbf{Y}_i = \sum_{p=1}^s C_{ip} \mathbf{Z}_p, \quad (2.5.3.1)$$

kde C_{ip} odpovídá molární koncentraci p -té složky v i -tém spektru směsi. Předpokládejme, že každé složce přísluší unikátní Ramanovo spektrum a koncentrace žádné ze složek není velmi malá za všech podmínek, kdy byla spektra měřena. Potom, pokud je počet naměřených spekter n větší nebo alespoň roven počtu složek směsi s , bude v ideálním případě faktorová dimenze rovna s , takže můžeme každé spektrum směsi \mathbf{Y}_i vyjádřit pomocí lineární kombinace s subspekter \mathbf{U}_j z faktorové analýzy (viz vztah (2.5.2.5)):

$$Y_i(\nu_r) = \sum_{j=1}^s W_j V_{ij} U_j(\nu_r) \quad r=1\dots m, \quad i=1\dots n. \quad (2.5.3.2)$$

Ze vztahů (2.5.3.1) a (2.5.3.2) plyne, že také spektra složek směsi \mathbf{Z}_p můžeme psát jako lineární kombinaci s subspekter:

$$Z_p(\nu_r) = \sum_{j=1}^s R_{pj} U_j(\nu_r). \quad (2.5.3.3)$$

Koeficienty R_{pj} ve vztahu (2.5.3.2) odpovídají zastoupení j -tého subspektra ve spektru p -té složky směsi a definují tzv. „rotační matici“. Pokud nalezneme rotační matici, můžeme z výsledků faktorové analýzy směsi rekonstruovat spektra jejích složek \mathbf{Z}_p . Ze vztahů (2.5.3.1), (2.5.3.2) a (2.5.3.3) můžeme ihned psát:

$$\mathbf{Y}_i = \sum_{p=1}^s \sum_{j=1}^s C_{ip} R_{pj} \mathbf{U}_j = \sum_{j=1}^s W_j V_{ij} \mathbf{U}_j \quad i=1\dots n \quad (2.5.3.4)$$

Vzhledem k ortonormalitě subspekter vyplývá z (2.5.3.4)

$$\sum_{p=1}^s C_{ip} R_{pj} = W_j V_{ij} \quad i=1\dots n \quad j=1\dots s \quad (2.5.3.5)$$

Vztah (2.5.3.5) představuje přeúřčenou soustavu $s \times n$ lineárních rovnic pro nalezení $s \times s$ koeficientů rotační matice R_{pj} , známe-li koncentrace složek v jednotlivých spektrech. Hledání spekter složek směsi lze v tomto případě převést na hledáním minima součtů čtverců odchylek q_j nezávisle pro každý index j

$$q_j = \sum_{i=1}^n \left(\sum_{p=1}^s C_{ip} R_{pj} - W_j V_{ij} \right)^2 \quad j=1\dots s \quad (2.5.3.6)$$

Obdobný postup můžeme aplikovat i tehdy, kdy koncentrace komponent C_{ip} v jednotlivých spektrech neznáme, ale dokážeme je popsat vhodným modelem vystihujícím jejich závislost na vnějších podmínkách. Tento model přitom může obsahovat několik předem neznámých parametrů, které lze za příznivých okolností fitem rovněž určit. V tomto případě musíme minimalizovat celkový součet čtverců odchylek, který podle toho, jak chceme odlišit význam subspekter s rostoucím pořadovým číslem, může být v jednom z následujících tvarů:

$$Q_a = \sum_{j=1}^s q_j = \sum_{j=1}^s \sum_{i=1}^n \left(\sum_{p=1}^s C_{ip} R_{pj} - W_j V_{ij} \right)^2, \quad (2.5.3.7)$$

$$Q_b = \sum_{j=1}^s \frac{q_j}{\sqrt{W_j}} = \sum_{j=1}^s \sum_{i=1}^n \left(\sum_{p=1}^s \frac{C_{ip} R_{pj}}{\sqrt{W_j}} - \sqrt{W_j} V_{ij} \right)^2, \quad (2.5.3.8)$$

$$Q_c = \sum_{j=1}^s \frac{q_j}{W_j} = \sum_{j=1}^s \sum_{i=1}^n \left(\sum_{p=1}^s \frac{C_{ip} R_{pj}}{W_j} - V_{ij} \right)^2. \quad (2.5.3.9)$$

3. Použité vzorky, experimentální zařízení a postup měření

3.1. Vzorky

Ve všech sériích měření byla používána ultračistá voda (H_2O , vodivost menší než $18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) a D_2O od firmy Aldrich s izotopovou čistotou 99%. Dále byl použit práškový cytosin od firmy Calbiochem v kvalitě A-grade a práškový uridin od firmy Aldrich v 99 % čistotě. Pro zjednodušení Ramanových spekter i substancí podílejících se na proton-deuteronové výměně nebyly použity pufrы, ale vzorky byly přímo rozpouštěny do čisté vody. Hodnota pH (pD) byla kontrolována pH-metrem a v případě potřeby dostavena na hodnoty v rozmezí pH 6,5 – 7,0 přidáním malého množství HCl . Titrace byla prováděna pomocí dávkovače Pipetman P1000 (Gilson), který byl zkalibrován pro používané objemy pomocí analytických vah.

3.2. Zpracování dat

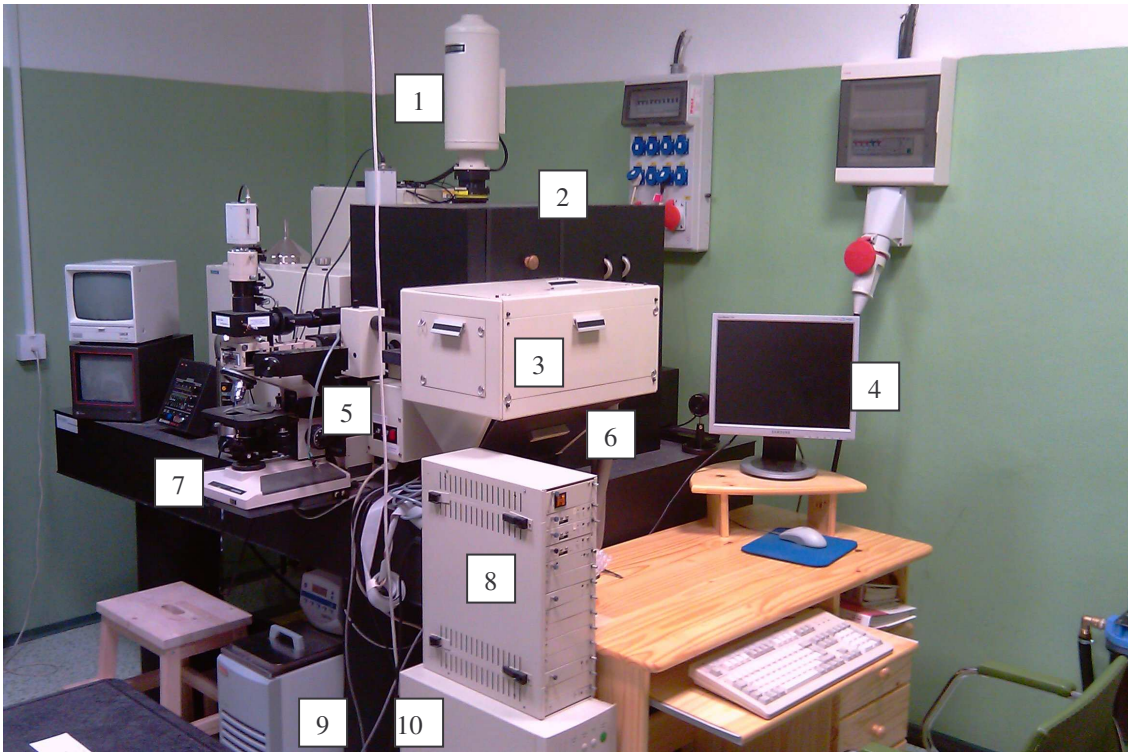
Prováděné experimenty spočívaly zpravidla v získávání velkých sérií Ramanových spekter. Tato spektra byla nejprve zkalibrována ve vlnočtové škále pomocí spektra kalibrační neonové výbojky, sejmuté při stejném nastavení mřížky před samotným měřením (podrobnosti viz dále). Pro kvantitativní analýzu byla spektra upravována korekcí na pozadí aproximovaného zpravidla polynomy 1. nebo 2. stupně, případně ortogonalizací vůči spektru rozpouštědla. Následně jsme na upravená spektra aplikovali faktorovou analýzu, konkrétně metodu SVD (singular value decomposition). Výsledky SVD jsme poté interpretovali buď přímo, nebo byly fitované pro získání spekter jednotlivých molekulárních forem. Výsledná spektra se pak ještě upravovala na reálný průběh pozadí.

3.3. Ramanův spektrometr

Tato práce se prováděla na spektrometru T64000 (ISA Jobin-Yvon), který byl jako starší (uvedení do chodu v roce 1994) získán darem z laboratoře prof. H. Welfleho v Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin v Berlíně. Jedná se o komplexní Ramanův spektrometr vybavený hlavním monochromátorem o ohniskové délce 650 mm osazeném holografickými mřížkami o hustotách vrypů 900 a 1800 cm^{-1} a dvěma předmonochromátory, které mohou být zpřažené v subtraktivní i aditivní konfiguraci. Zároveň je možné pracovat jen s hlavním monochromátorem a elastický rozptyl potlačovat pomocí holografických zářezových (notch) filtrů (Kaiser).

Jako excitační zdroj spektrometru slouží výkonový Ar^+ laser Innova 90-5 (Coherent). Spektrometr obsahuje 2 měřicí místa, z nichž jedno (vzorková komora) je určeno pro Ramanovu spektroskopii makrovzorků umístěných v kyvetách, druhou pak tvoří mikroskop Olympus BH2-UMA, umožňující Ramanovu spektroskopii mikrovzorků na základě zpětného rozptylu v konfokálním mikroskopu. Hlavním detekčním systémem je CCD detektor s 1024×256 detekčními elementy chlazený tekutým dusíkem na teplotu okolo 150 K.

Řízení spektrometru, sběr a základní manipulaci s daty zajišťuje počítač na úrovni Pentium® vybavený operačním systémem Windows 95. Počítač komunikuje s řídicí jednotkou CCD detektoru a dále s dálkově ovladatelnými prvky spektrometru (nastavení mřížek, překlápění poloh vnitřních zrcadel a nastavení šířek některých štěrbin) pomocí bloku rozhraní Spectralink. Po inicializaci systému pomocným programem Hwinit lze řízení spektrometru a sběr dat ovládat pomocí softwaru LabSpec. Uspořádání spektrometru je zachyceno na obrázcích 7 a 8. Pro účely diplomové práce byl spektrometr využíván s měřením ve vzorkové komoře a v módu jednoduchého monochromátoru.



Obr. 7: Ramanův spektrometr T64000 (s úpravami provedenými v rámci této diplomové práce - viz dále). 1. CCD detektor s Dewarovou nádobou na kapalný dusík. 2. Světlotěsný kryt světlosběrné optické dráhy spektrometru. 3. Vzorková komora. 4. Monitor řídicího počítače. 5. Blok zrcadel a šedých filtrů pro excitační záření. 6. Spodní světlotěsný kryt vzorkové komory. 7. Mikroskop. 8. Blok rozhraní. 9. Kapalinový termostat. 10. Řídicí počítač spektrometru.



Obr. 8: Ramanův spektrometr T64000 v činnosti, s odkrytovanou vzorkovou komorou

4. Testování a úpravy spektrometru

Jedním z úkolů diplomové práce bylo otestování funkce spektrometru a provedení drobných úprav, které by umožňovaly jeho bezproblémové použití v podmínkách laboratoře sdílené s jinými zařízeními. Dalším úkolem se stala konstrukce termostatovaného držáku kyvet.

4.1 Řídící počítač a nastavování excitační dráhy

S ohledem na nutnou kompatibilitu s firemním softwarem a bloku jednotek rozhraní pro řízení spektrometru nebylo bohužel možné modernizovat řídicí počítač. Proto byl alespoň osazen plochým LCD displejem, který umožňuje operativní manipulaci při sledování tvaru spektra při justaci a podařilo se opravit síťové připojení, což umožňuje předávání dat po síti (počítač nemá USB výstup). Na těchto úpravách se významně podíleli doc. P. Praus a Mgr. J. Vachoušek z FÚ MFF UK.

Původní systém spektrometru používal šedé filtry v excitační dráze pouze k zeslabení intenzity záření při měření pomocí mikroskopu. Pro zajištění bezpečné manipulace při justaci ve vzorkové komoře bylo proto ovládání šedých filtrů přepojeno na externí přepínač, aby se umožnilo dle potřeby zeslabit excitační laserový svazek bez ohledu na používané měřící místo.

4.2 Přídavné světlotěsné kryty spektrometru

Jelikož je spektrometr umístěn v laboratoři, v níž není z provozních důvodů žádoucí úplné zatemnění, ukázala se nutnost dodatečného zakrytování vzorkové komory a především prostoru světlosběrné části spektrometru.

Vzorková komora má kompletní světlotěsné zakrytování shora a ze stran, ale ne zespodu. Proto jsem vyrobil jednoduchý světlotěsný kryt na spodní část vzorkové komory, který zapadá do profilu na spodní straně komory, což umožňuje jeho snadné nasazování a vyjímání. Později jsem tento kryt opatřil výřezy pro hadice a tepelné čidlo termostatu.

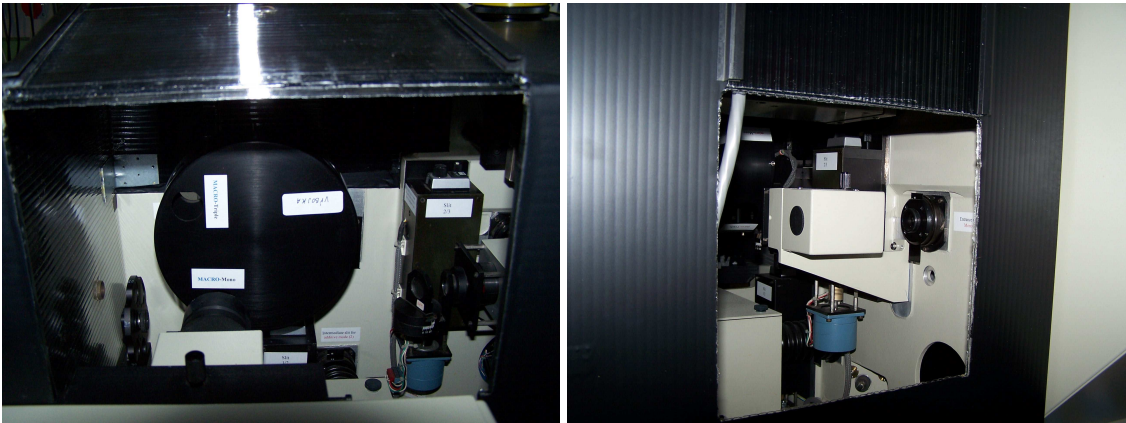
Náročnější byl světlotěsný kryt světlosběrné dráhy, který musí zakrývat prostor mezi vzorkovou komorou, výstupem mikroskopu a vstupními štěrbinami spektrometru. Konstrukční návrh tohoto krytu jsem vypracoval na počátku června 2009 a na konci téhož měsíce byl kryt kompletně dokončen a instalován. Kryt (viz obrázky 9, 10, 11) je vyroben z makrolonových desek spojených navzájem kovovými spojkami a je potažen světlotěsnou samolepící tapetou. Je vybaven bezpečnostním kovovým obložáním otvorů pro vstup a výstup laserového svazku, jakož i světelného kužele kalibrační výbojky, které zabraňuje možnosti tepelného poškození krytu, popř. vzniku požáru. Dále jsou zde manipulační otvory opatřené dvířky, umožňující přístup k ručně ovládaným prvkům spektrometru v tomto prostoru, jako je karusel s šedými filtry kalibrační výbojky (viz dále), přepínač světlosběrné optické dráhy, holografický filtr, vstupní štěrbina hlavního monochromátoru, apod.



Obr. 9: Světlotěsný kryt spektrometru – celkový pohled



Obr. 10: Vstupní otvor laserového svazku a světelného kuželu kalibrační výbojky ve světlotěsném krytu



Obr. 11: Otevřená přední (vlevo) a boční (vpravo) manipulační dvířka ve světlotěsném krytu umožňují přístup k ručně ovládaným prvkům spektrometru

4.3 Spektrální kalibrace

Základní kalibrace spektrometru je prováděna pomocí mechanického ukazatele polohy držáku mřížky, jehož údaje je možné ručně vložit do programu LabSpec. Tato hodnota není však příliš přesná; například při překlepu v zadávané vlnové délce může dojít ke značnému posunu tohoto ukazatele po dojetí mřížky na mechanickou zarážku. Aktuální oprava k údajům mechanického ukazatele je $-50,5 \text{ \AA}$.

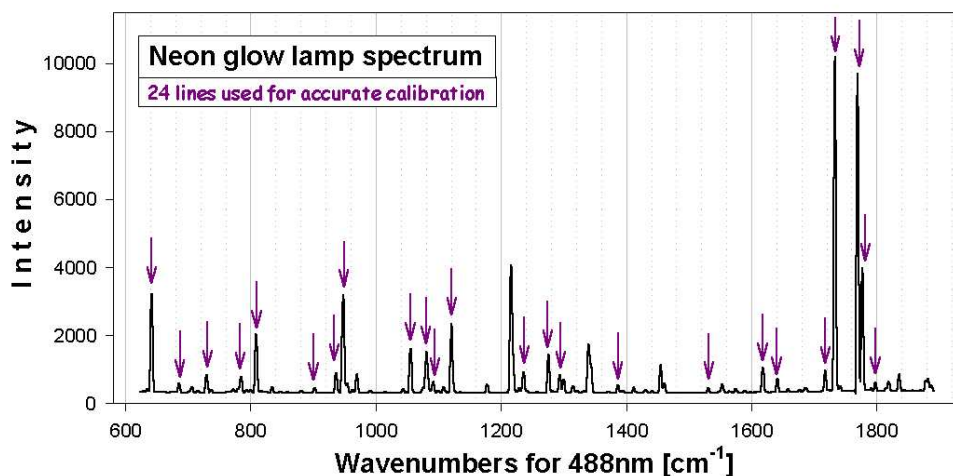
Proto se, stejně jako u jiných Ramanových spektrometrů na oddělení, přistoupilo k instalaci kalibrační neonové výbojky (UVP), viz obr. 12. Ta byla umístěna do tubusu původně určeného pro výstup záření z mikroskopu, takže karuselem se zrcadly pro přepínání světlosběrné dráhy může být její záření snadno přeměřované do hlavního monochromátoru. S ohledem na vysokou intenzitu záření v některých spektrálních oblastech byl před výbojkou instalován otočný držák s šedými filtry.

V červnu 2009 jsem proměřil spektrum neonové výbojky v širokém rozsahu od 200 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} a na základě těchto výsledků upravil doc. J. Bok z FÚ MFF UK svůj kalibrační program pro účely našich měření jako BERKAL2. Později vytvořil modifikaci umožňující použít jedno kalibrační spektrum pro sérii Ramanových spekter pod názvem BERKAL3.



Obr. 12: Kalibrační neonová výbojka

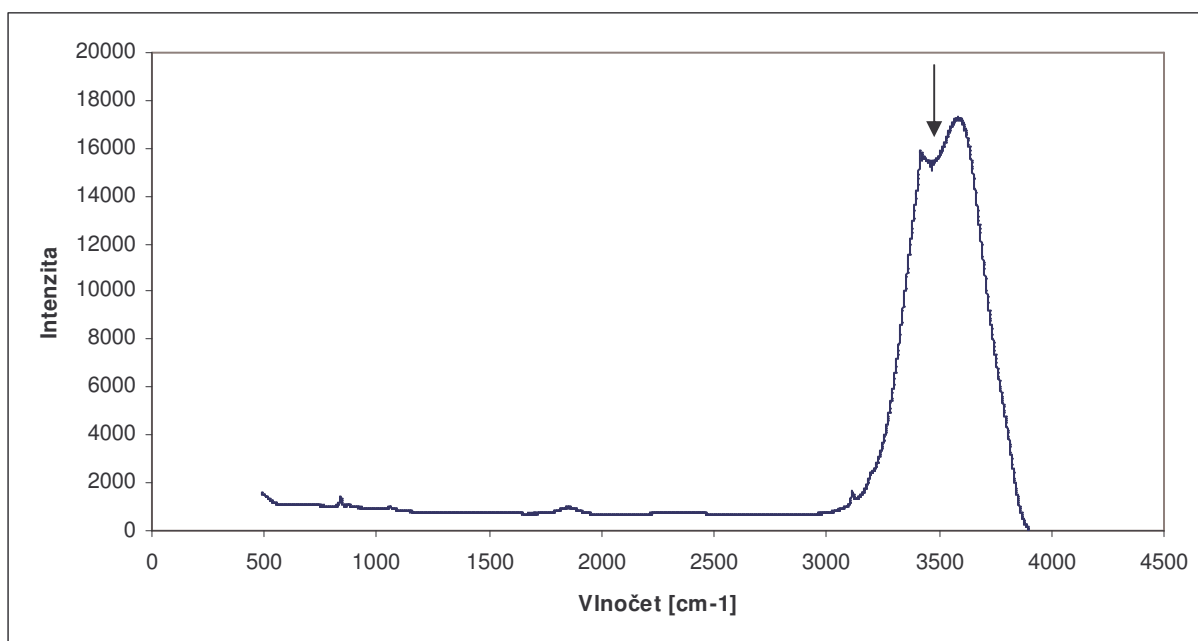
Část spektra neonové výbojky si můžeme prohlédnout na obrázku 13.



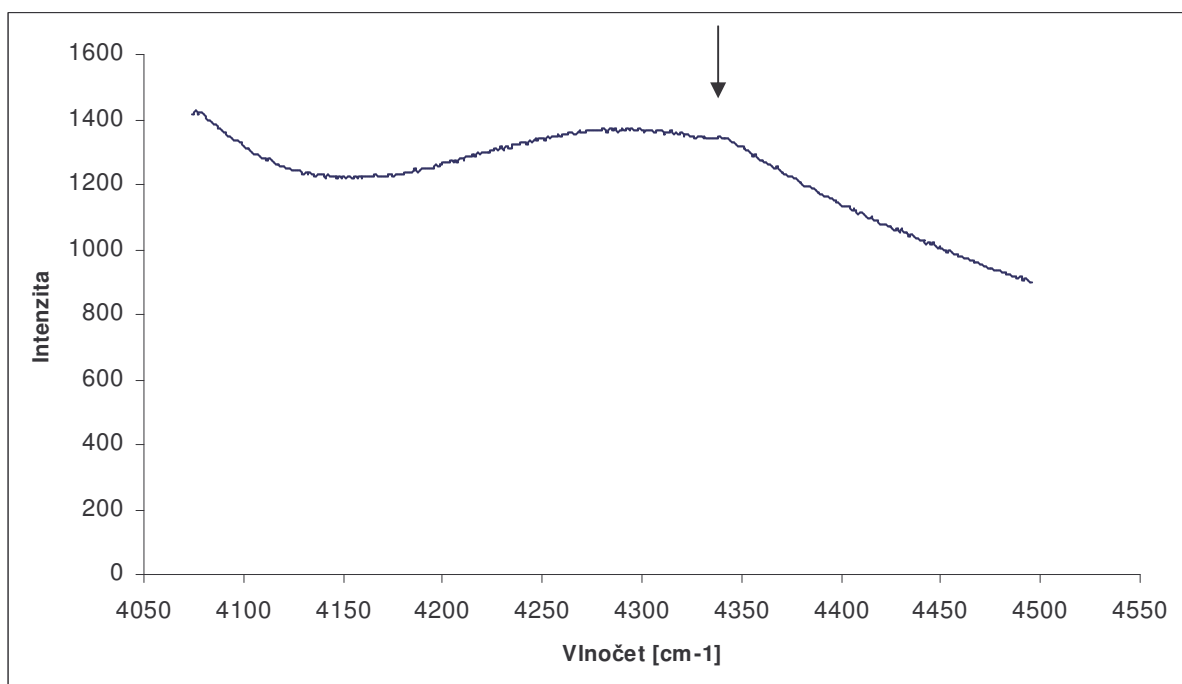
Obr. 13: Část spektra kalibrační neonové výbojky. Zdroj [5]

4.4 Výběr excitační vlnové délky

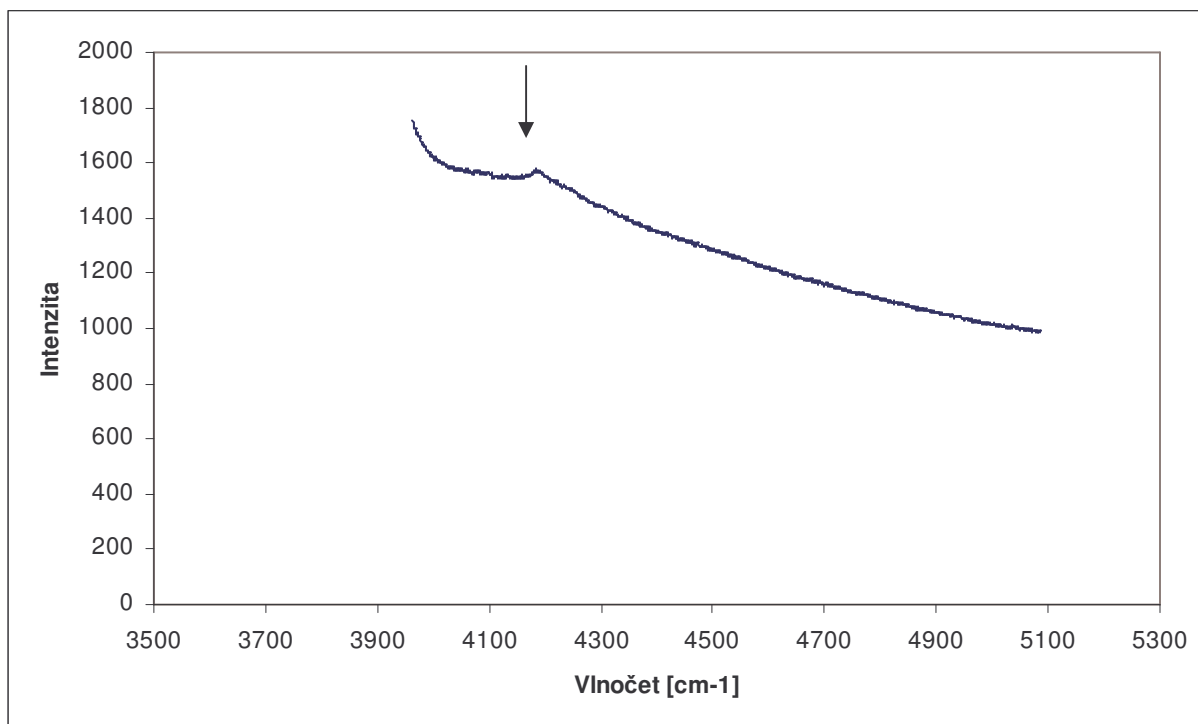
Charakter řešené problematiky vyžaduje sledování Ramanových spekter v celém rozsahu molekulárních vibrací, tedy přibližně 200 až 4000 cm^{-1} . To i při použití mřížky s nižší hustotou vrypů vyžaduje postupné měření v několika spektrálních úsecích. Původně uvažovaná excitační vlnová délka 514,5 nm odpovídající nejsilnější čáře Ar^+ laseru nedávala příliš velké oblasti překryvu při rozdělení spektrální oblasti na tři úseky. Jako závažnější aspekt se však ukázal artefakt způsobený nejspíše vadou (ghost) nebo nevhodným blazováním mřížky v oblasti větších vlnových délek, který při nastavení mřížky centrálně na oblast valenčních vibrací vodíku ve vodě způsobil lokální deformaci spektra (obrázek 14 nahoře vlevo).



Obr. 14: Ghost v H_2O na excitační vlnové délce 514,5 nm

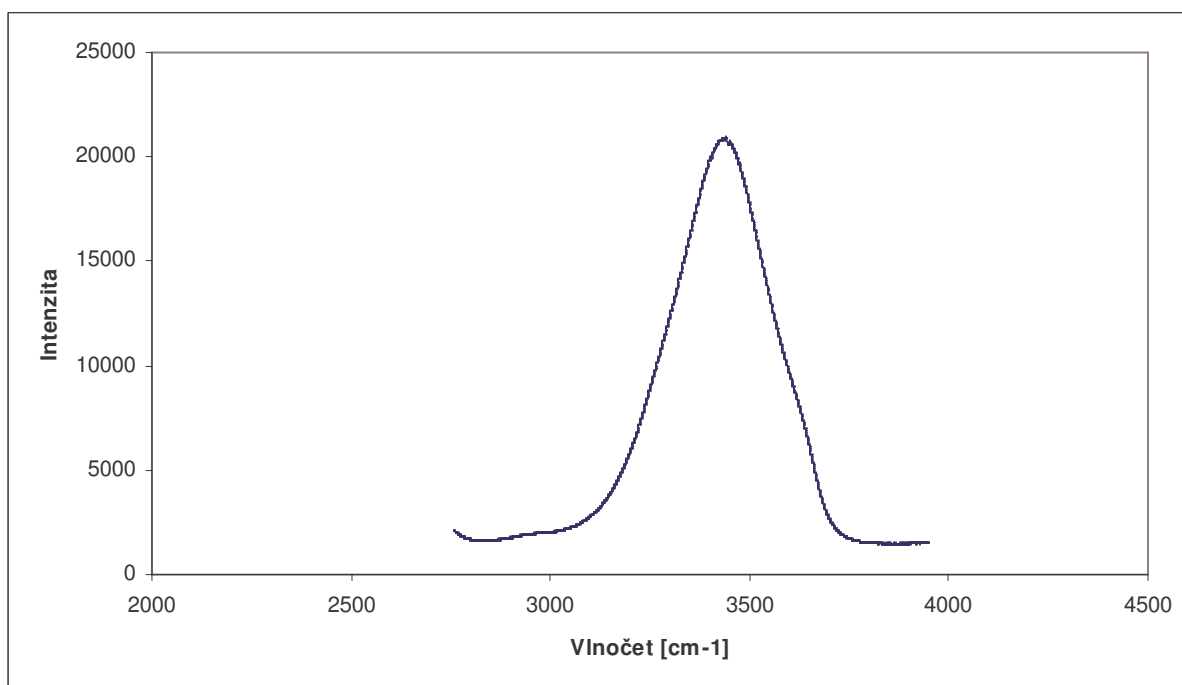


Obr. 15: Detail ghostu v H_2O na excitační vlnové délce 501,7 nm



Obr. 16: Detail ghostu v D₂O na excitační vlnové délce 501,7 nm

I když poloha tohoto artefaktu se měnila s natáčením mřížky, dostával se při zmenšování excitační vlnové délky do oblasti vyšších vlnočtů. Proto byla nakonec jako excitační linie zvolena druhá nejsilnější čára Ar⁺ laseru, 488 nm.

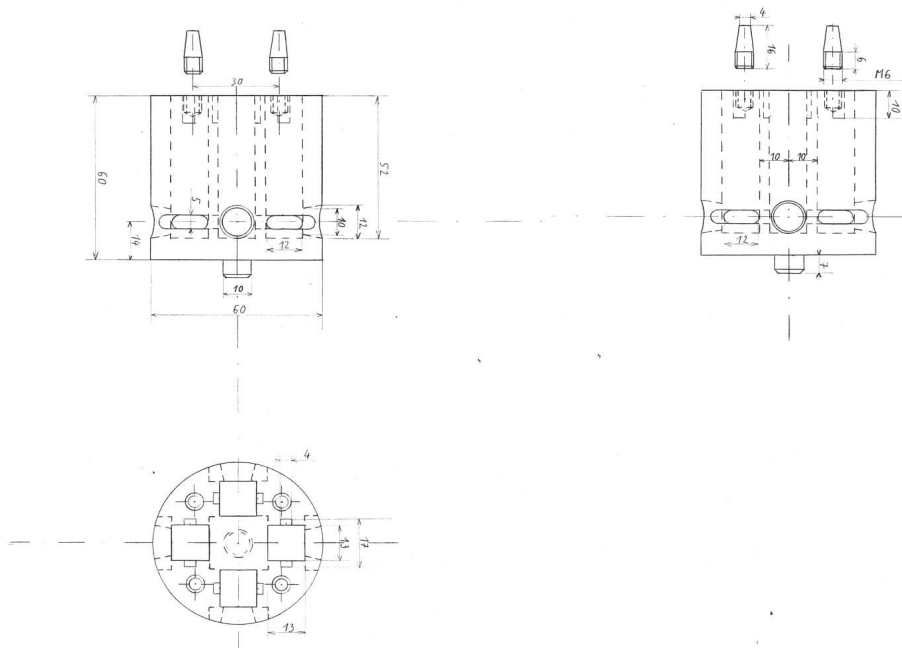


Obr. 17: Úplná eliminace ghostu v H₂O při excitační vlnové délce 488 nm

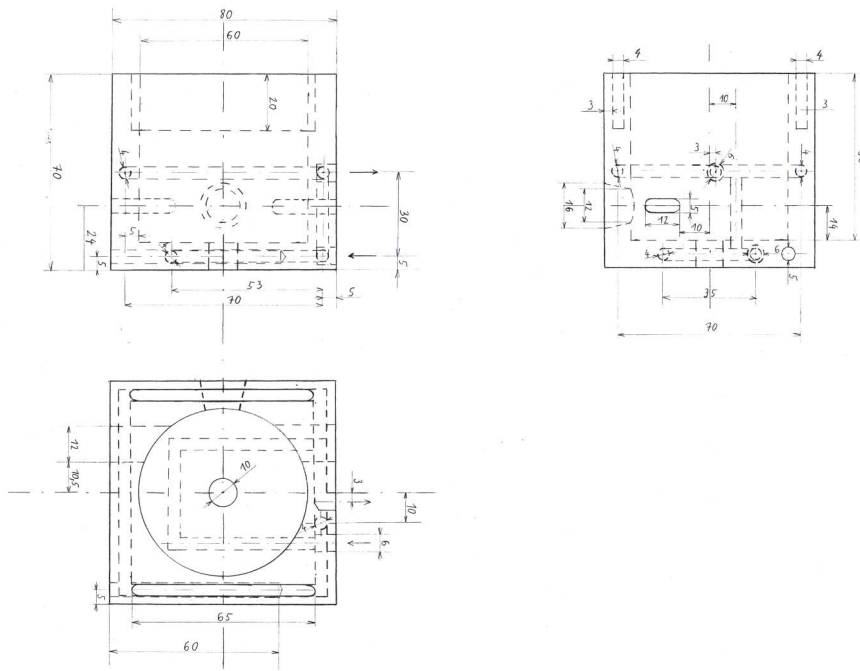
4.5 Návrh a realizace revolverového termostatovaného držáku skupiny kyvet

Vzhledem k charakteru mé diplomové práce byla její významnou součástí konstrukce teplotně stabilizovaného držáku kyvet pro vzorkovou komoru Ramanova spektrometru. Podle původního zadání se počítalo s držákem umožňujícím dobrou teplotní stabilizaci minimálně dvou standardních kyvet pomocí kapalinového termostatu. V prosinci 2008 byl vedoucím mé diplomové práce schválen můj originální návrh temperovaného revolverového držáku kyvet, umožňujícího teplotně stabilizovat čtyři kyvety, přičemž jednoduchým otočením karuselu bude možné kteroukoli z nich okamžitě přesunout do pracovní polohy pro měření Ramanova rozptylu. V návrhu se rovněž počítalo s možností budoucího jednoduchého použití speciálních vložek pro případné měření s menšími kyvetami nebo mikrokyvetami.

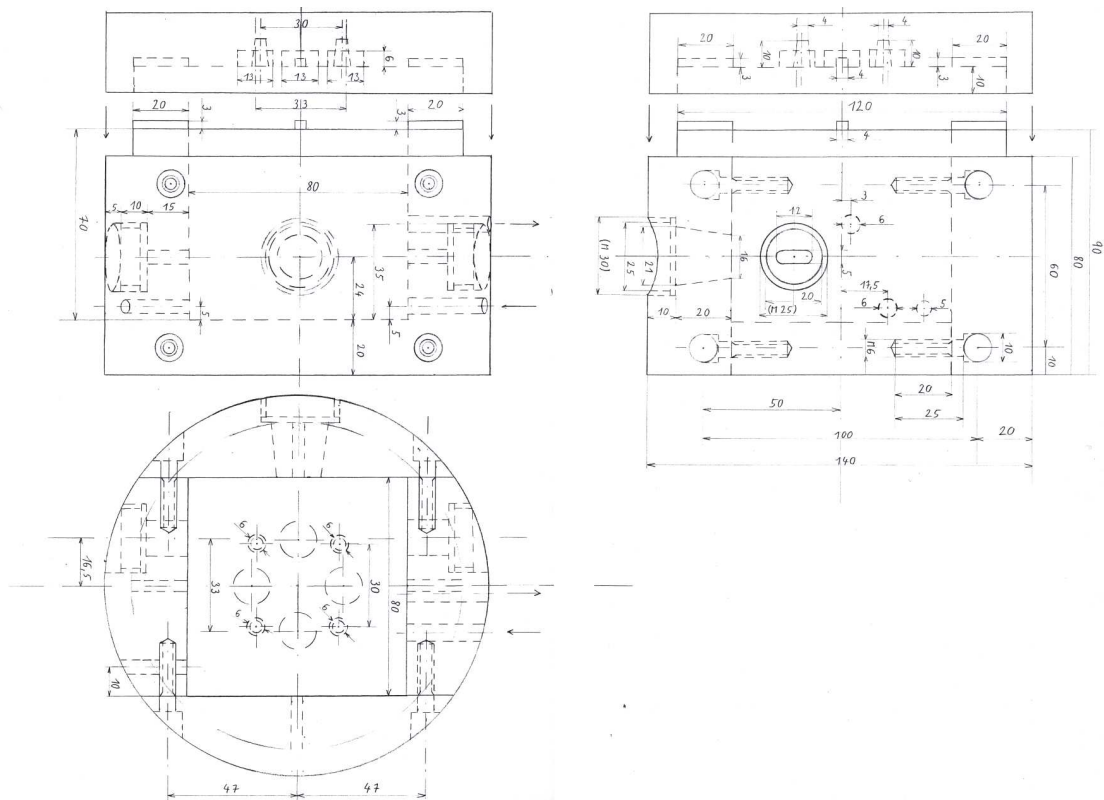
V průběhu měsíce jsem tedy vypracoval projekt celého zařízení. Kopie technické dokumentace jsou uvedené na obrázcích 18, 19 a 20.



Obr. 18: Kopie (zmenšená) technického výkresu otočné části (karuselu) termostatovaného držáku 4 kyvet. Materiál: mosaz.



Obr. 19: Kopie (zmenšená) technického výkresu tepelného výměníku termostatovaného držáku 4 kvet. Materiál: mosaz.



Obr. 20: Kopie (zmenšená) technického výkresu vnějšího termoizolačního pláště termostatovaného držáku 4 kvet. Materiál: silon.

Jak je z výkresů patrné, zařízení sestává ze 3 hlavních částí, které jsou vloženy jedna do druhé. Vnitřní část tvoří mosazný karusel se čtyřmi otvory pro umístění kyvet. V dolní části vidíme sérii otvorů pro vstup a výstup laserového svazku a otvory pro výstup ramanovského signálu. V horní části jsou 4 unášecí trny pro přenos kroutícího momentu z otočného víka vnějšího pláště na karusel, v dolní části pak středovací čep.

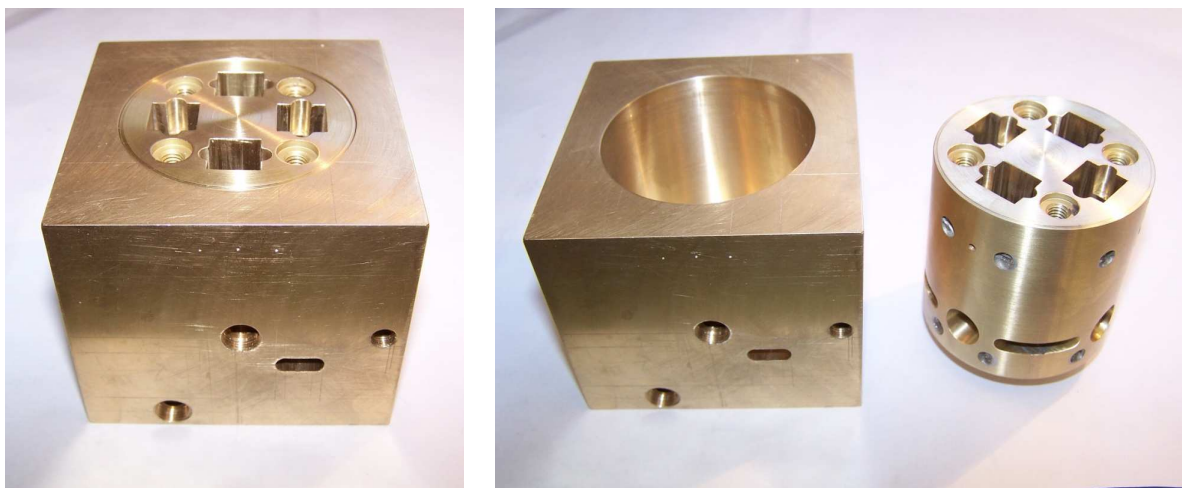
Prostřední částí je mosazný stator, protkaný ve dvou navazujících patrech složitým labyrintem otvorů protékajících kapalným médiem, drženým prostřednictvím připojeného termostatu na požadované teplotě. Tato část slouží jednak jako kluzné ložisko pro otáčnou karusel, ale zejména jako výměník, který zprostředkovává předávání tepla mezi proudící kapalinou a karuselem se vzorky. Obsahuje rovněž 4 zásobníky na silikagel, absorbující vzdušnou vlhkost uvnitř držáku.

Vnější část tvoří silonový, tepelně izolující plášť, jehož hlavní část obsahuje otvory pro excitační svazek a Ramanův signál opatřené izolačními okénky z křemenného skla, umožňujícími perspektivně měření i v UV oblasti. Druhá, horní část (víko), je otočná a mechanicky spojená přes unášecí trny s karuselem. Jejím jednoduchým pootočením o 90° tak lze vyměňovat vzorky ve svazku bez nutnosti porušení tepelné izolace celého zařízení. Z technické dokumentace jsou rovněž patrné polohovací drážky a pera, umožňující přesné polohování kyvet ve svazku.

V únoru 2009 byla dle předložené dokumentace zahájena v dílně FÚ výroba zařízení, která trvala více než půl roku. Některé polotovary, fotograficky zdokumentované v průběhu této výroby, si můžeme prohlédnout na obrázcích 21 a 22.

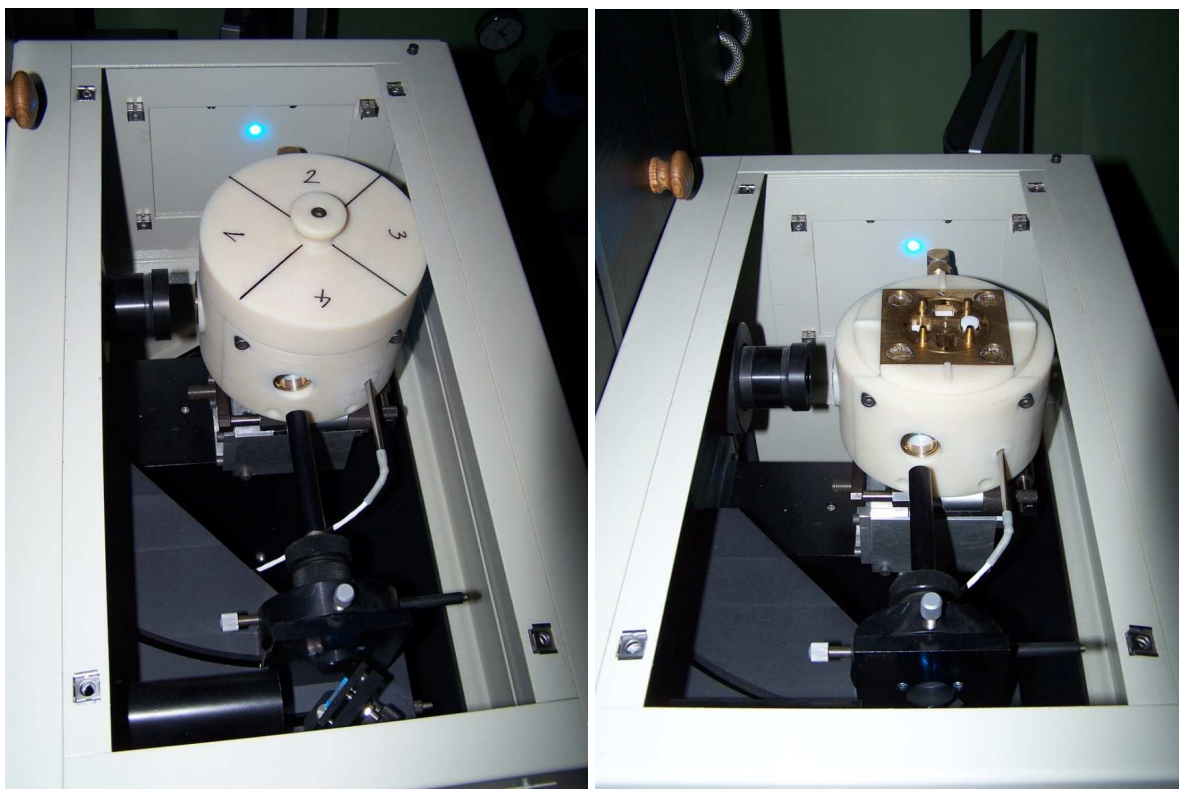


Obr. 21: Ještě nedokončený revolverový držák kyvet (karusel)

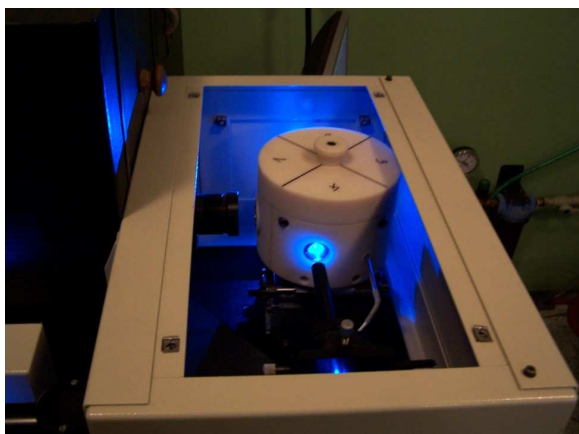


Obr. 22: Téměř dokončený mosazný výměník tepla spolu (s vloženým karuselem i bez)

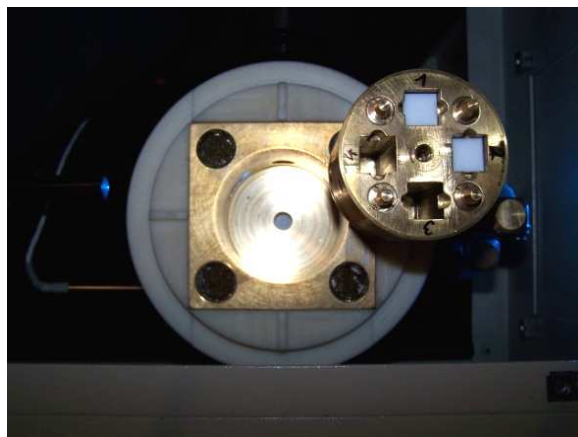
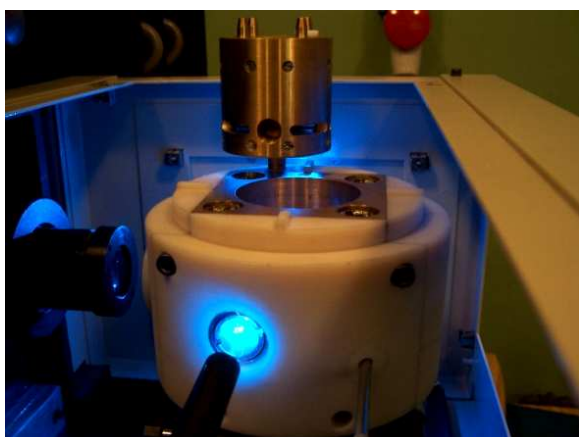
Zařízení bylo kompletně dokončeno, namontováno do vzorkové komory a odzkoušeno prozatím bez připojeného termostatu, v průběhu září 2009. V průběhu listopadu 2009 pak bylo připojeno na nově zakoupený termostat a stalo se tak plně funkčním. V tomto stavu jej zachycují obrázky 23, 24, 25 a 26.



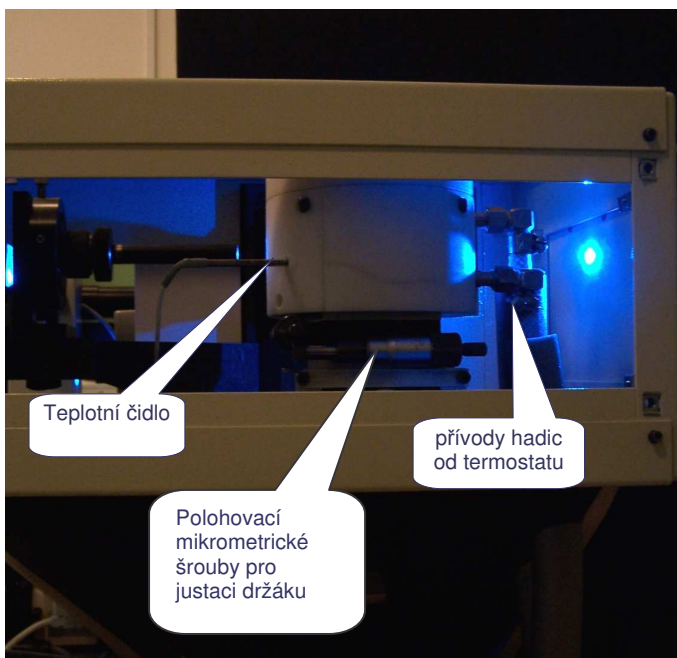
Obr. 23: Fotografie dokončeného a zkompletovaného revolverového držáku kyvet, instalovaného do vzorkové komory.



Obr. 24: Pohled do odkryvané vzorkové komory během činnosti spektrometru



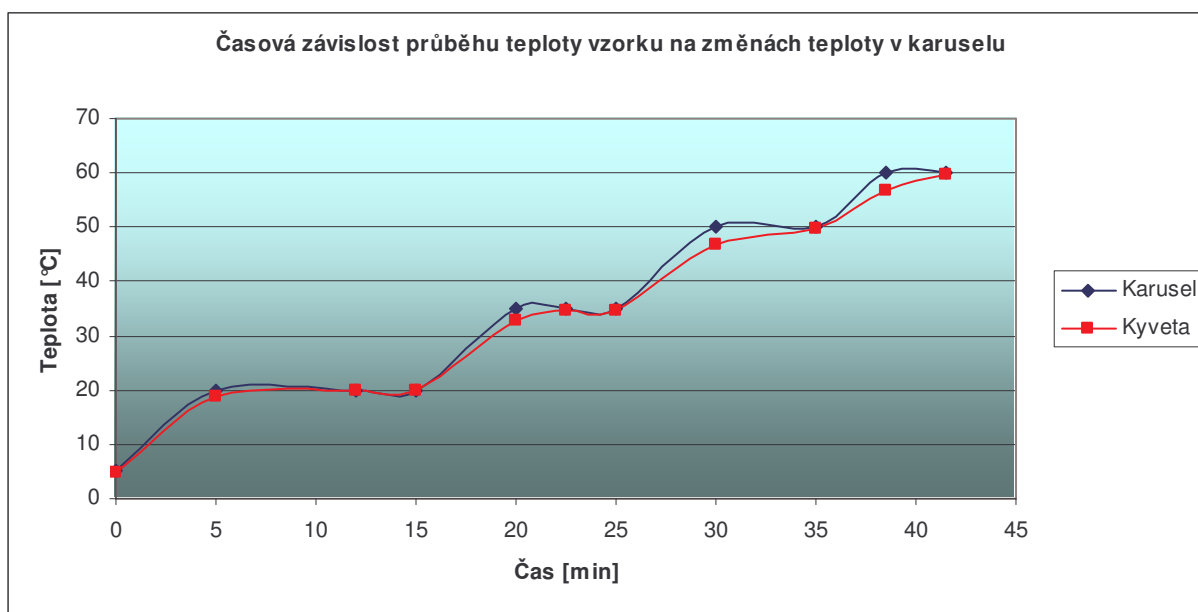
Obr. 25: V případě potřeby lze karusel jednoduše vyjmout



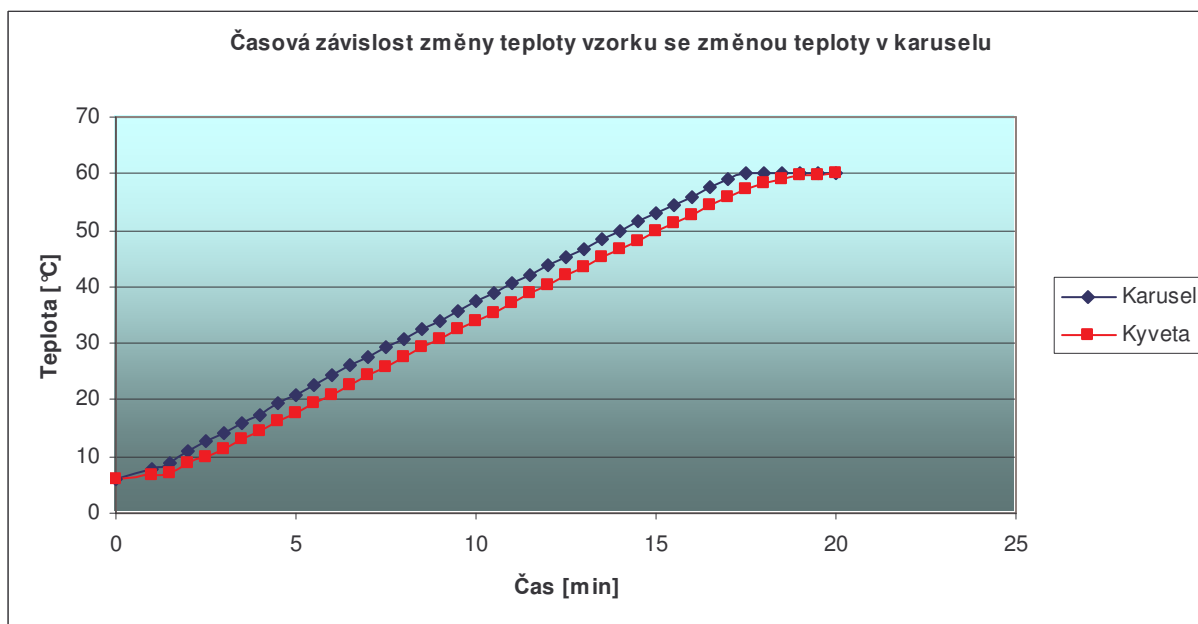
Obr. 26: Termostat a jeho připojení k držáku kyvet

4.6 Testování tepelných vlastností termostatovaného kyvetového držáku

Po úplném zprovoznění termostatovaného revolverového držáku kyvet vyvstala potřeba proměřit jeho tepelné parametry. Přímo do kyvety s 2 ml vody byl vsunut miniaturní termočlánek připojený na teplotně zkalibrovaný elektrometr. Současně s tím byla odečítána teplota referenčním teplotním čidlem vsunutým přímo do mosazného pláště výměníku, který standardně poskytuje zpětnovazební údaj pro řízení teploty uvnitř karuselu termostatem. Provedla se dvě měření v různých režimech teplotních změn. Při prvním měření byla teplota nastavovaná termostatem skokově měněna po 15°C (poslední změna o 10°C) v rozsahu teplot 5 – 60°C, ve druhém případě byla teplota přibližně ve stejném rozsahu zvyšována lineárně. Výsledky měření jsou uvedeny v grafech na obrázcích 27 a 28.



Obr. 27: Časová závislost teploty vzorku na změnách teploty v karuselu



Obr. 28: Časová závislost změny teploty ve vzorku se změnou teploty v karuselu

Z hodnot naměřených teplot v karuselu a uvnitř kyvety se především podařilo ověřit, že teplota kyvety se po době potřebné na vyrovnání teplot dostává na hodnotu, která se od teploty držáku kyvet, která je nastavována termostatem, neliší více než o $0,1^{\circ}\text{C}$, což je na úrovni přesnosti termostatu.

Dále jsme na základě teplotního rozdílu mezi teplotou držáku a teplotou uvnitř kyvety odhadli časovou charakteristiku výměny tepla mezi držákem kyvet a vzorkem v kyvetě.

Za předpokladu ustáleného tepelného toku by mělo pro přenesené teplo Q platit

$$dQ = \xi(T_c - T)dt, \quad (4.6.1)$$

kde T_c je teplota karuselu, T teplota uvnitř kyvety a ξ parametr určující celkovou tepelnou vodivost dráhy přenosu tepla. Jestliže C je celková tepelná kapacita vody v kyvetě, potom pro změnu její teploty platí

$$CdT = dQ. \quad (4.6.2)$$

Odtud plyne diferenciální rovnice

$$\frac{dT}{dt} = \frac{\xi}{C}(T_c - T). \quad (4.6.3)$$

Jestliže se teplota karuselu mění lineárně s teplotou jako

$$T_c = a + bt, \quad (4.6.4)$$

potom pro teplotu v kyvetě bude platit

$$\frac{dT}{dt} = \frac{\xi}{C}(a + bt - T). \quad (4.6.5)$$

Jak je zřejmé z obrázku 28, po určitém přechodném stadiu se ustaví režim, kdy se i teplota v kyvetě mění lineárně:

$$T = e + ft. \quad (4.6.6)$$

Po dosazení (4.6.6) do rovnice (4.6.5) dostaneme

$$f = \frac{\xi}{C}(a + bt - e - ft). \quad (4.6.7)$$

Pokud má být tento vztah splněný, musí být $b = f$, což znamená, že při lineárním režimu je rychlost nárůstu obou teplot stejná. Dále by mělo platit

$$\frac{C}{\xi} = \frac{a - e}{f}. \quad (4.6.8)$$

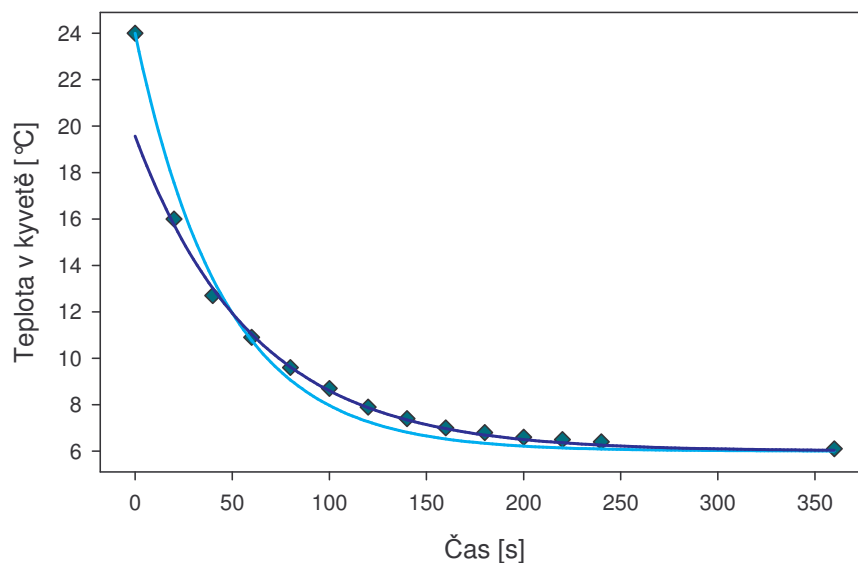
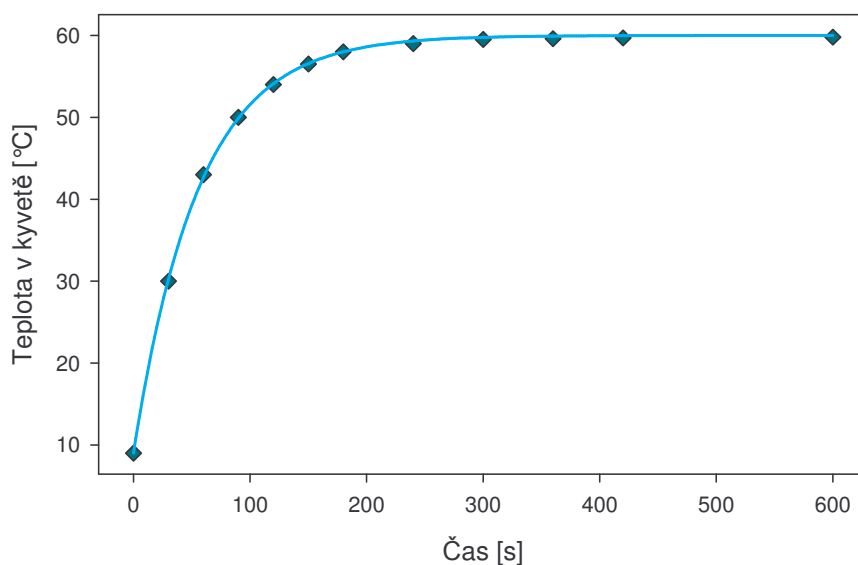
Z výsledku měření dostáváme $b = 3.18^{\circ}\text{C}/\text{min.}$, $f = 3.18^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ (což potvrzuje teoretickou předpověď $b = f$). Průměrný rozdíl teplot karuselu a kyvety je $a - e = 3.28^{\circ}\text{C}$. Odtud

$\frac{C}{\xi} = 62 \text{ s}$, což znamená že charakterická časová konstanta pro vyrovnávání teplot je přibližně jedna minuta.

Pro ověření tohoto údaje jsme provedli dvě další měření, při kterých byla do držáku kyvet ve stavu stabilizované teploty vložena kyveta se vzorkem vody o teplotě výrazně odlišné a měřil se časový vývoj jejích teplot. Výsledky tohoto měření ukazuje obrázek 29.

Měření byla vyhodnocená fitem podle exponenciální časové závislosti, která je řešením rovnice (4.6.3), při konstantní teplotě držáku kyvet:

$$T = (T_0 - T_c) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + T_c, \quad \tau = \frac{C}{\xi}. \quad (4.6.9)$$



Obr. 29: Časové průběhy vyrovnávání teploty mezi držákem kyvet a vzorkem v kyvetě. Body označují výsledky měření, křivky exponenciální fit. V případě dolního grafu odpovídá tyrkysová křivka fitu zahrnujícímu všechny výsledky měření a modrá křivka výsledek při vynechání prvního bodu.

Jak je patrné z horní části grafu 29, fit provedený na vyhřívací křivku vychlazeného vzorku vloženého do karuselu drženého na teplotě 60°C perfektně sedí, časová konstanta $\tau = 56$ s. Z dolní části grafu 29 je naopak patrné, že fit, provedený na vychlazovací křivku vzorku o pokojové teplotě, vložené do karuselu drženého na teplotě 6°C sedí hůře, při vynechání prvního bodu se aproximace zlepšuje. Pro časovou konstantu odtud dostáváme $\tau = 60$ s. Výslednou časovou konstantu je možné odhadnout jako $\tau = 58 \pm 2$ sec.

Malý rozdíl mezi hodnotou určenou v předchozím případě (lineární ohřev) je dán tím, že v prvním případě se na časové konstantě podílí i vedení tepla směřující k vyrovnávání teplot uvnitř karuselu. Je však zřejmé, že tepelná setrvačnost karuselu je velmi malá oproti tepelné setrvačnosti samotné kyvety.

Na základě určené časové konstanty můžeme stanovit minimální doby potřebné pro dosažení rovnovážné teploty v kyvetě. Pokud chceme změnit nastavení teploty o ΔT , tedy z $T = T_c$ do $T_c + \Delta T$, pak k tomu, aby se teplota kyvety lišila od požadované výsledné teploty o méně než 0,1°C, musí platit

$$T_c + \Delta T - T = \Delta T \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) < 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}, \quad (4.6.10)$$

$$\text{odkud } t > \tau \ln\left(\frac{\Delta T}{0,1 \text{ } ^\circ\text{C}}\right). \quad (4.6.11)$$

Protože v tomto případě se musí vyrovnat i teplota karuselu, je třeba dosadit časovou konstantu určenou z lineárního ohřevu, tedy $\tau = 62$ s. Při nastavení teplotní změny termostatu nepřesahující 15°C, je tedy po 10 minutách možno považovat teplotu v kyvetě za vyrovnanou s přesností do 0,1°C.

5. Experimentální část

V průběhu listopadu 2009 proběhlo závěrečné testování spektrometru, jeho finální úpravy, justace a stanovování podmínek měření. Byla získána série zkušebních spekter čisté H₂O, D₂O, a také roztoků adeninu a adenosinu ve fosfátovém pufru v H₂O i D₂O na pH 6,8.

V prosinci 2009 pak byla provedena první testovací měření na roztoku H₂O + D₂O v poměru 1:1, stanovující vlastnosti deuterace v čase. Následovala měření deuterace v dusíkatých bázích a nukleotidů, jejichž příprava je podrobněji popsána v paragrafu 5.1.

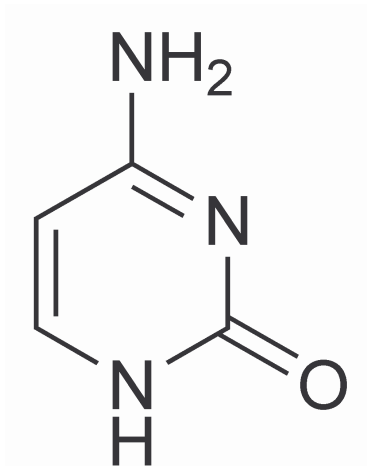
5.1 Pilotní měření Ramanova rozptylu složek nukleových kyselin při proton-deuteronové výměně

Měření na aparatuře byla zahájena v prosinci 2009. Provedlo se několik sérií měření, jejichž cílem bylo prověřit možnosti sledování proton-deuteronové výměny při skokové změně složení rozpouštědla. Měření probíhala zpravidla tak, že vzorek rozpuštěný v H₂O byl umístěn v jedné kyvetě a v jiné bylo zásobní množství D₂O. Kyvety se nacházely v temperovaném držáku kyvet, takže teploty kapalin byly vyrovnané. S hledem na snahu co nejvíce zpomalit rychlost výměny dobře vyměnitelných protonů, jsme hlavní měření prováděli za teplot mezi 0 a 10°C.

5.1.1. Sledování proton-deuteronové výměny na cytosinu

V lednu 2010 jsme zahájili sérii měření proton-deuteronové výměny. Jako první testovaná složka nukleových kyselin byl vybrán cytosin.

Cytosin (viz obrázek 30) je pyrimidinová báze společná pro DNA i RNA [20]. Má ze všech majoritních bází nukleových kyselin nejvyšší rozpustnost [19].

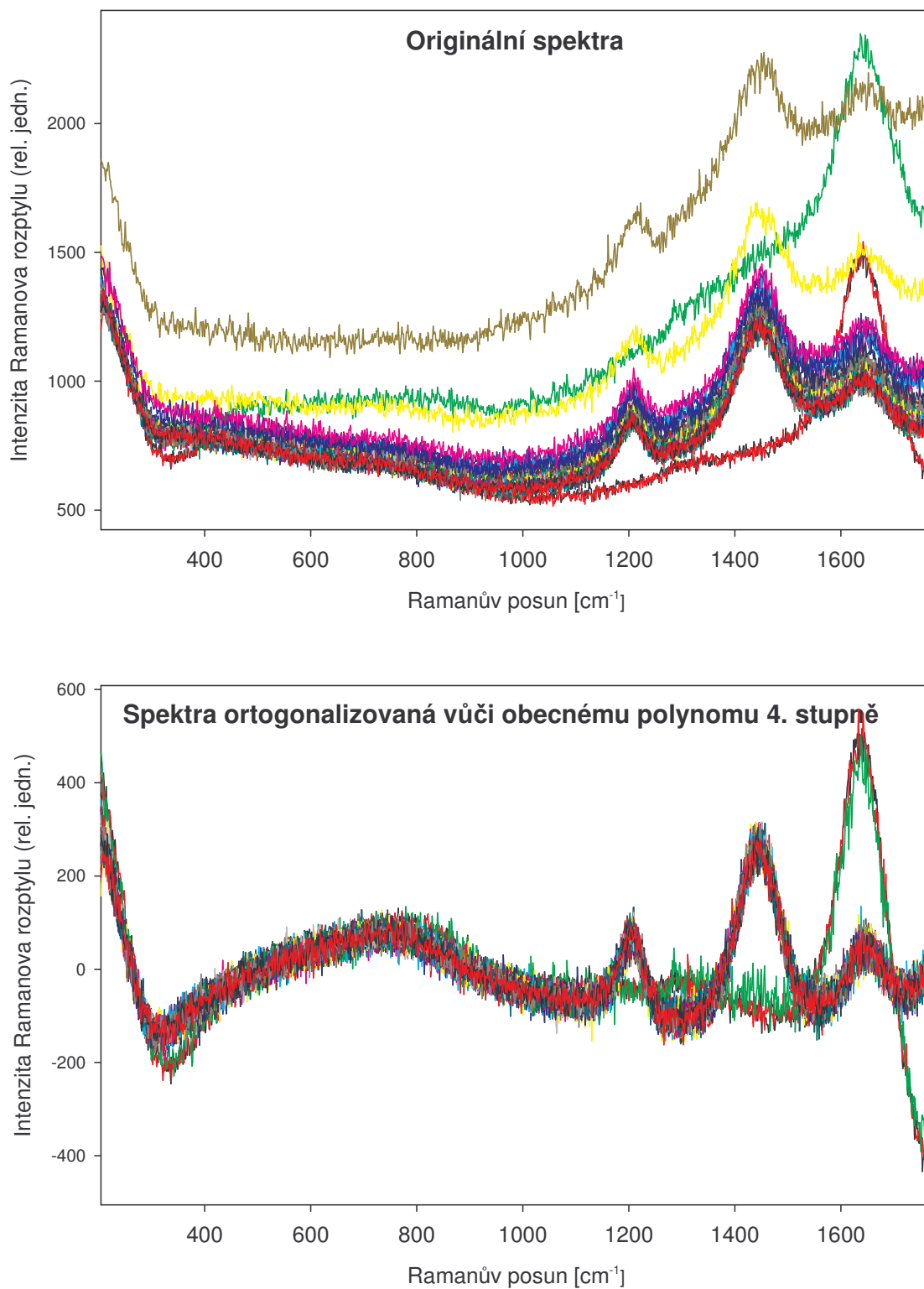


Obr. 30: Molekula Cytosinu. Zdroj [8]

Cytosin má celkem 3 snadno vyměnitelné protony, z toho 2 na aminoskupině a 1 na iminoskupině. Dále pak obsahuje 2 obtížně vyměnitelné protony na uhlících. Celkem tedy existuje $2^3 = 8$ možností obsazení snadno vyměnitelných pozic H nebo D. Protože lze přepokládat, že zejména v oblasti vibračních frekvencí pod 1800 cm^{-1} nebudou při obsazení aminoskupiny jedním protonem a jedním deuteronem vibrační linie citlivé na jejich přehození, mělo by existovat 6 spektrometricky rozlišitelných forem.

Pro měření jsme připravili 30 mM roztok v H₂O (koncentrace limitovaná rozpustností cytosinu) a 1 ml tohoto roztoku umístili v kyvetě. Režim Ramanova spektrometru byl nastaven tak, aby se po minimální době expozice a akumulce signálu, potřebné k získání přijatelného poměru signál/šum, spektra automaticky opakovaně ukládala. Efektivní doba potřebná pro získání jednoho spektra byla 25 minut. Po určité době jsme do kyvety přidali určité množství D₂O.

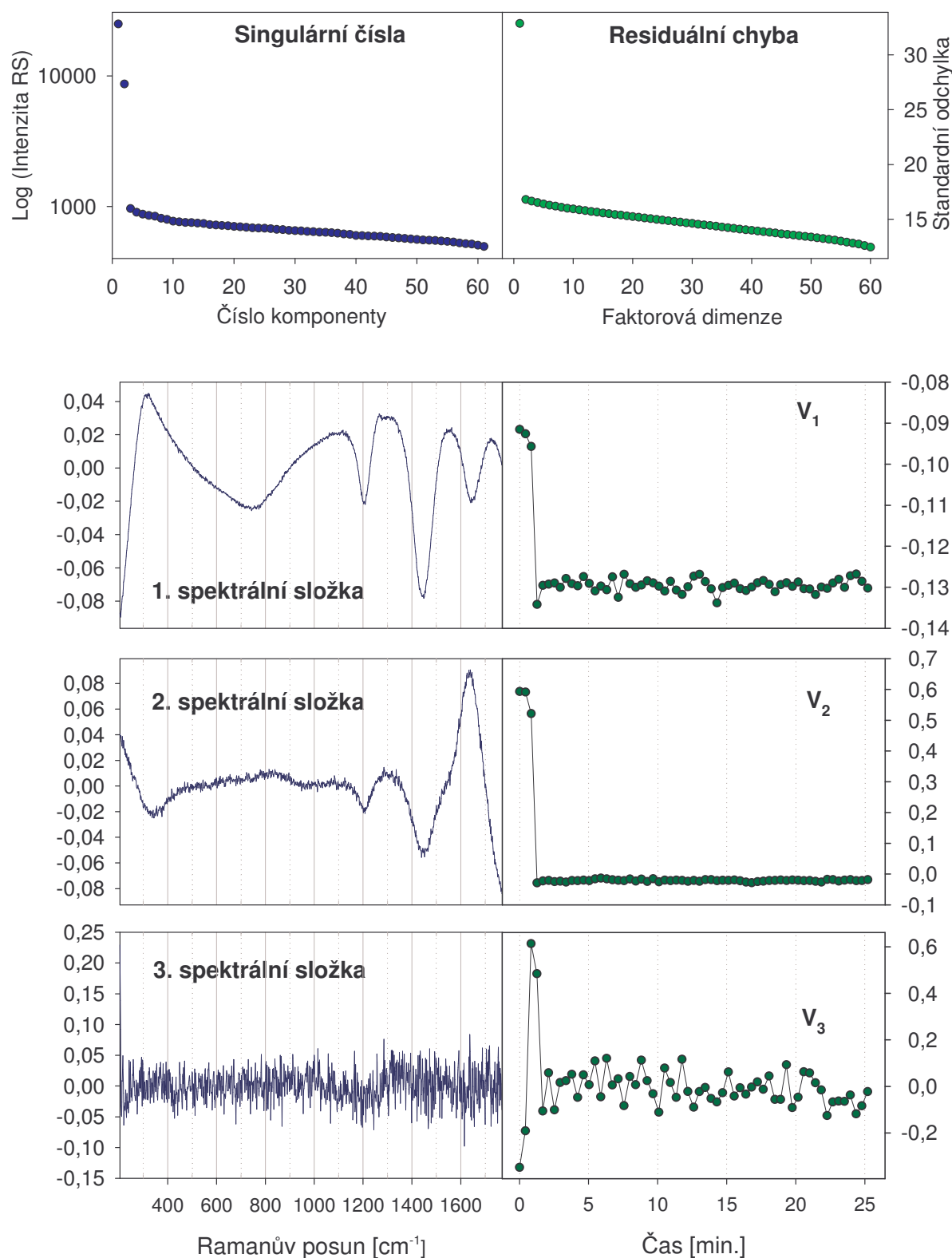
Před vlastním měřením jsme nejprve provedli kontrolní experiment kdy stejné množství D₂O bylo přidáno do H₂O. Zachycená spektra pro přidání 0,75 ml D₂O do 1 ml H₂O jsou uvedena na obrázku 31 nahoře. Těsně při přidání se objevil dočasný vysoký nárůst pozadí, který je nejspíš způsoben zvětšenou nehomogenitou kapaliny dokud nedojde k dobrému promísení obou složek. Jinak spektrální změny odpovídají očekávání: po přidání těžké vody se vedle pásu deformační vibrace H₂O na 1640 cm⁻¹ objevují pásy deformačních vibrací HDO na 1420 cm⁻¹ a D₂O na 1200 cm⁻¹. Na spodním obrázku 31 je dobře zdokumentováno, jak pomocí ortogonalizace vůči spektrálnímu průběhu charakterizovatelnému polynomem 4. stupně bylo odstraněno kolísání pozadí spektra.



Obr. 31: Spektra Ramanova rozptylu při přidání 0,75 ml D_2O do 1 ml H_2O . Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra s korekcí na průběh pozadí formou ortogonalizace vůči obecnému polynomu 4. stupně. Křivky se zvýšeným pozadím (nahore) odpovídají měřením během a těsně po přidání D_2O .

Detailní přehled o spektroskopickém obrazu průběhu přidávání D₂O do H₂O nám dá faktorová analýza (SVD), jejíž výsledek je znázorněn v grafech na obrázku 32.

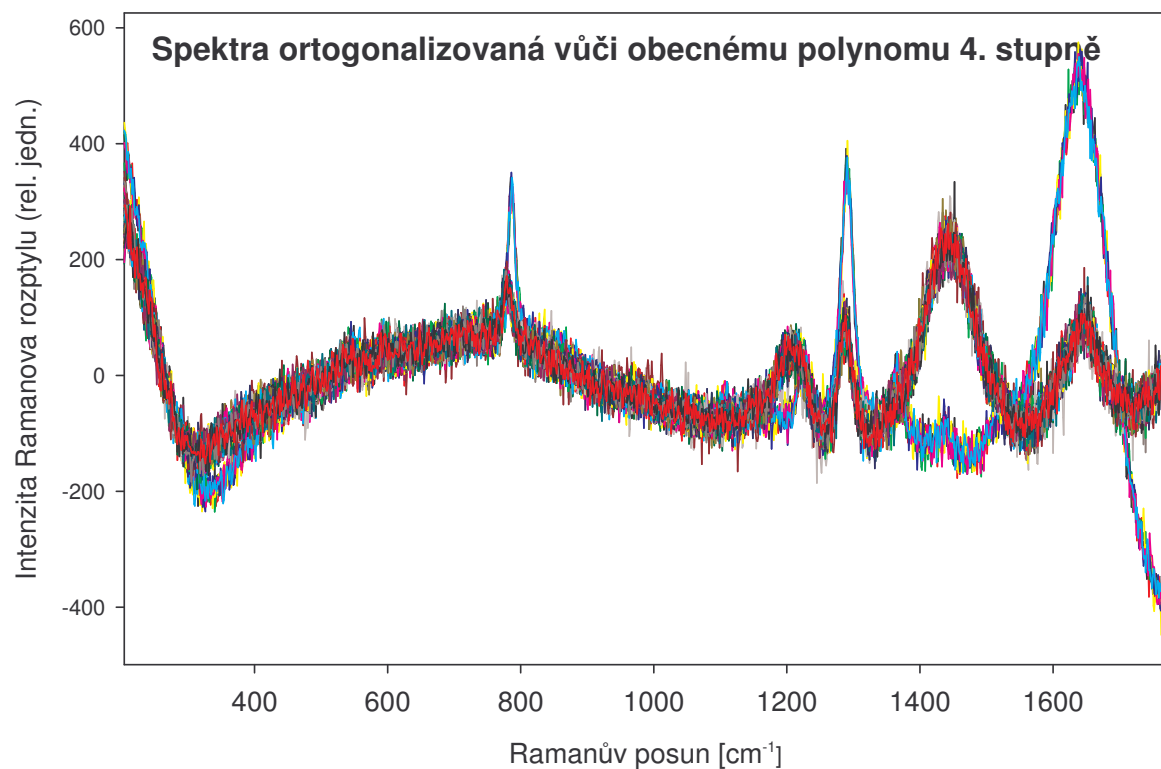
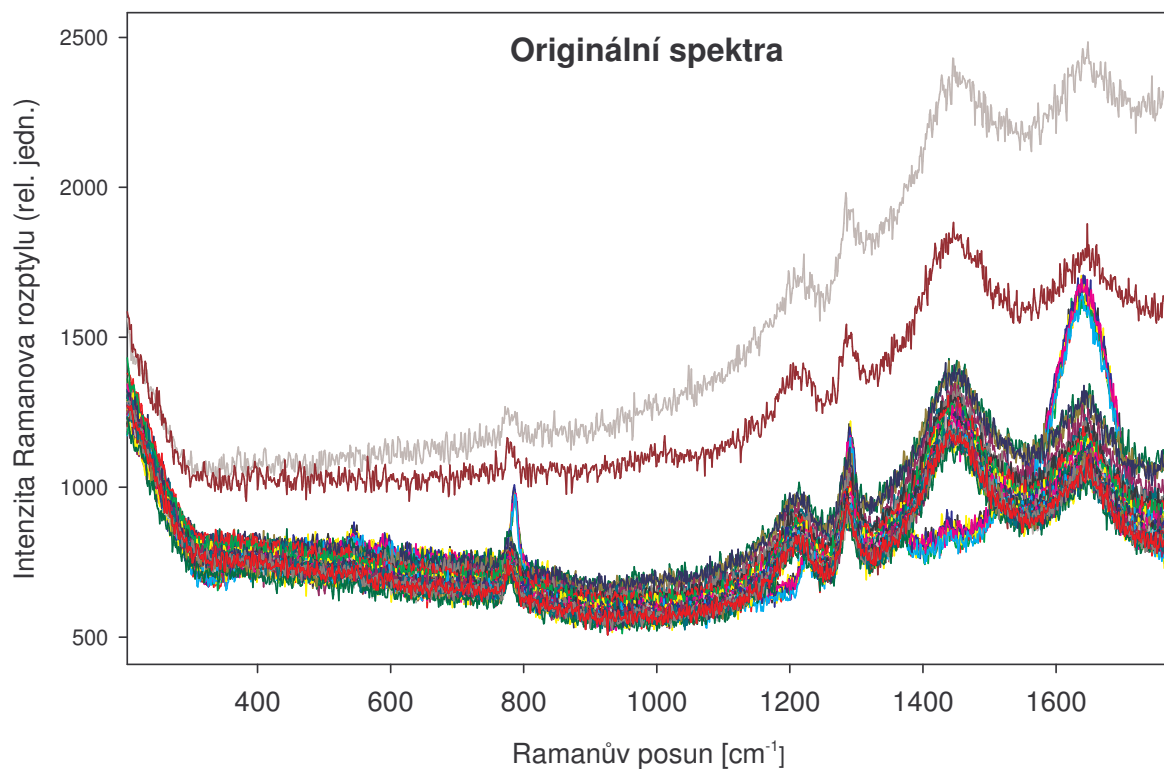
Výsledky SVD



Obr. 32: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter při přidání 0,75 ml D₂O do 1 ml H₂O, zobrazených na obrázku 31 dole.

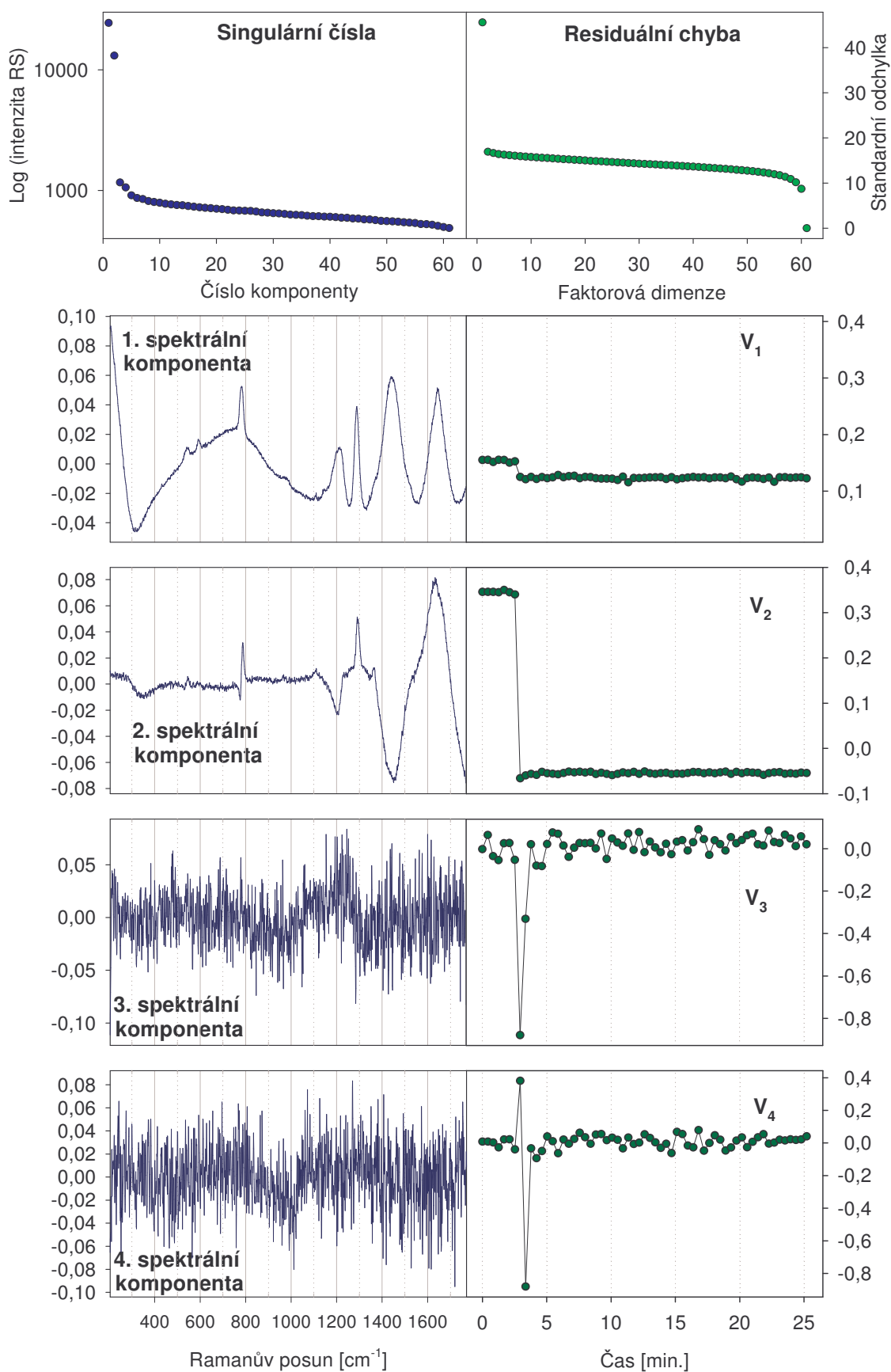
Výsledky faktorové analýzy ukazují, že faktorová dimenze je rovna dvěma, spektrální série tedy obsahuje jen dvě spektrální složky, jejichž poměry mají dvě úrovně, které odlišují stav před přidáním a po přidání D₂O. Proces přidávání se projevuje statisticky nevýznamnou třetí komponentou, která však zcela zřejmě souvisí s tím, že díky nárůstu pozadí spektra (ve zpracovávaných spektrech eliminovaného) dochází k nárůstu šumu. 1. a 2. spektrální složka z výsledků SVD představuje optimální spektrální profily pro korekci spektra rozpouštědla při analogicky provedeném měření na roztoku cytosinu.

Série spekter získaná při experimentu, kdy bylo přidáno 0,75 ml D₂O do 1 ml 30 mM roztoku cytosinu v H₂O je znázorněna na obrázku 33 nahoře. Po korekci na průběh pozadí pomocí ortogonalizace je získána série spekter, kde jsou vedle Ramanových čar H₂O/HDO/D₂O zřetelné silnější Ramanovy pásy cytosinu. Za použití prvních dvou spektrálních komponent získaných pomocí faktorové analýzy v experimentu s H₂O a D₂O (obrázek 32) do báze profilů, vůči nimž se provádí ortogonalizace, lze dosáhnout eliminace Ramanových spekter rozpouštědla (viz obrázek 35).

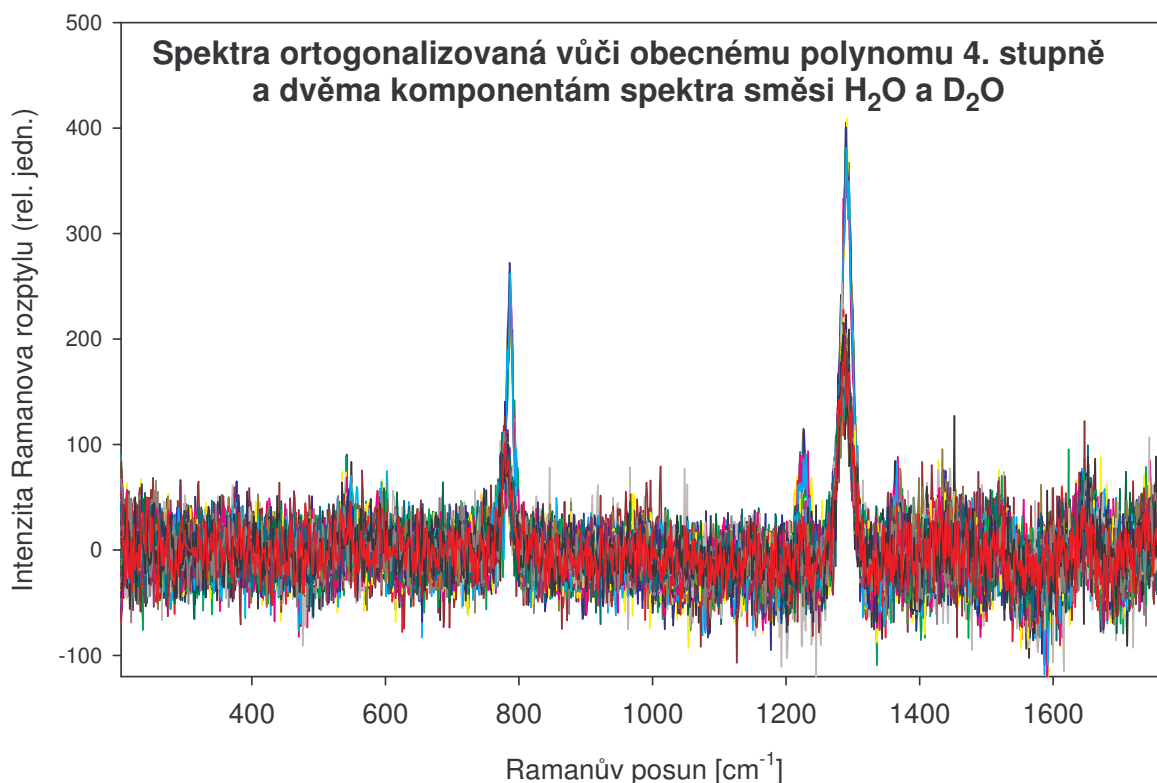


Obr. 33: Spektra Ramanova rozptylu při přidání 0,75 ml D₂O do 1 ml 30 mM roztoku cytosinu v H₂O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra s korekcí na průběh pozadí formou ortogonalizace vůči obecnému polynomu 4. stupně. Křivky se zvýšeným pozadím (nahore) odpovídají měřením během a těsně po přidání D₂O.

Výsledky SVD



Obr. 34: Výsledky SVD analýzy ortogonalizovaných spekter z obrázku 33 (dole)

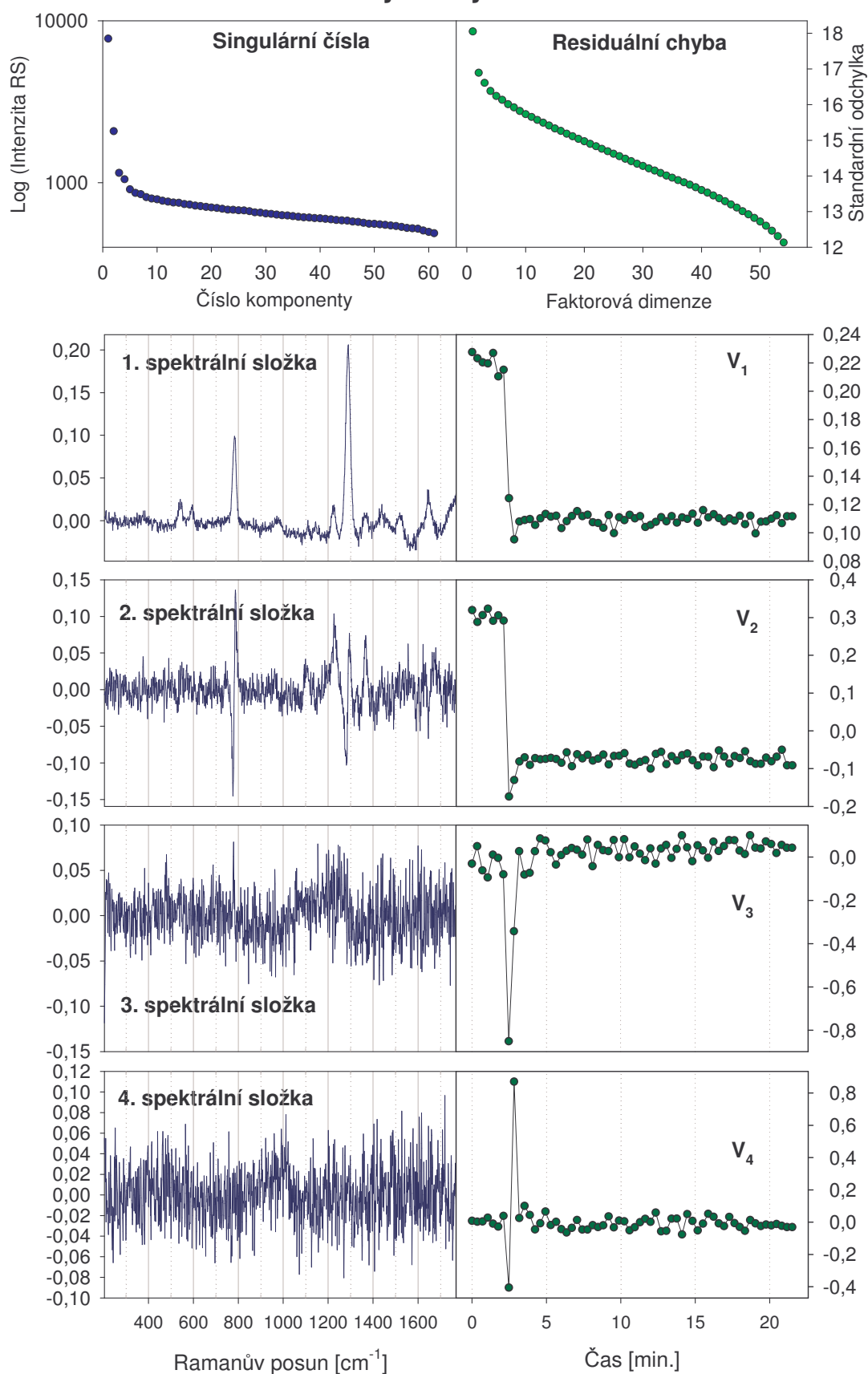


Obr. 35: Spektra Ramanova rozptylu při přidání 0,75 ml D₂O do 1 ml 30 mM roztoku cytosinu v H₂O (pH 6,8) po eliminaci vlivu pozadí a podílu Ramanova signálu rozpouštědla pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 4. stupně dvěma komponentám získaným z referenčního měření s přidáváním D₂O do H₂O (viz obrázek 32).

Výsledky faktorové analýzy série spekter z obrázku 35 jsou uvedené na grafech na obrázku 36. Na rozdíl od experimentu, kdy byla přidávána pouze D₂O do H₂O, ukazuje faktorová analýza vedle dvou hlavních komponent ještě dva velmi malé spektrální příspěvky spojené se změnami při přidávání a těsně po přidání D₂O. Bohužel efekt nárůstu šumu díky dočasněmu zvýšení pozadí je dominantní a není proto možné získat nějakou další konkrétní spektrální informaci, která by byla spojena s procesem postupné proton – deuteronové výměny před dosažením rovnováhy ve vzorku. Na druhé straně je možné, že pokud bychom pracovali s roztoky o vyšší koncentraci, dokázali bychom díky zvýšené úrovni signálu a zkrácené době vzorkování zaznamenat proces postupného ustavování rovnováhy.

Za daných okolností lze extrahovat spektrální profily v ustáleném stavu před a po přidání D₂O. To můžeme provést buď zprůměrováním spekter odpovídajících měření v době, kterou SVD ukazuje jako ustálený stav, nebo určením středních hodnot koeficientů V_1 a V_2 pro tyto doby a na jejich základě konstrukcí spekter podle vztahu (2.5.3.2). V obou případech dostaneme tentýž výsledek. Pro porovnatelnost spekter je třeba ještě uvážit, že po přidání D₂O se koncentrace cytosinu snížila 1,75x. Proto je třeba spektrum po přidání vynásobit tímto koeficientem, abychom dostali intenzitu vztahenou k původní koncentraci cytosinu.

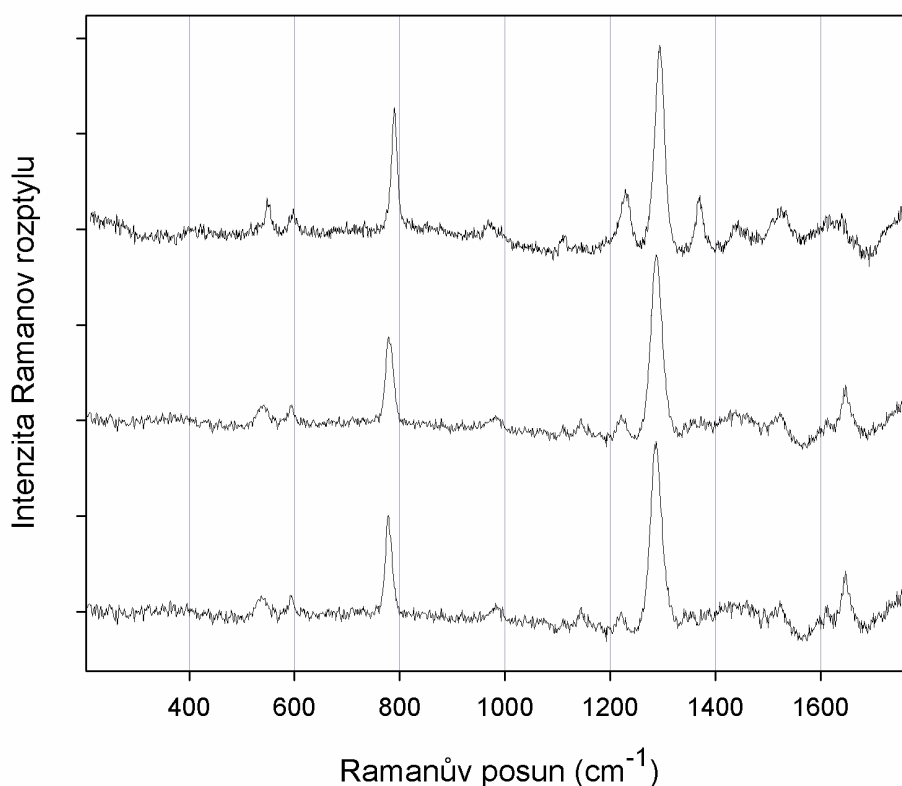
Výsledky SVD



Obr. 36: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter při přidání 0,75 ml D_2O do 1 ml 30 mM roztoku cytosinu, zobrazených na obrázku 35.

Výsledná spektra jsou uvedena na obrázku 37 (první dvě shora). Spektrum před přidáním D₂O samozřejmě odpovídá plně protonované formě cytosinu. V případě spektra v ustáleném stavu po přidání D₂O můžeme předpokládat, že stupeň deuterace odpovídá pravděpodobnosti nahodilého obsazení při dosaženém poměru v rozpouštědle daném poměrem H₂O do D₂O, tedy 4:3. Tento poměr můžeme určit pouze z poměrů v rozpouštědle díky velmi malé koncentraci cytosinu, takže množství protonů, které se dostanou z cytosinu do rozpouštědla, můžeme zanedbat. Tímto způsobem lze snadno spočítat, že podíl plně protonovaného cytosinu bude 19%, plně deuterovaného cytosinu na dusíkách 8%, jednotlivých forem s jedním deuterovaným dusíkem 14% a jednotlivých forem se dvěma deuterovanými dusíky 10%. Je tedy zřejmé, že spektrum v ustáleném stavu po přidání je směsí řady různě deuterovaných forem. V daném případě můžeme odečtením spektra plně protonované formy (a po příslušném přenormování) dostat spektrum deuterovaných forem (viz obrázek 37).

Cytosin, 6°C

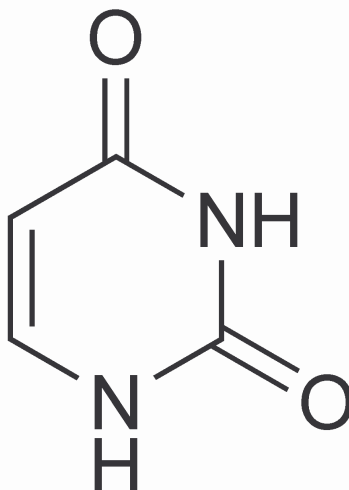


Obr. 37: Spektra cytosinu extrahovaná z experimentu při přidání 0,75 ml D₂O do 1 ml 30 mM roztoku cytosinu normovaná na základní koncentraci. Nahoře je spektrum plně protonované formy, uprostřed spektrum směsi forem po přidání D₂O a dole je spektrum deuterovaných forem, které jsou přítomné v poměrech uvedených v textu.

Analogickým způsobem se nám podaří při získání spekter při jiných poměrech H₂O a D₂O postupně eliminovat spektra směsi jednou deuterovaných forem, směsi dvakrát deuterovaných forem a plně deuterované formy (na dusíkových atomech). Tím získáme jistě originální spektrální informaci, ale bohužel za pomoci spekter získaných za ustálených stavů nemůžeme rozlišit různé formy se stejným stupněm deuterace. To by bylo případně možné jen na základě získání rozdílných spektrálních průběhů z časového vývoje po přidání těžké vody, což však v případě cytosinu (a měření nerezonančního Ramanova rozptylu) není možné vzhledem k jeho poměrně nízké rozpustnosti.

5.1.2 Sledování proton-deuteronové výměny na uracilu

Abychom potvrdili závěry plynoucí z provedených experimentů s cytosinem, provedli jsme analogický experiment s uracilem. Uracil (viz obrázek 38) je pyrimidinová báze RNA [20], [21]. Má poněkud nižší rozpustnost než cytosin [19]. Uracil má 2 snadno vyměnitelné protony na iminoskupinách. Dále obsahuje 2 obtížně vyměnitelné protony na uhlících. Celkem tedy existují 4 možnosti obsazení snadno vyměnitelných pozic H nebo D.



Obr. 38: Molekula uracilu. Zdroj: [9]

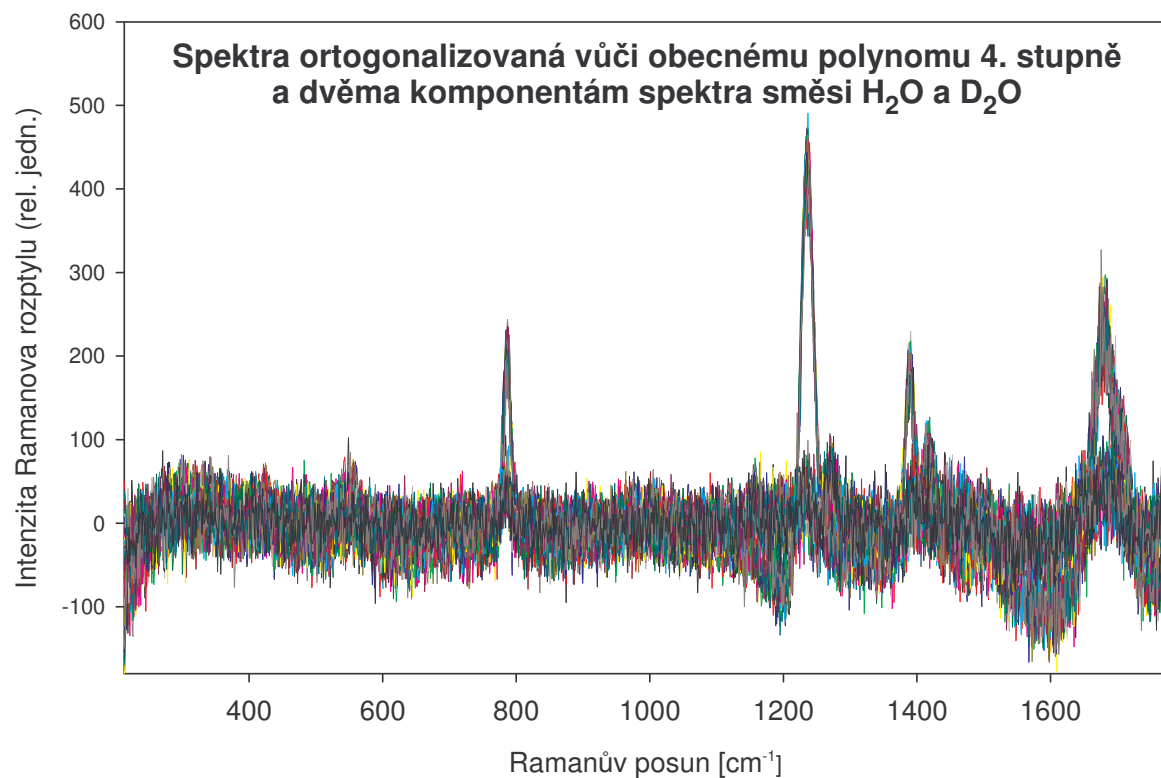
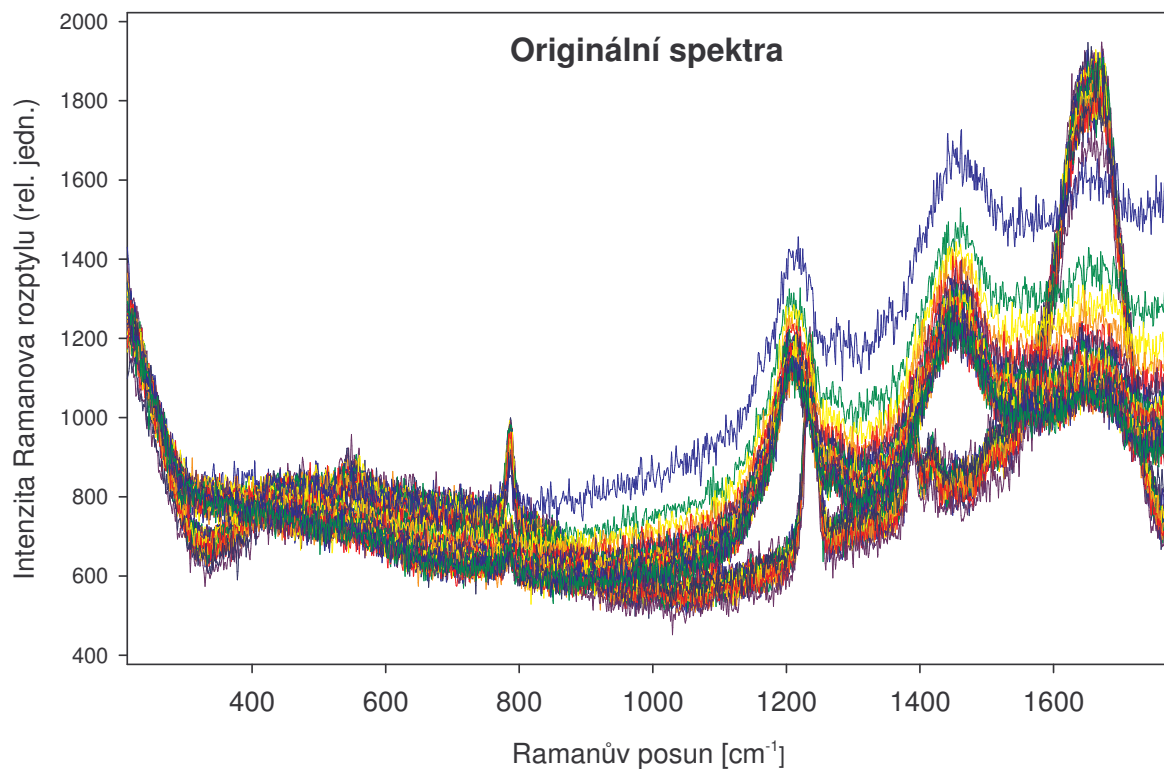
Pro měření jsme připravili 30 mM roztok uracilu v H_2O (na limitu rozpustnosti) a 1 ml tohoto roztoku umístili v kyvetě. Režim Ramanova spektrometru byl nastaven tak, aby se po minimální době expozice a akumulce signálu, potřebné k získání přijatelného poměru signál/šum spektra automaticky opakovaně ukládala. Efektivní doba potřebná pro získání jednoho spektra byla 27 minut. Po určité době jsme do kyvety přidali D_2O .

Před vlastním měřením jsme nejprve provedli kontrolní experiment kdy stejné množství D_2O (1,75 ml) bylo přidáno do H_2O . Naměřená data poskytla dva spektrální profily rozpouštědla, které jsme použili pro eliminaci jeho příspěvku v měřených spektrech uracilu.

Výsledky měření Ramanových spekter uracilu během jednorázového přidání D_2O jsou uvedeny na obrázku 39 v podobě přímo naměřených spekter (nahore) a po eliminaci vlivu pozadí a rozpouštědla pomocí ortogonalizační procedury (dole).

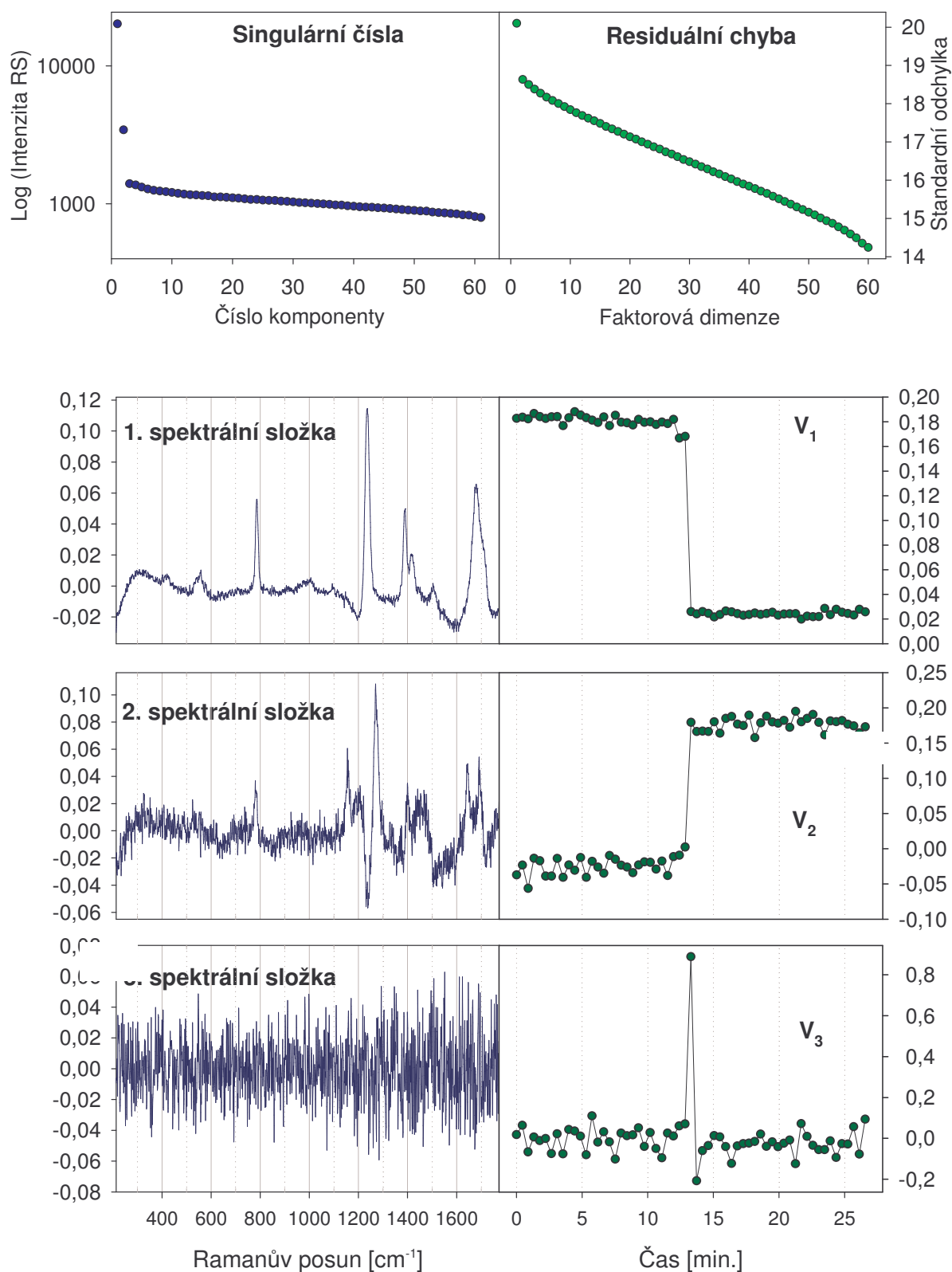
Výsledky faktorové analýzy série spekter z obrázku 39 (dole) jsou uvedené na grafech na obrázku 40. Faktorová analýza ukazuje na existenci pouze dvou statisticky významných komponent což znamená, že při časovém rozlišení měření lze vidět pouze skokovou změnu po přidání D_2O , kdy se okamžitě Ramanovo spektrum změní na tvar, který je v průběhu dalšího měření stálý. Třetí složka z faktorové analýzy je na mezi detekovatelnosti. Na obrázku 40 byly příslušné grafy ponechány, protože velmi dobře ilustrují skutečnost, že během přidávání těžké vody je hlavním efektem (vedle změny spektra z prvního do druhého tvaru) okamžitý nárůst šumu.

Dané výsledky tedy umožňují (stejně jako v případě cytosinu) pouze extrakci spektrálních profilů v ustáleném stavu před a po přidání D_2O . Výsledná spektra jsou uvedena na obrázku 41, spektrum po přidání D_2O je normováno na původní koncentraci vynásobením koeficientem 4.



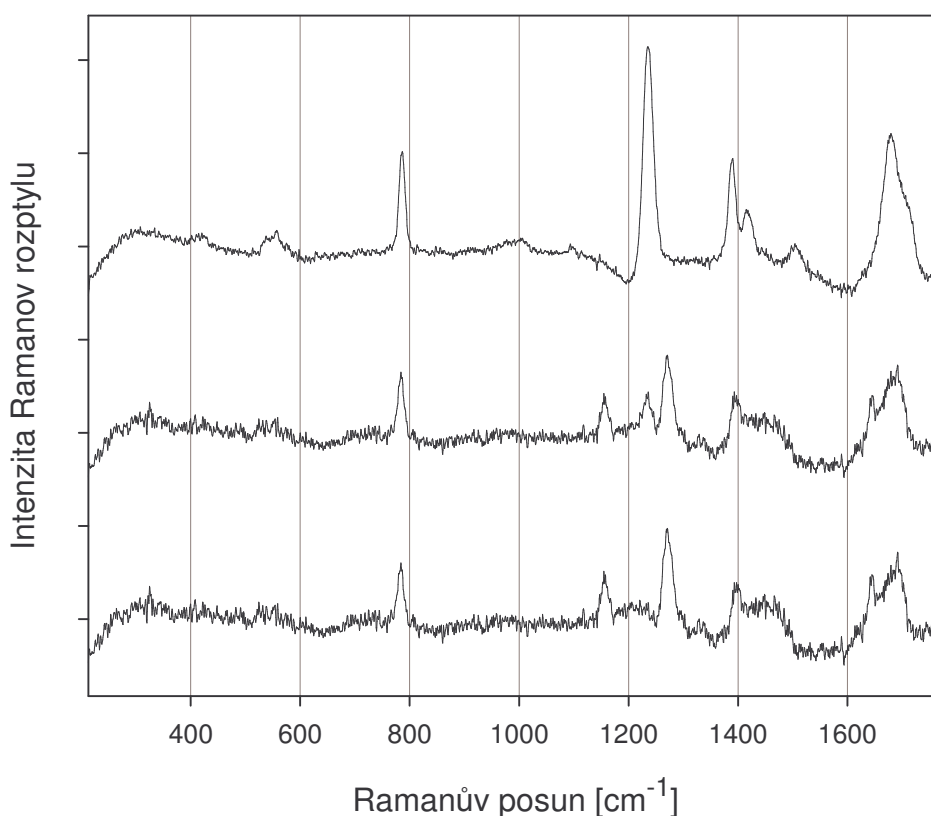
Obr. 39: Spektra Ramanova rozptylu při přidání 1,75 ml D_2O do 1 ml 30 mM roztoku uracilu v H_2O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí a podílu Ramanova signálu rozpouštědla pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 4. stupně dvěma komponentám získaným z referenčního měření s přidáváním D_2O do H_2O . Křivky se zvýšeným pozadím (nahore) odpovídají měřením během a těsně po přidání D_2O .

Výsledky SVD



Obr. 40: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter při přidání 1,75 ml D_2O do 1 ml 30 mM roztoku uracilu, zobrazených na obrázku 33.

Uracil, 6 °C



Obr. 41: Spektra uracilu extrahovaná z experimentu při přidání 1,75 ml D₂O do 1 ml 30 mM roztoku uracilu normovaná na základní koncentraci. Nahoře je spektrum plně protonované formy, uprostřed spektrum směsi forem po přidání D₂O a dole je spektrum deuterovaných forem, které jsou přítomné v poměrech uvedených v textu.

Spektrum před přidáním D₂O samozřejmě odpovídá plně protonované formě cytosinu. V případě spektra v ustáleném stavu po přidání D₂O můžeme předpokládat, že stupeň deuterační odpovídá pravděpodobnosti nahodilého obsazení při dosaženém poměru v rozpouštědle daném poměrem H₂O do D₂O, tedy 4:7. Tento poměr, podobně jako v případě cytosinu, můžeme určit pouze z poměrů v rozpouštědle díky velmi malé koncentraci rozpuštěné látky. Tímto způsobem lze snadno spočítat, že podíl plně protonovaného uracilu bude 13%, plně deuterovaného uracilu na dusících 40% a každé ze dvou částečně deuterovaných forem majících jednu protonovanou a jednu deuterovanou iminoskupinu 23%. Po odečtení příspěvku plně protonované formy bylo získáno spektrum směsi tří částečně nebo plně deuterovaných forem (viz obrázek 41 dole).

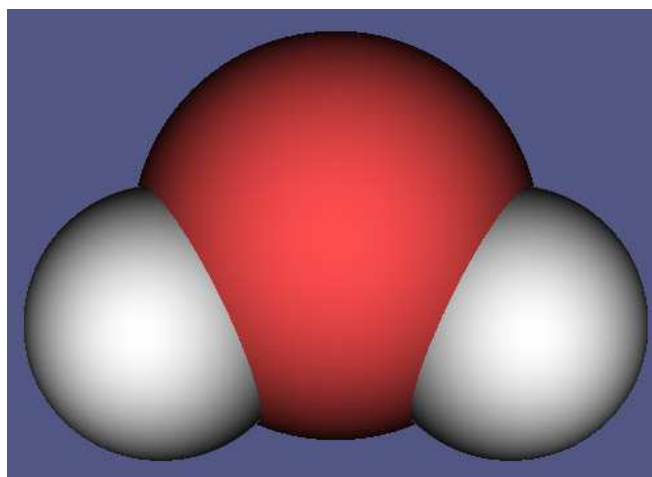
Výsledky měření na uracilu jsou tedy zcela v souladu s výsledky měření na cytosinu – ukazují, že je možné pomocí titračních měření získat spektra forem s různým stupněm protonace. Formy s částečnou protonací na pozicích snadno vyměnitelných vodíků se stejnou stechiometrií protonovaných a deuterovaných pozic však není možné vzájemně rozlišit. Časy výměny jsou bohužel příliš rychlé, aby je bylo možné rozlišit. Navíc je dominantním spektrálním jevem bezprostředně po přidání těžké vody okamžitý nárůst úrovně pozadí, který se po zpracování spekter projevuje zvýšením úrovně šumu.

5.2 Sledování proton-deuteronové výměny na nukleosidech

Pro další experimenty jsme se obrátili ke složkám nukleových kyselin s vyšší rozpustností, tedy nukleosidům. Ty dovolují pracovat s koncentracemi více než desetkrát vyššími než v případě bází nukleových kyselin. To umožňuje provádět několikastupňová titrační měření s dobrým poměrem signál-šum a současně dává i naději na získání valenčních vodíkových spekter.

Na druhé straně, vysoká koncentrace vzorků může již být příčinou rozdílného poměru H_2O , HDO a D_2O v rozpouštědle, oproti referenčnímu experimentu s přidáváním pouze D_2O do H_2O . Proto byly pro získání referenčních spekter provedeny analogické experimenty jako v případě uridinu, byly ale vyhodnoceny samostatně až po nalezení Ramanových spekter jednotlivých složek, tedy H_2O , HDO a D_2O .

5.2.1 Získání referenčních spekter pro měření na uridinu, sledováním proton-deuteronové výměny u vody



Obr. 42: Molekula vody. Zdroj [7]

Abychom zmenšili vliv změny iontové síly na spektra vody, prováděli jsme oboje měření, tedy jak měření s uridinem, tak měření pouze s vodou, s přidáním 0,5 M NaCl.

Měření při 6 °C

Pro měření s vodou jsme tedy připravili 0,5 M roztoky NaCl v H_2O a v D_2O . pH obou roztoků bylo dorovnáno na hodnotu 6,8 přidáním malého množství HCl.

Měření probíhalo za teploty 6°C nezávisle ve třech spektrálních úsecích pokrývajících jak oblast nižších vibrací, tak oblasti valenčních vibrací deuteriových i lehkého vodíku. Experiment probíhal v režimu postupného zaznamenávání spekter s maximálním možným časovým rozlišením, což bylo u uridinových měření 17 sekund. Během měření jsme postupně přidávali do původního 1 ml H_2O s NaCl po 0,4 ml D_2O s NaCl. Výjimku tvořilo měření v oblasti nejvyšších vlnočtů, kdy byl poslední přírůstek rozdělen na 0,3 ml a 0,1 ml. Celkové přírůstky a z nich vypočtené podíly H_2O , HDO a D_2O za předpokladu nahodilého rozdělení protonů a deuteronů jsou uvedeny v tabulce 5.

Spektrální oblasti, v nichž měření probíhala, spolu s časovými charakteristikami nabírání spekter, počtem opakování titrací, objemů míchaných vzorků, a dalších podmínek, za nichž experiment probíhal, shrnuje velmi přehledně tabulka 6.

Tab. 5: Přidávaná množství D₂O^a do 1 ml H₂O^a

přídavek D ₂ O ^{a,b}	podíl D/H	podíl H ₂ O	podíl HDO	podíl D ₂ O
0	0	100 %	0	0
400 µL	0,28	51 %	41 %	8 %
800 µL	0,44	31 %	49 %	20 %
1100 µL ^c	0,52	23 %	50 %	27 %
1200 µL	0,55	21 %	50 %	30 %

Poznámky: ^{a)} s obsahem 0,5 M NaCl, ^{b)} sumárně celkový přídavek od začátku experimentu, ^{c)} pouze při měření ve spektrální oblasti centrované na 3380 cm⁻¹.

Tab. 6: Titrační měření postupného přidávání D₂O do H₂O

Střed sp. oblasti	Doba integrace	Četnost integrací	Čas na 1 sp.	Počet spekter
1015 cm ⁻¹	3 s	3 x	17 s	81
2290 cm ⁻¹	3 s	3 x	17 s	75

Původní objem H₂O = 1000 µl byl ochlazen z pokojové teploty na 6°C

1. přidané množství D₂O – 400 µl
2. přidané množství D₂O – 400 µl
3. přidané množství D₂O – 400 µl

Přidávání se odehrálo při teplotě 6°C pro H₂O i D₂O umístěné současně uvnitř revolverového kyvetového držáku.

Střed sp. oblasti	Doba integrace	Četnost integrací	Čas na 1 sp.	Počet spekter
3380 cm ⁻¹	3 s	3 x	17 s	99

Původní objem H₂O = 1000 µl byl ochlazen z pokojové teploty na 6°C

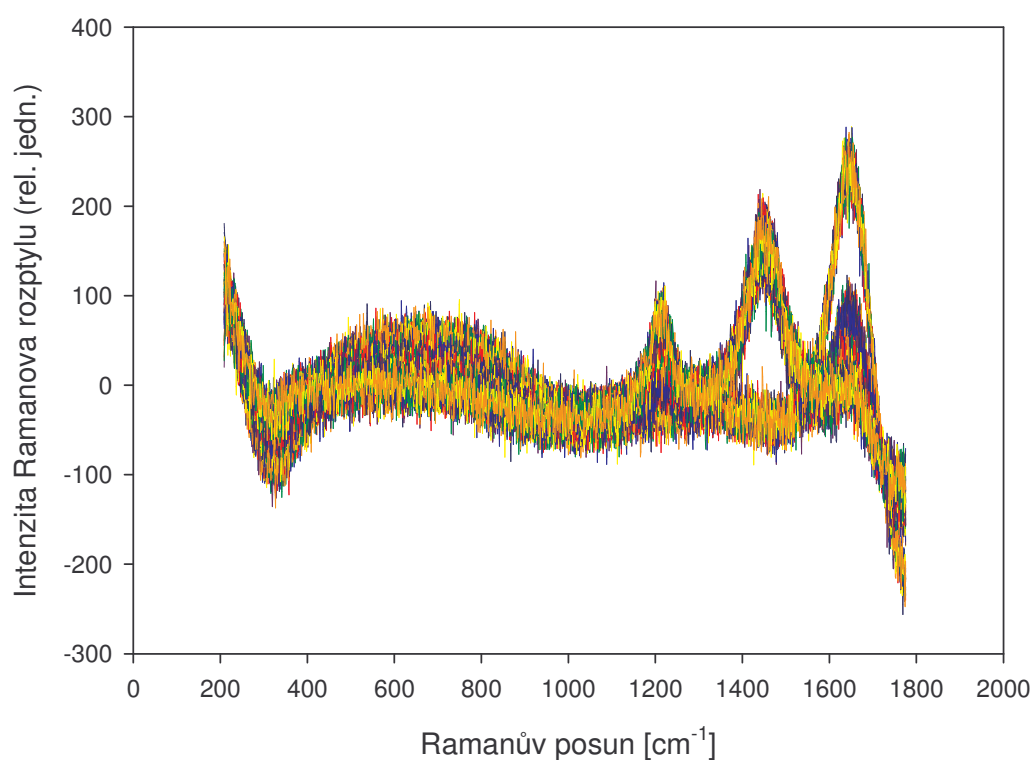
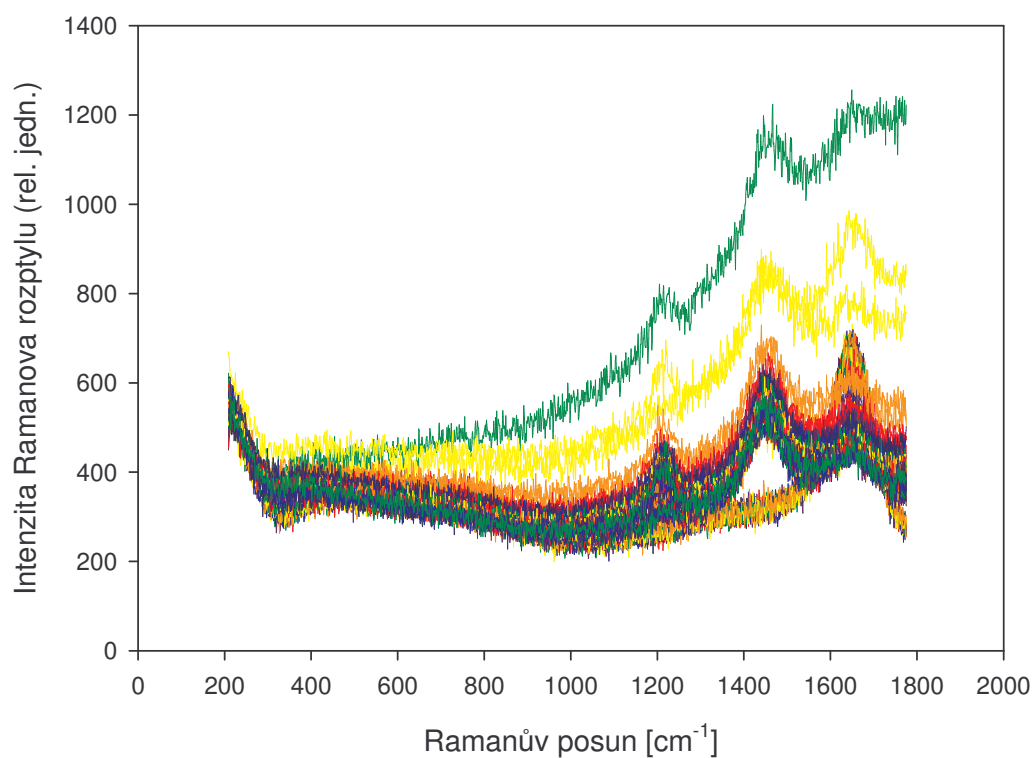
1. přidané množství D₂O – 400 µl
2. přidané množství D₂O – 400 µl
3. přidané množství D₂O – 300 µl
4. přidané množství D₂O – 100 µl

Přidávání se odehrálo při teplotě 6°C pro H₂O i D₂O umístěné současně uvnitř revolverového kyvetového držáku.

Spektra naměřená ve spektrální oblasti centrované na 1015 cm^{-1} jsou uvedena na obrázku 43. Výsledky SVD aplikované na tato spektra po korekci pozadí pomocí ortogonalizace (obrázek 43 dole) jsou uvedena na obrázku 44.

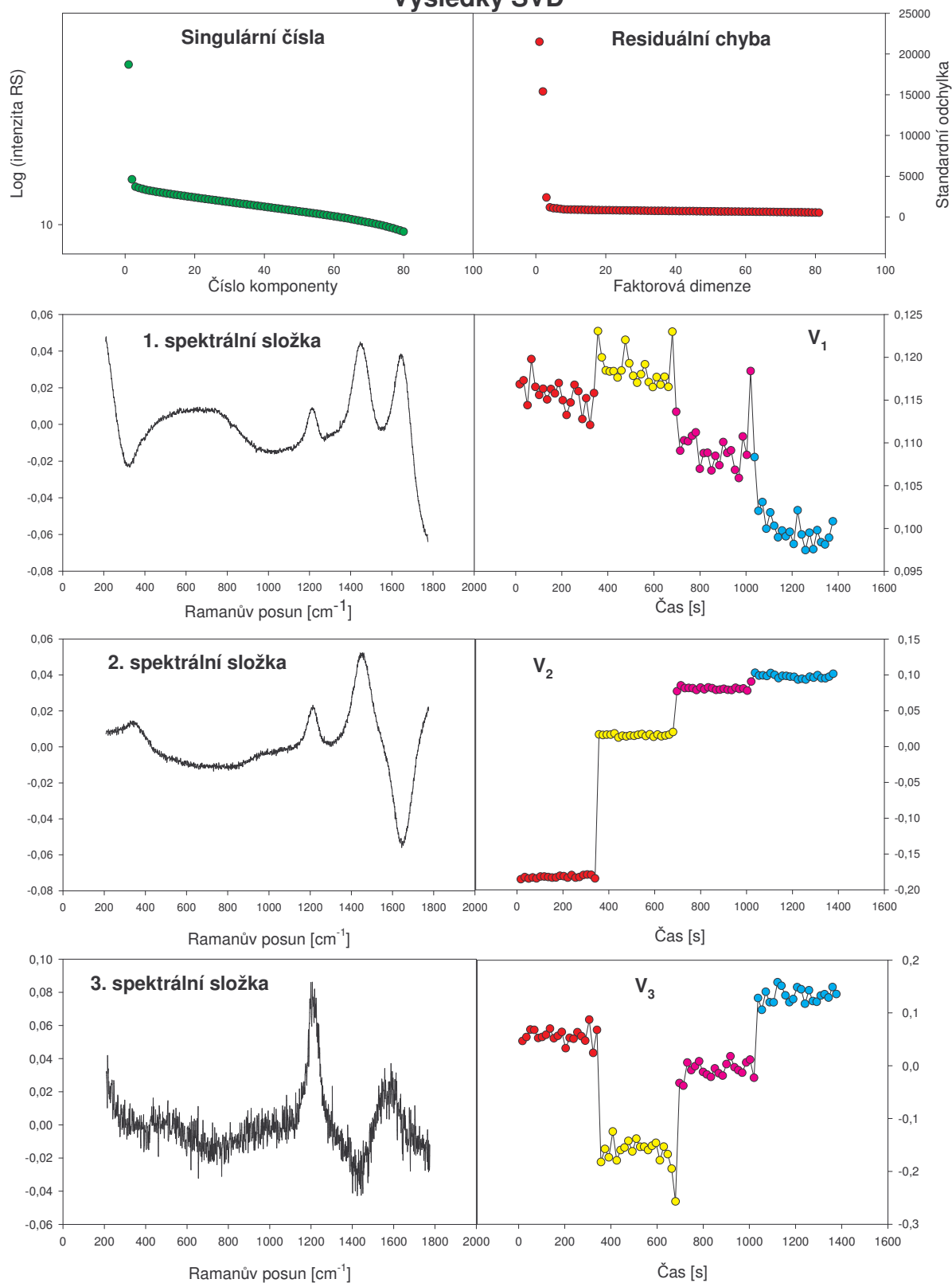
Z výsledků SVD analýzy vyplývá, že série spekter obsahuje tři významné složky, což odpovídá třem očekávaným různě deuterovaným formám molekul vody, tedy H_2O , HDO a D_2O . Podíly těchto složek se mění skokově při přidávání D_2O , jinak jsou úrovně těchto komponent konstantní. Při přidávání jsou patrné výchytky od konstantních úrovní především u prvního a třetího koeficientu. Zcela zřejmě se opět jedná o jev způsobený dočasnou silnou nehomogenitou vzorku bezprostředně po přidání D_2O , který se projevuje nárůstem šumu. Zřetelně to potvrzuje i statisticky nevýznamná čtvrtá komponenta.

Protože známe koncentrace H_2O , HDO a D_2O (tabulka 5) v jednotlivých fázích titračního experimentu, můžeme extrahovat Ramanova spektra těchto komponent postupem uvedeným v kapitole 2.5.3. Pro zlepšení přesnosti jsme nejprve eliminovali spektra změřená při přidávání D_2O a znovu provedli SVD analýzu. Její výsledky jsou na obrázku 45. Potom byly jednotlivé průběhy koeficientů nafitované podle vztahu (2.5.3.5). Nafitované průběhy jsou rovněž zakreslené na obrázku 45. Jak je vidět, nafitované průběhy velmi dobře souhlasí s experimentálně zjištěnými průběhy. Tyto fity umožnily určení transformačních koeficientů a pomocí nich získat spektra jednotlivých forem. Výsledná spektra jsou na obrázku 46. Je dobře vidět, že jde skutečně o oddělená spektra jednotlivých forem, protože obsahují vždy jen jeden pás deformační vibrace vody, který je na 1644 cm^{-1} u H_2O , na 1448 cm^{-1} u HDO a na 1212 cm^{-1} u D_2O .



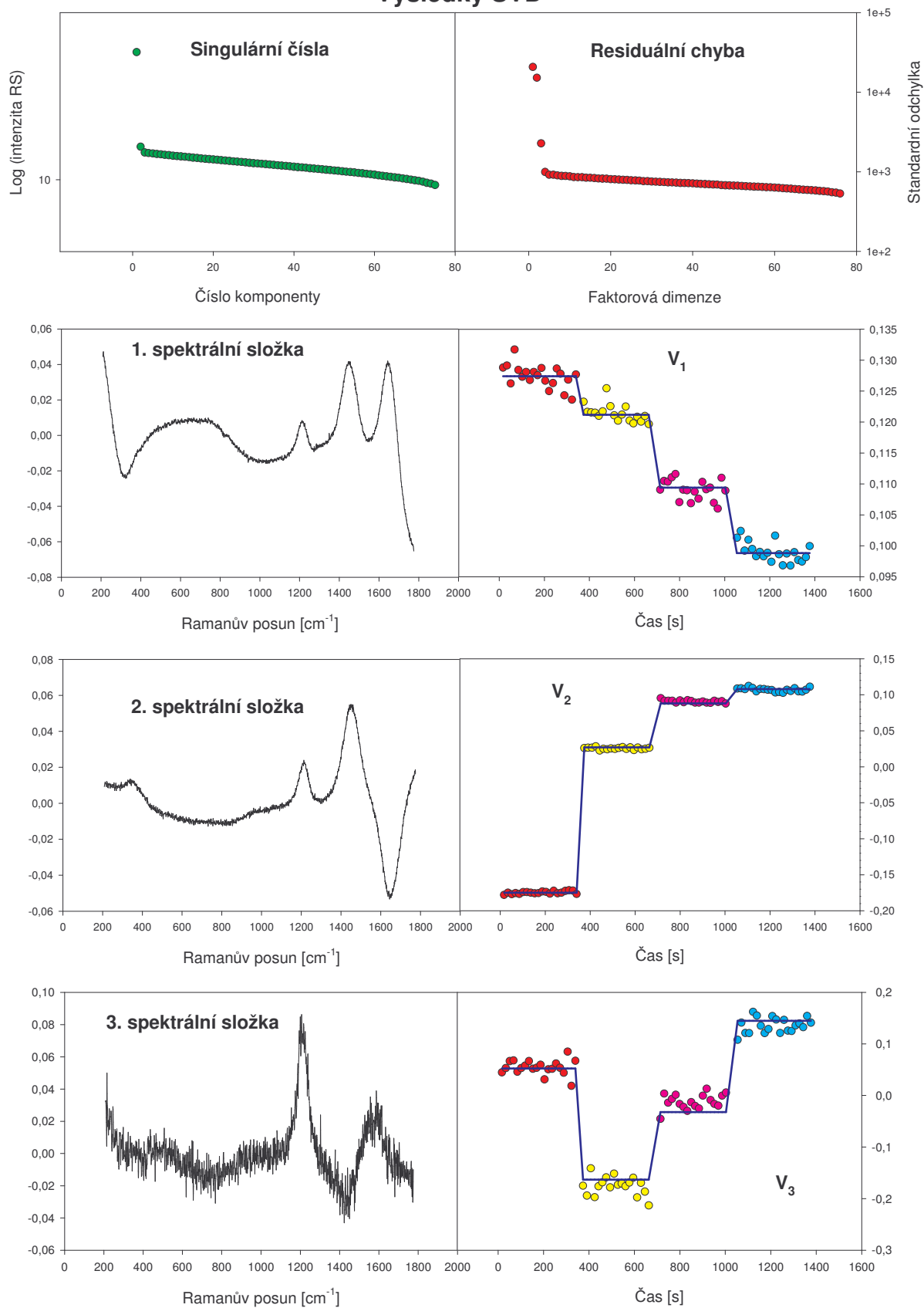
Obr. 43: Spektra Ramanova rozptylu z první spektrální oblasti 200 – 1800 cm⁻¹, při postupném přidávání D₂O (přidávaná množství jsou v tabulce 6) do 1 ml H₂O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole pak spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.

Výsledky SVD

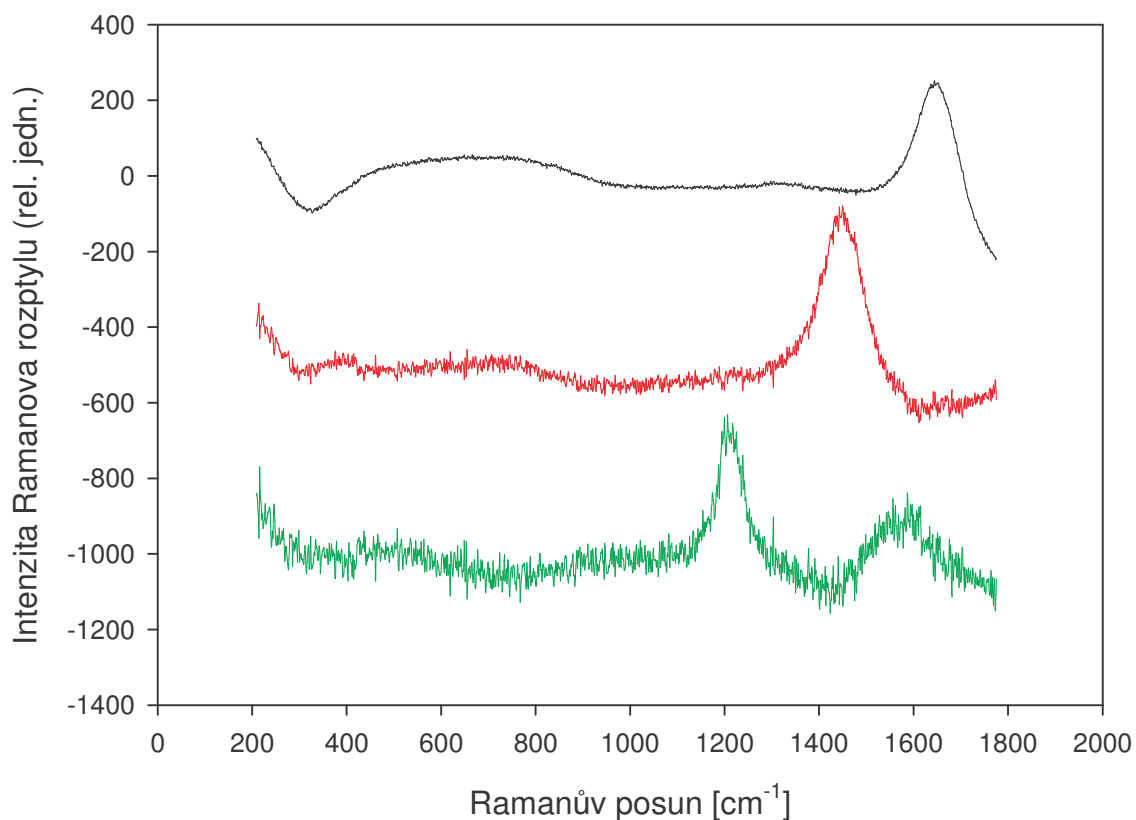


Obr. 44: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter při přidávání D_2O do 1 ml H_2O , zobrazených na obrázku 43 dole.

Výsledky SVD

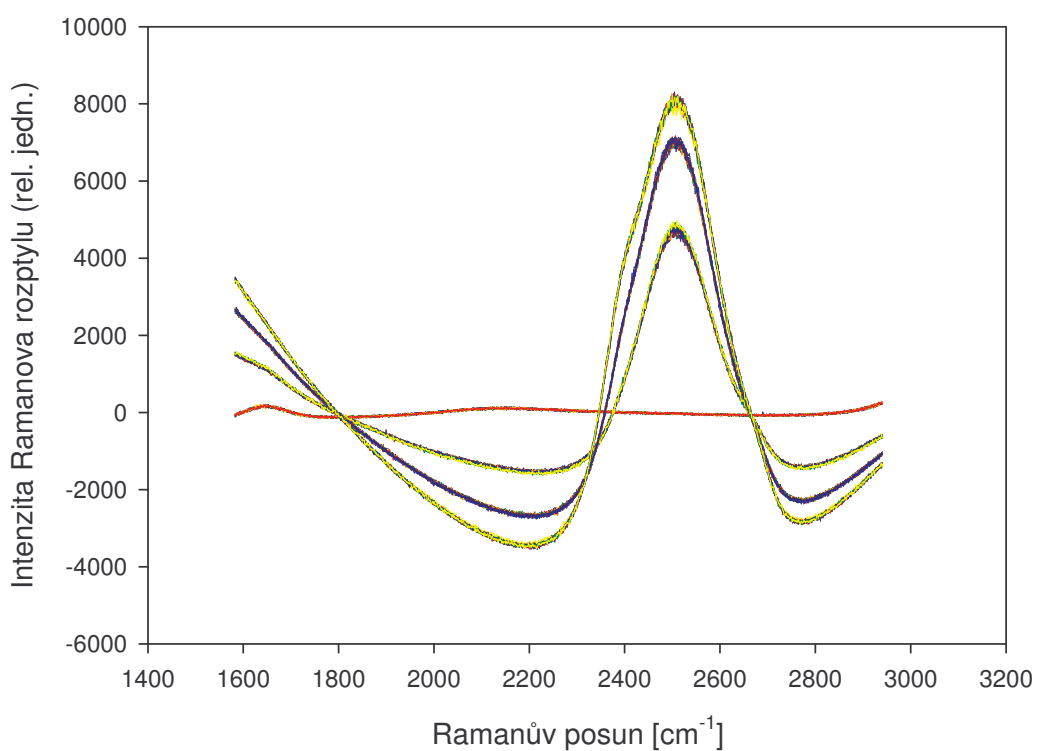
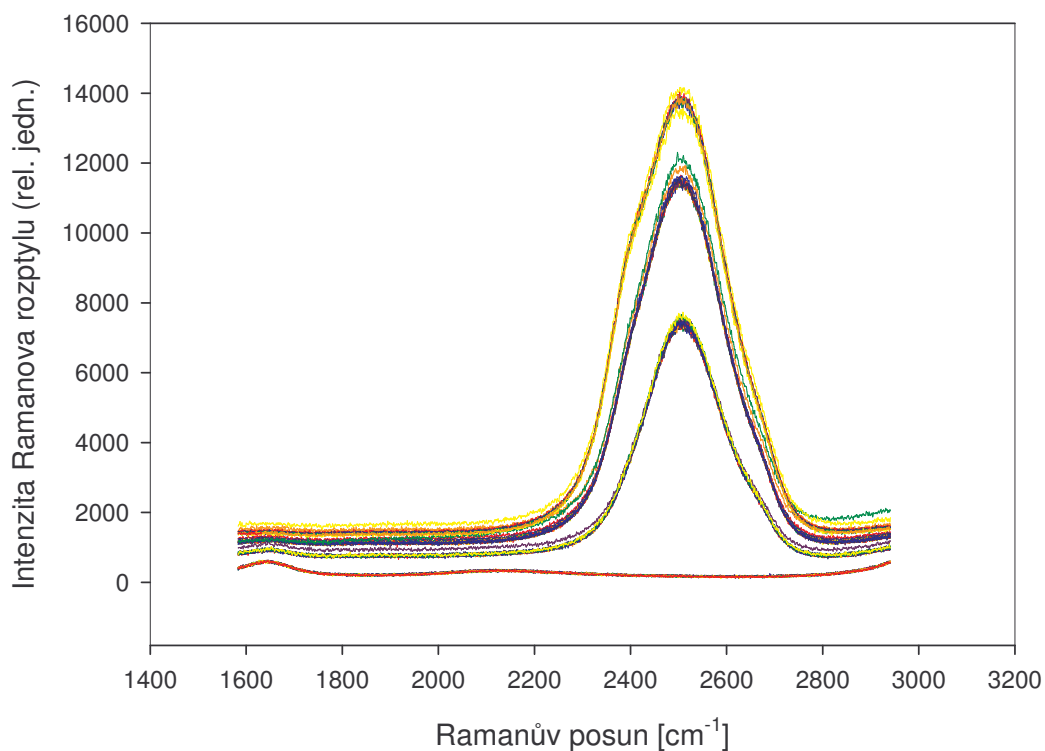


Obr. 45: Výsledky faktorové analýzy spekter z obrázku 43 dole, po eliminaci spekter získaných těsně po přidání D₂O do H₂O. Modré křivky v grafech průběhů koeficientů V_1 , V_2 a V_3 jsou výsledky fitu při uvažovaných sumárních koncentracích různě deuterovaných molekul.



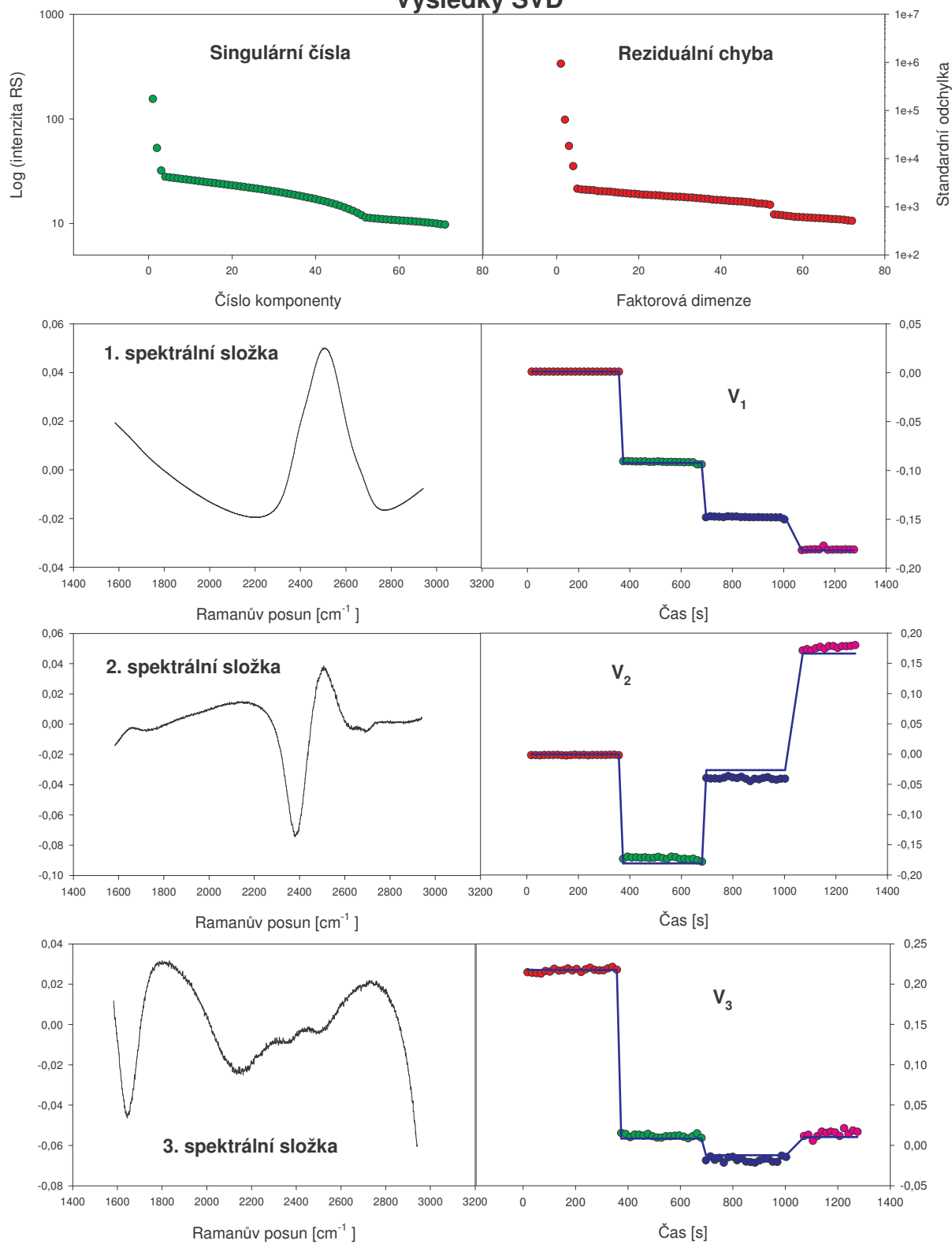
Obr. 46: Extrahovaná spektra jednotlivých různě deuterovaných forem. Je zřetelně vidět, že jde skutečně o oddělená spektra jednotlivých forem, neboť obsahují vždy jen jeden pás deformační vibrace vody, který je na 1644 cm^{-1} u H_2O (nahore), na 1448 cm^{-1} u HDO (uprostřed) a na 1212 cm^{-1} u D_2O (dole).

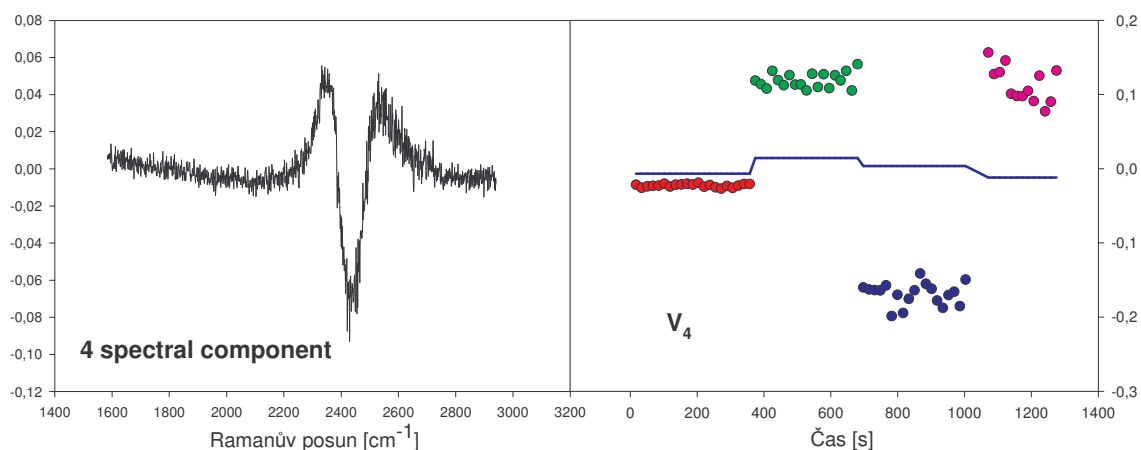
Obdobně byla prováděna měření v oblasti centované na 2290 cm^{-1} , kde jsou dominantní valenční vibrace O-D. Naměřená spektra jsou na obrázku 47 a výsledky SVD analýzy (již s odstraněním spekter naměřených při přidávání D_2O) na obrázku 48. V tomto případě je poněkud překvapivé, že faktorová dimenze je rovna čtyřem a nikoli očekávaným třem.



Obr. 47: Spektra Ramanova rozptylu ve spektrální oblasti valenčních vibrací deuteria při postupném přidávání D₂O (přidávaná množství jsou v tabulce 10) do 1 ml H₂O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole pak spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.

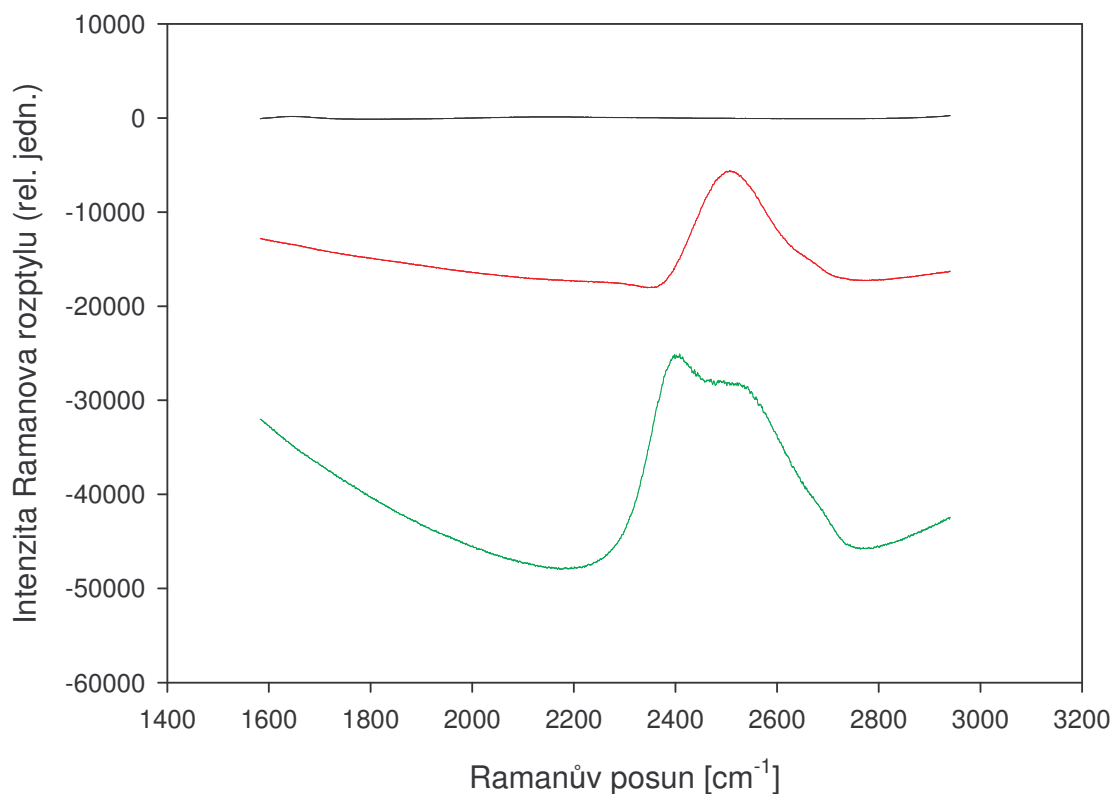
Výsledky SVD





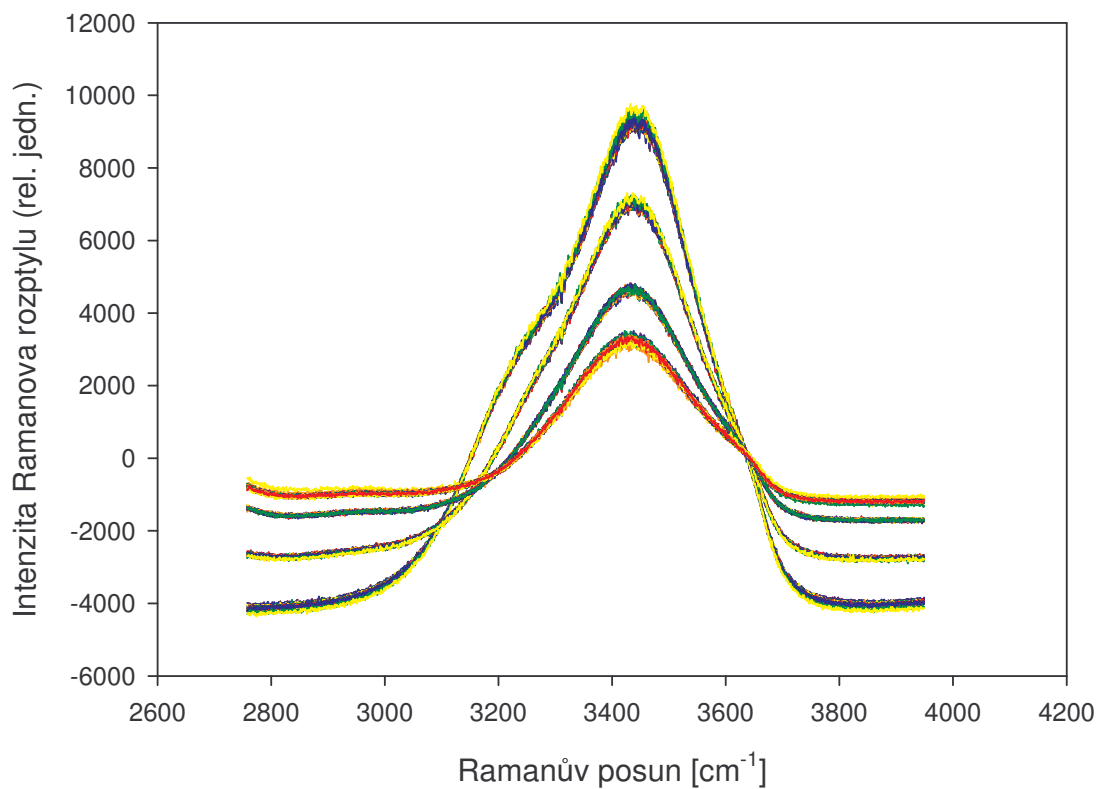
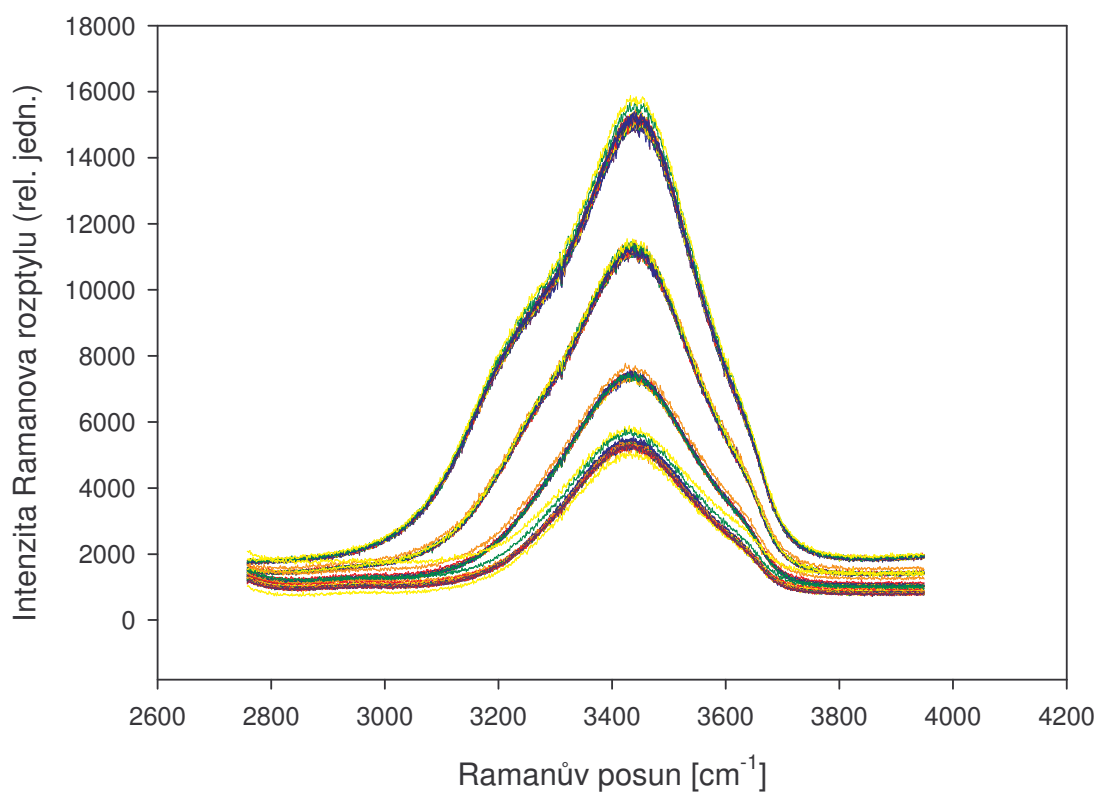
Obr. 48: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter ve spektrální oblasti valenčních vibrací deuteria při přidávání D₂O do 1 ml H₂O, zobrazených na obrázku 47. Modré křivky v grafech průběhů koeficientů V₁, V₂, V₃ a V₄ jsou výsledky fitu při uvažovaných sumárních koncentracích tří různě deuterovaných forem molekul.

Provedené fity ukazují, že zatímco koeficienty prvních tří komponent odpovídají koncentracím H₂O, HDO a D₂O podle tabulky 5, koeficient 4. komponenty se změnami koncentrací vůbec nekoreluje. Tato čtvrtá spektrální komponenta zřejmě vystihuje jemnější spektrální efekt, kterým je velmi pravděpodobně mírná změna tvaru spektra HDO v závislosti na složení okolních molekul. Výsledná spektra jednotlivých forem molekuly vody (samozřejmě ve tvaru ortogonalizovaném vůči polynomu 4. stupně) jsou na obrázku 49.

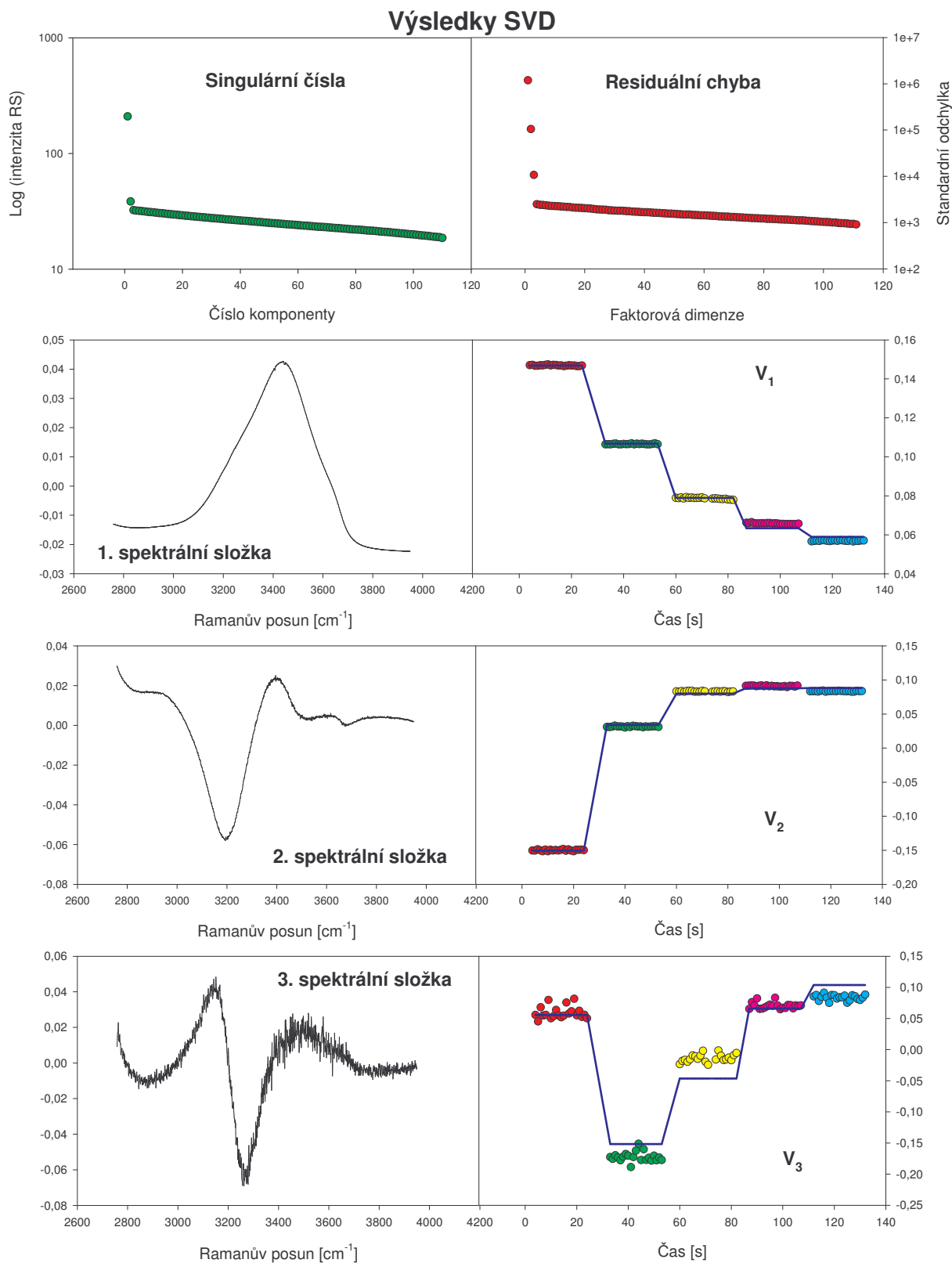


Obr. 49: Extrahovaná spektra jednotlivých různě deuterovaných forem ve spektrální oblasti valenčních vibrací deuteria. Horní křivka odpovídá signálu H₂O, prostřední křivka signálu HDO a spodní křivka signálu D₂O.

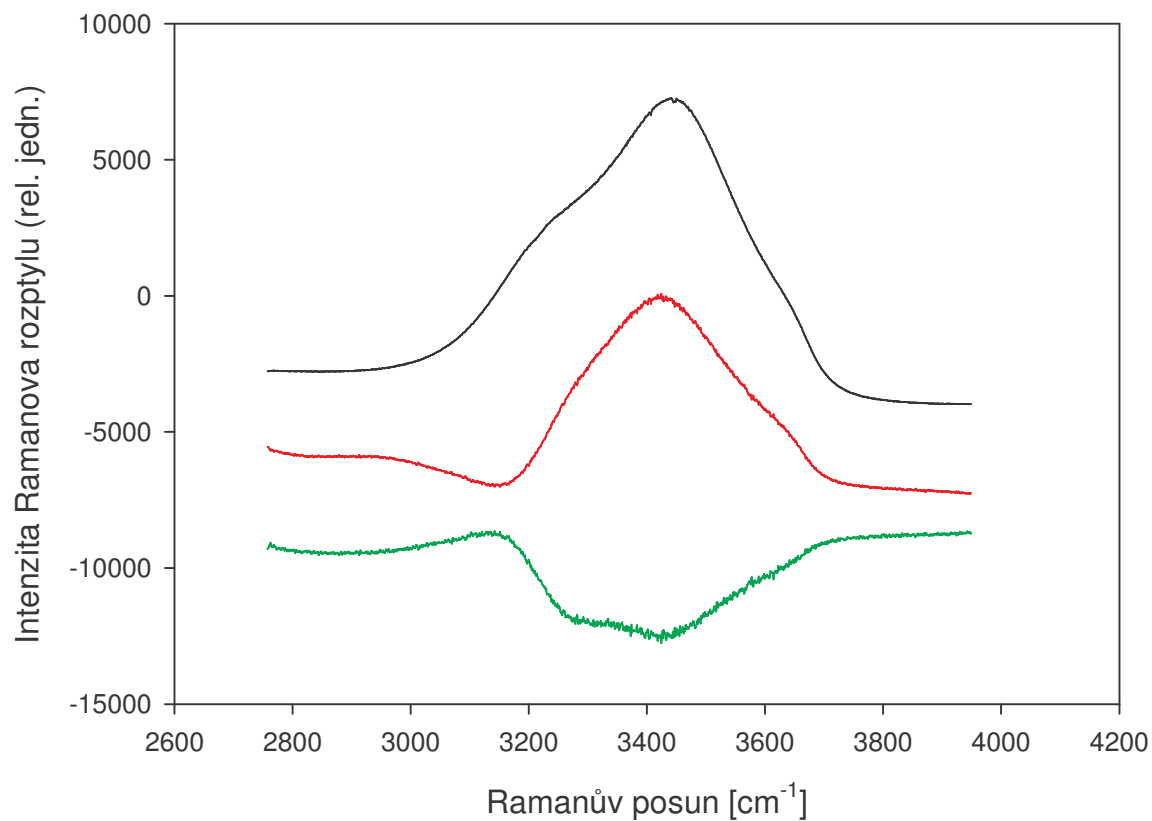
Třetí měření bylo prováděno v oblasti centrované na 3380 cm^{-1} , kde jsou dominantní valenční vibrace O-H. Naměřená spektra jsou na obrázku 50 nahoře, dole pak spektra, která v tomto případě byla s ohledem na nízkou úroveň pozadí ortogonalizovaná pouze vůči polynomu 1. stupně. Výsledky SVD analýzy (již s odstraněním spekter naměřených při přidávání D_2O) vidíme na obrázku 51. Faktorová dimenze je rovna třem, což by mělo být v souladu s očekávanou přítomností tří forem molekul vody. Na druhé straně by v této spektrální oblasti neměla molekula D_2O dávat žádný Ramanův signál. Také je zřejmé, že tvar 3. spektrální komponenty je analogický tvaru čtvrté „nadpočetné“ komponenty u měření v oblasti centrované na 2290 cm^{-1} . Při fitování na tři komponenty je shoda s koeficienty V poněkud horší než v předchozích případech, ale celkem dobrá. Na druhé straně tímto fitem určená spektra (obrázek 52) dávají zcela nereálný průběh pro spektrum D_2O . Došli jsme proto k závěru, že ve skutečnosti se signál D_2O v této spektrální oblasti nevyskytuje, takže faktorová dimenze by měla být rovna dvěma. Třetí dimenze je, podobně jako u oblasti 2290 cm^{-1} dimenze čtvrtá, „nadpočetná“ a vyjadřuje jemnou spektrální závislost spektra molekul vody (v tomto případě dominantně H_2O) na složení okolních molekul. Druhý fit byl tedy proveden pro pouhá dvě očekávaná spektra, tedy složky H_2O a HDO . Výsledky tohoto fitu jsou zakresleny na obrázku 53. Podle očekávání průběh koeficientu V_3 vůbec nekoreluje s předpokládanou změnou koncentrací H_2O a HDO . U koeficientů V_1 a V_2 je shoda poněkud horší, což může znamenat, že spektrální změny spektra H_2O v malé míře ovlivňují i první a druhou dimenzi. Pokud jde o výsledná spektra, je spektrum H_2O získané z obou typů fitů prakticky totožné; v případě HDO bude správný tvar zřejmě mezi oběma získanými průběhy, a proto jsme pro analýzy měření na uridinu pracovali s průměrem z těchto průběhů.



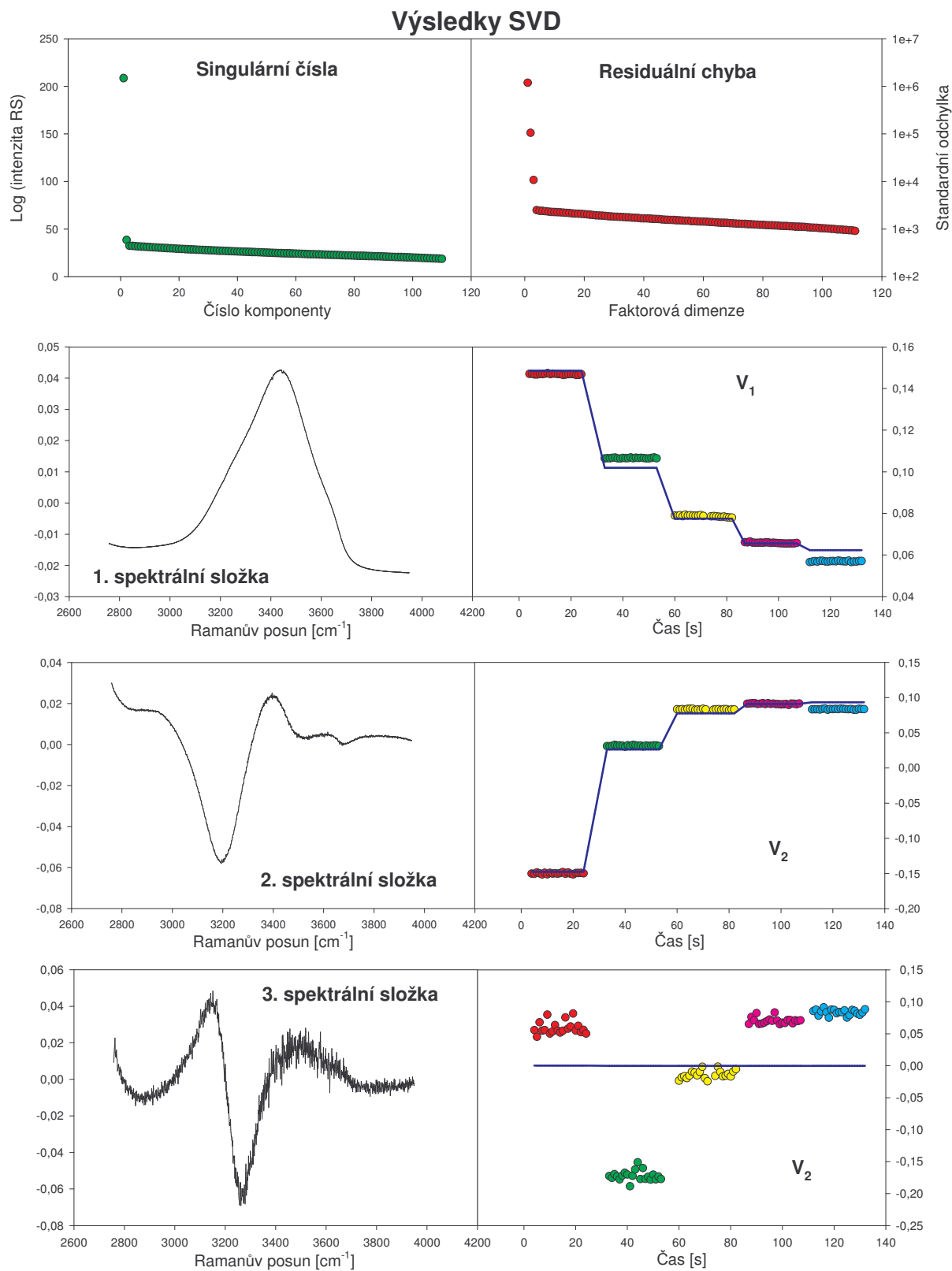
Obr. 50: Spektra Ramanova rozptylu ve spektrální oblasti valenčních vibrací protonů při postupném přidávání D_2O (přidávaná množství jsou v tabulce 10) do 1 ml H_2O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole pak spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 1. stupně.



Obr. 51: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter ve spektrální oblasti valenčních vibrací lehkého vodíku při přidávání D_2O do 1 ml H_2O , zobrazených na obrázku 50. Modré křivky v grafech průběhů koeficientů V_1 , V_2 , a V_3 jsou výsledky fitu při uvažovaných sumárních koncentracích tří různě deuterovaných forem molekul.



Obr. 52: Extrahovaná spektra jednotlivých různě deuterovaných forem ve spektrální oblasti valenčních vibrací lehkého vodíku. Horní křivka odpovídá signálu H_2O , prostřední křivka pak signálu HDO . Průběh Ramanova signálu D_2O , kterému by mělo odpovídat spodní spektrum, je v tomto případě silně zkreslen vlivem jemné spektrální závislosti molekul vody (v tomto případě dominantně H_2O) na složení okolních molekul. Ramanův signál D_2O se ve skutečnosti v této spektrální oblasti vůbec nevyskytuje.



Obr. 53: Druhý fit, provedený pro pouhá dvě očekávaná spektra, tedy složky H_2O a HDO . Dle očekávání průběh koeficientu V_3 nekoreluje s předpokládanou změnou koncentrací H_2O a HDO . U koeficientů V_1 a V_2 je shoda poněkud horší, což může znamenat, že spektrální změny spektra H_2O v malé míře ovlivňují i první a druhou dimenzi.

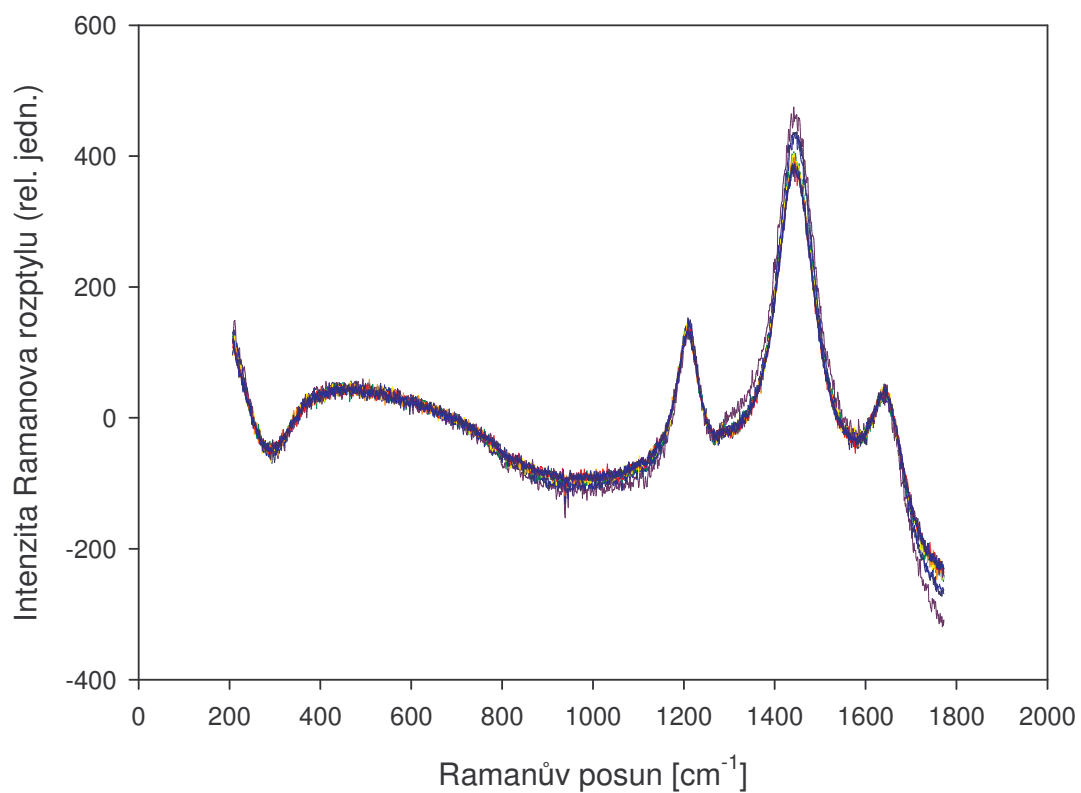
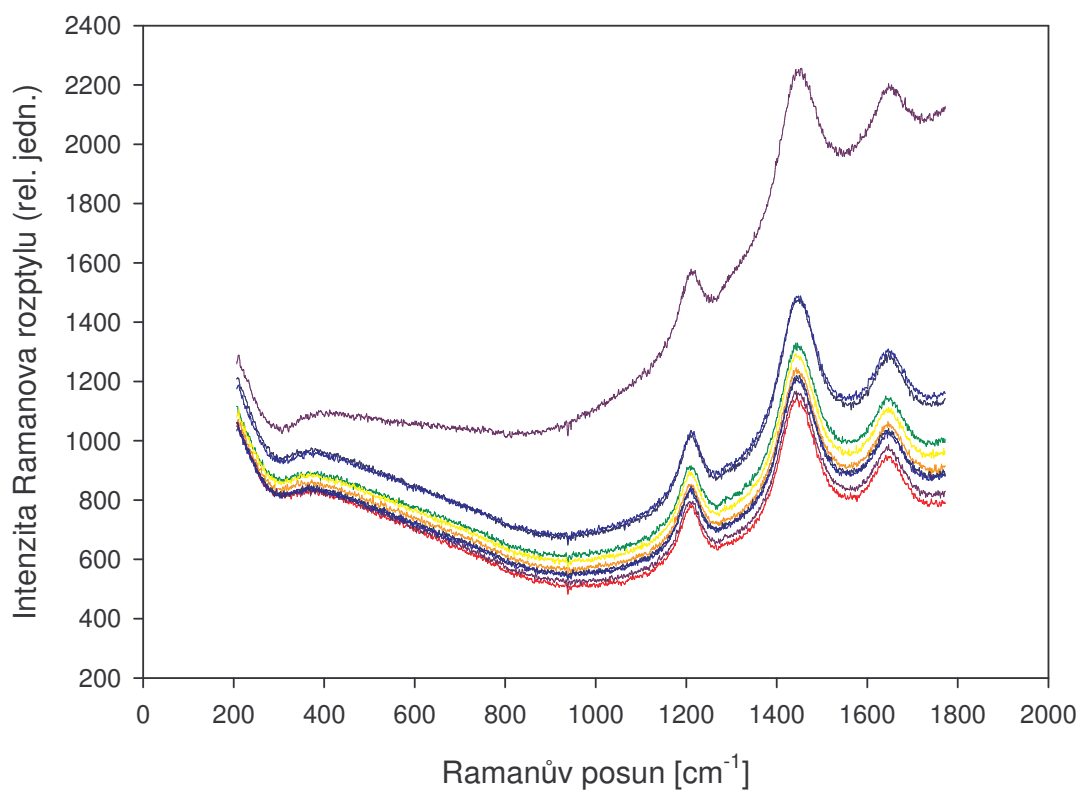
Měření při 60 °C

Deuterované vzorky, získané v této sérii měření při teplotě 6°C, byly následně umístěny v chladničce, kvůli maximálnímu zpomalení dějů. Vzorky, vychlazené zhruba na teplotu 8°C, byly ještě týž den postupně umísťovány do karuselu drženého na teplotě 60°C a ihned měřeny, každý ze vzorků byl použit pro měření v jiné spektrální oblasti. První spektrum tedy bylo nabíráno vždy v průběhu ohřívání vzorku na teplotu 60°C, během nabírání druhého spektra se již teploty vyrovnaly. Parametry tohoto experimentu přehledně shrnuje tabulka 7.

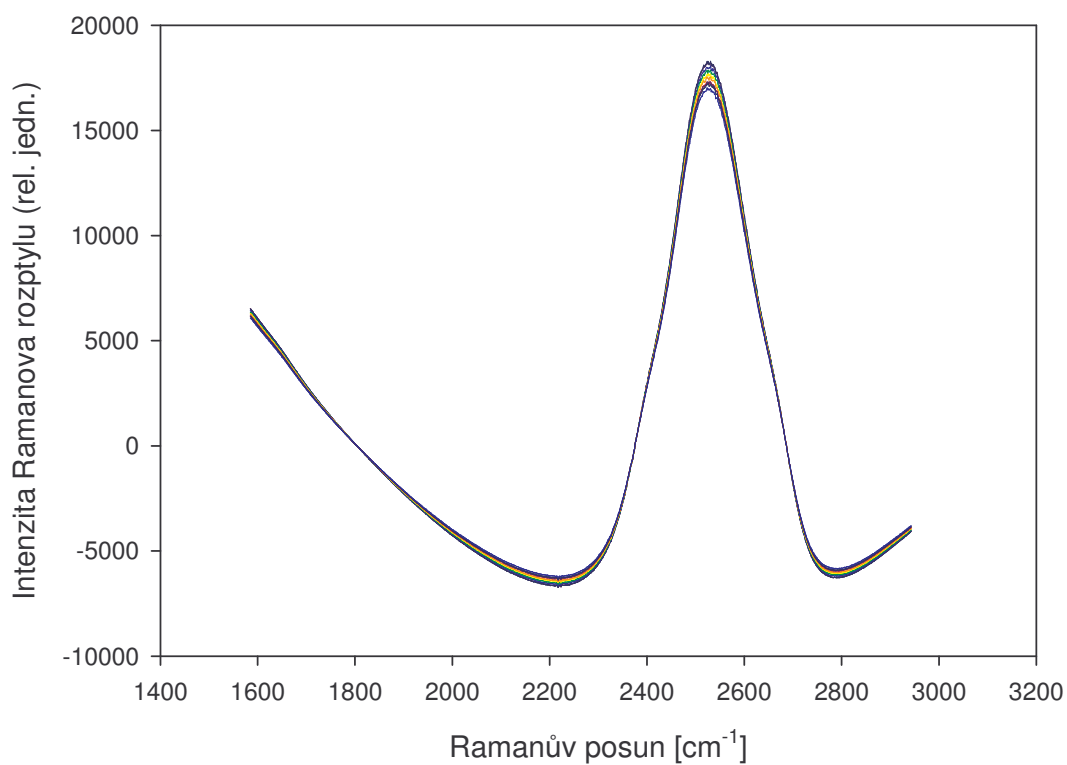
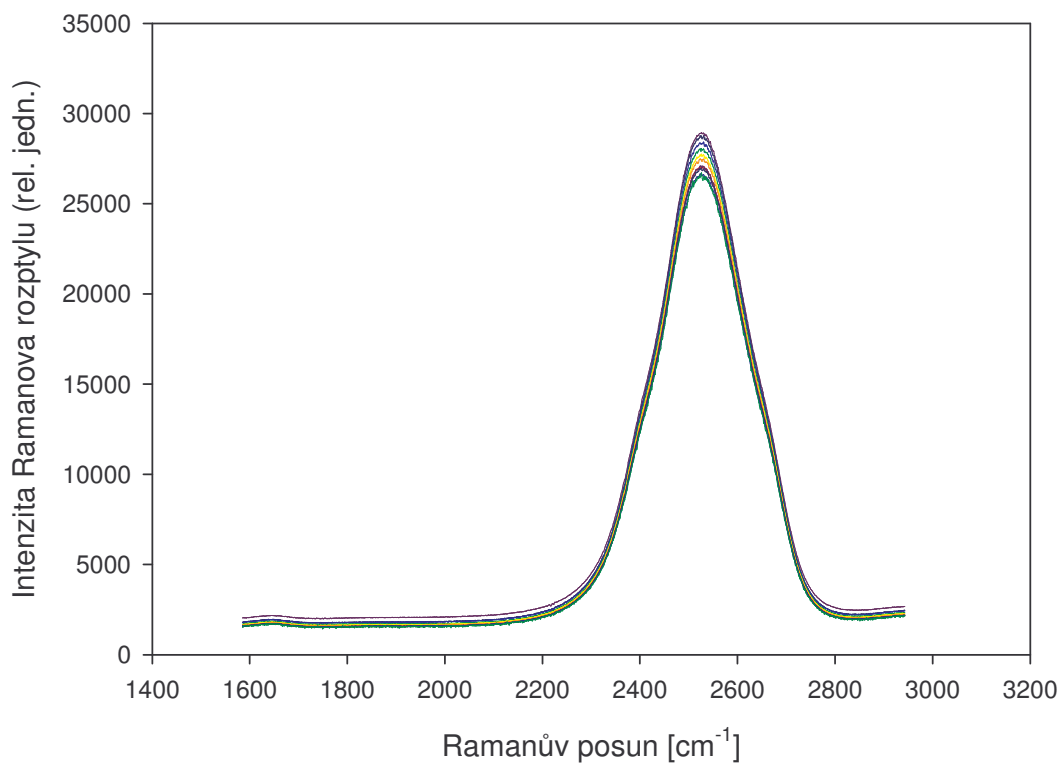
Tab. 7: Časový průběh měření deuterace vody, měřený při 60°C

Střed sp. oblasti	Doba integrace	Četnost integrací	Čas na 1 sp.	Počet spekter
1015 cm ⁻¹	10 s	30 x	416 s	11
2290 cm ⁻¹	10 s	30 x	416 s	11
3380 cm ⁻¹	10 s	30 x	416 s	10

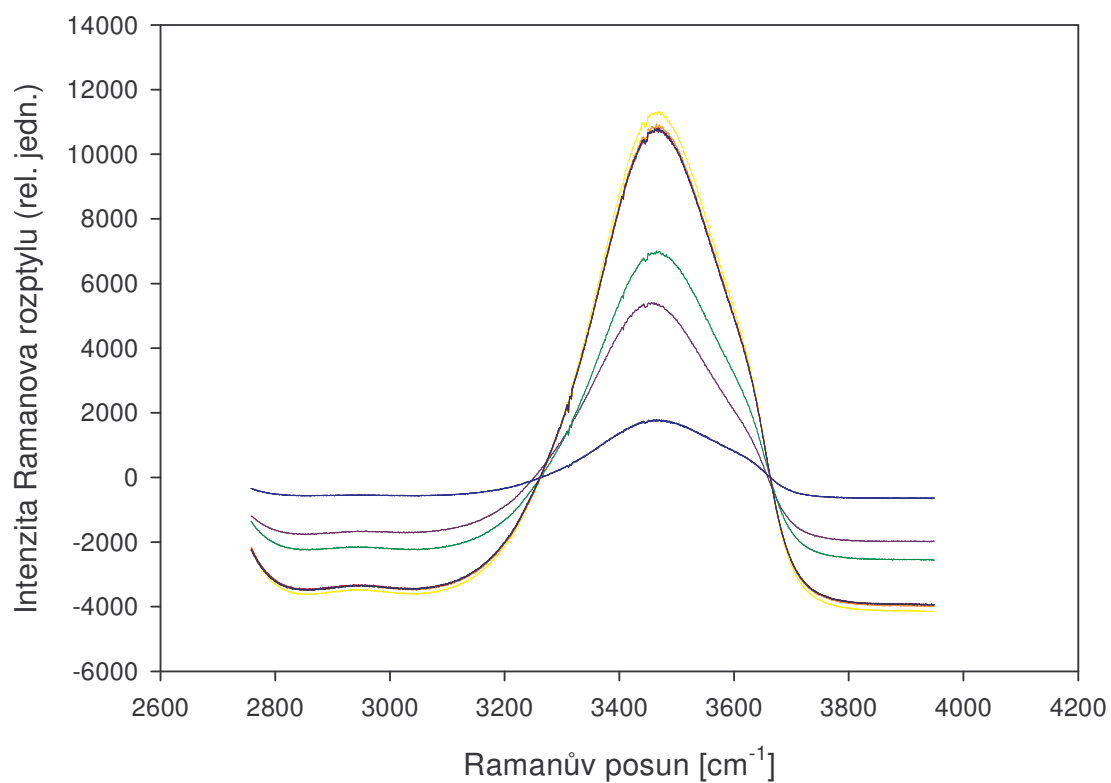
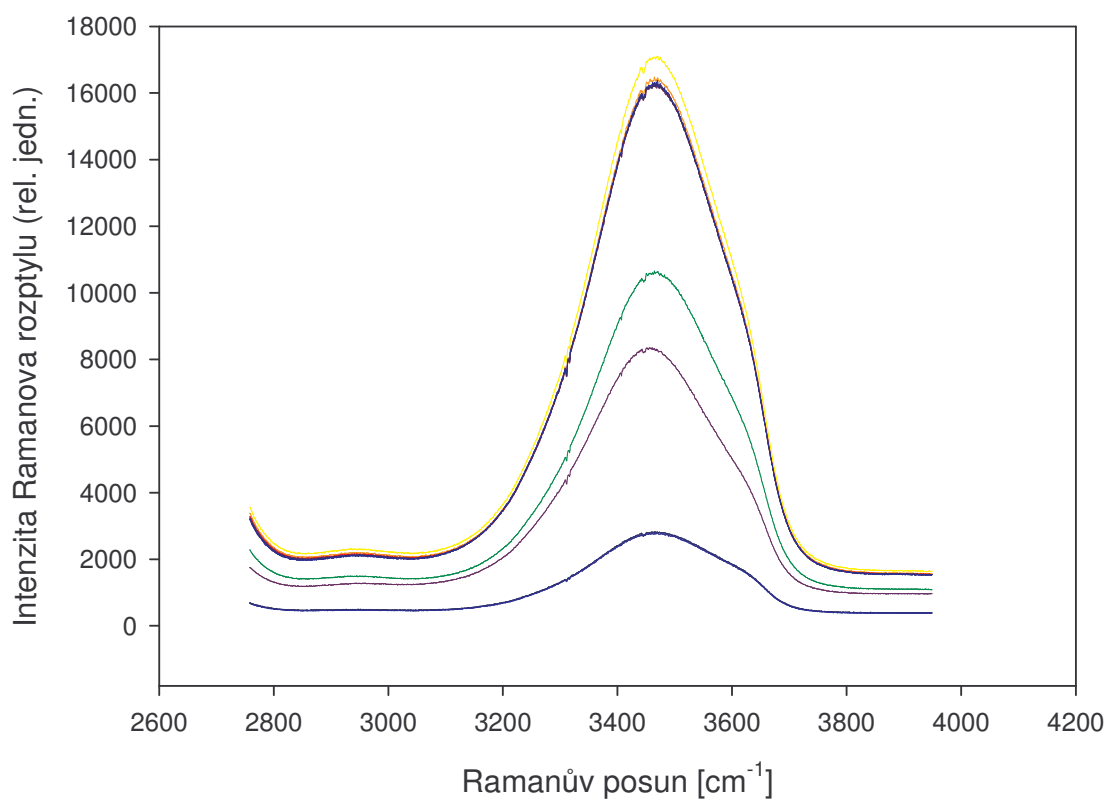
Získaná spektra si můžeme prohlédnout na obrázcích 54, 55 a 56, přičemž v horní části vidíme vždy původní spektrum, v dolní části spektrum ortogonalizované vůči polynomu příslušného stupně.



Obr. 54: Spektra Ramanova rozptylu z první spektrální oblasti $200 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ při časovém vývoji směsi H_2O a D_2O (pH 6,8, 0,5 M NaCl) měřená za teploty 60°C . Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.



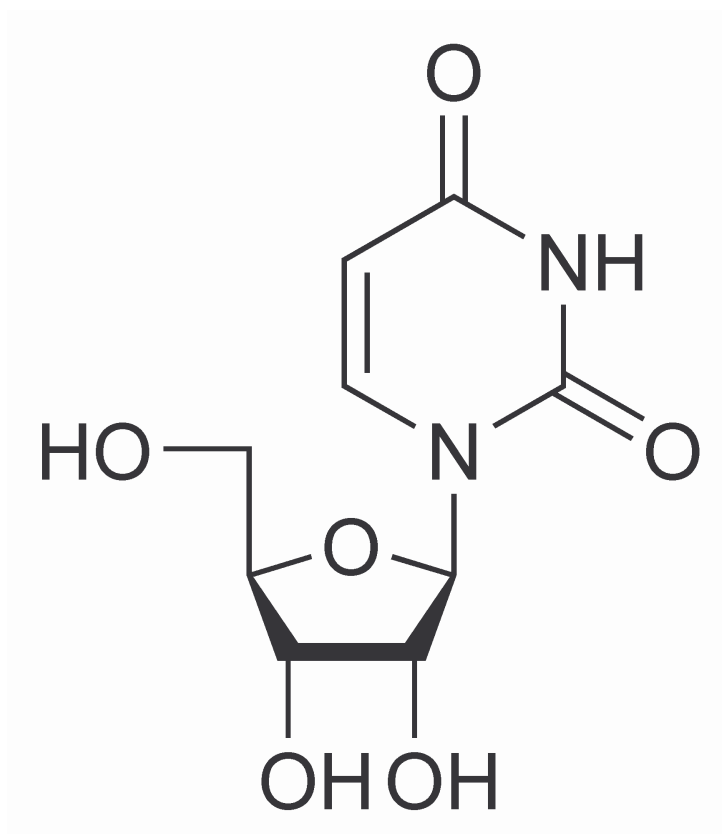
Obr. 55: Spektra Ramanova rozptylu z druhé spektrální oblasti 1600 – 3000 cm^{-1} při časovém vývoji směsi H_2O a D_2O (pH 6,8, 0,5 M NaCl) měřená za teploty 60°C . Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.



Obr. 56: Spektra Ramanova rozptylu ze třetí spektrální oblasti $2900 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, při časovém vývoji směsi H_2O a D_2O (pH 6,8, 0,5 M NaCl) měřená za teploty 60°C . Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.

5.2.2 Sledování proton-deuteronové výměny na uridinu

V případě uridinu máme molekulu s poměrně vysokou rozpustností ve vodě, která je však složitější a zahrnuje více vodíkových atomů (viz obrázek 57). Obsahuje celkem čtyři snadno vyměnitelné vodíky, z toho jeden vodík iminoskupiny na uracilu a tři na OH skupinách ribózy, dále 8 špatně vyměnitelných vodíků, z nichž dva jsou vázány na uhlíky uracilu a zbývající na uhlíky ribózy. Je však možno očekávat, že zejména v oblasti vibrací pod 1800 cm^{-1} budou dominantní Ramanovy čáry pocházející od uracilové části, které nebudou citlivé na stav deuterace ribózy.



Obr. 57: Molekula Uridinu. Zdroj [10]

Měření při 6 °C

Pro měření jsme připravili 500 mM roztok uridinu v H_2O s 0,5 M NaCl, pH bylo nastaveno na hodnotu 6,8. Měření probíhalo za teploty 6°C nezávisle ve třech spektrálních úsecích pokrývajících jak oblast nižších vibrací, tak oblasti valenčních vibrací deuteriových i lehkého vodíku. Experiment byl prováděn ve stejném režimu jako u výše popsaných referenčních měření (přesněji řečeno, referenční měření byla prováděna za stejného režimu jako měření s uridinem, protože byla prováděna později). 1 ml roztoku jsme vložili do kyvety a po temperaci tohoto roztoku i zásobního roztoku D_2O s 0,5 M NaCl bylo spuštěno automatické zaznamenávání spekter po 17 sekundách. Během měření jsme postupně přidávali do původního roztoku v H_2O s NaCl po 0,4 ml D_2O s NaCl. Výjimku tvořilo měření v oblasti nejvyšších vlnočtů, kdy byl poslední přídavek rozdělen na 0,3 ml a 0,1 ml. Celkové přídávky a z nich vypočtené podíly různě deuterovaných forem uridinu a za předpokladu nahodilého rozdělení protonů a deuteronů jsou uvedené v tabulce 9.

Tab. 9: Přidávaná množství D₂O^a do 1 ml roztoku 500mM uridinu v H₂O^a

přídavek D ₂ O ^{a,b}	poměr D/(H+D)	podíl prot.Urn ^d	podíl 1x deut.Urn ^c	podíl 2x deut.Urn ^e	podíl 3x deut.Urn ^c	podíl deut.Urn ^e	podíl prot.Ura ^f	podíl deut.Ura ^f
0	0	100 %	0	0	0	0	100 %	0
400 µL	0,29	26 %	42 %	25 %	7 %	1 %	71 %	29 %
800 µL	0,44	10 %	30 %	37 %	20 %	4 %	56 %	44 %
1100 µL ^c	0,52	5 %	23 %	37 %	27 %	8 %	48 %	52 %
1200 µL	0,55	4 %	20 %	37 %	30 %	9 %	45 %	55 %

Poznámky: ^{a)} s obsahem 0,5 M NaCl, ^{b)} sumárně celkový přídavek od začátku experimentu, ^{c)} pouze při měření ve spektrální oblasti centrované na 3380 cm⁻¹, ^{d)} plně protonovaný uridin, ^{e)} sumární podíl všech forem s určitým stupněm deuterace v pozicích lehce vyměnitelných vodíků, ^{f)} podíl všech forem uridinu s protonovaným (deuterovaným) iminovodíkem na uracilu

Tab. 10: Titrační měření postupného přidávání D₂O do roztoku 500mM uridinu v H₂O

Střed sp. oblasti	Doba integrace	Četnost integrací	Čas na 1 sp.	Počet spekter
1015 cm ⁻¹	3 s	3 x	17 s	90
2290 cm ⁻¹	3 s	3 x	17 s	84

Původní objem vzorku 500mM uridinu v H₂O = 1000 µl byl ochlazen z pokojové teploty na 6°C

4. přidané množství D₂O – 400 µl
5. přidané množství D₂O – 400 µl
6. přidané množství D₂O – 400 µl

Přidávání se odehrálo při teplotě 6°C pro oba vzorky, umístěné zároveň uvnitř revolverového kyvetového držáku.

Střed sp. oblasti	Doba integrace	Četnost integrací	Čas na 1 sp.	Počet spekter
3380 cm ⁻¹	3 s	3 x	17 s	107

Původní objem vzorku 500mM uridinu v H₂O = 1000 µl byl ochlazen z pokojové teploty na 6°C

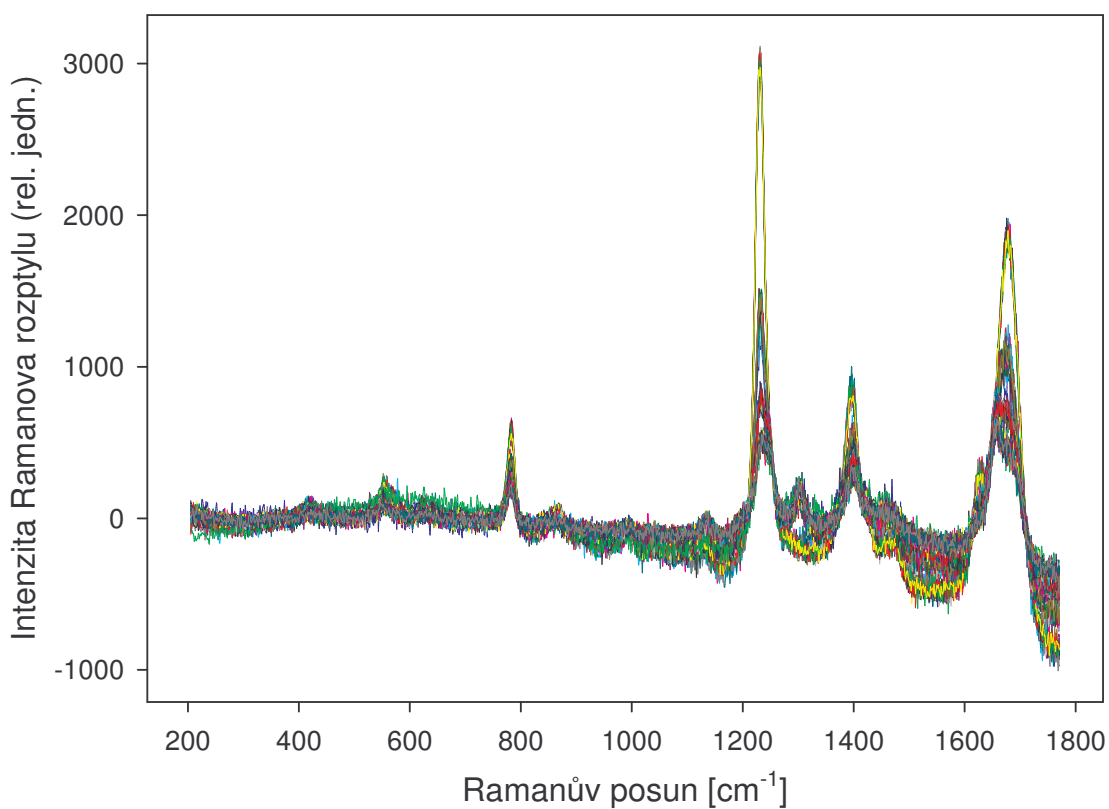
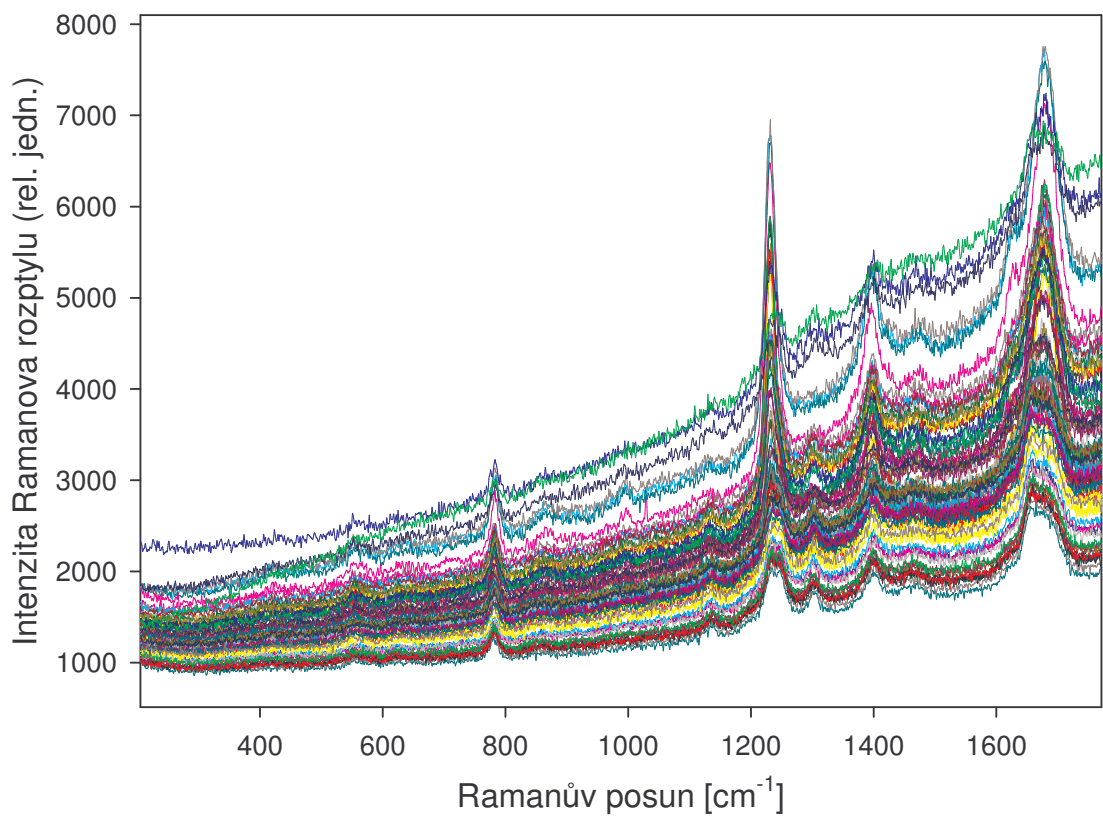
5. přidané množství D₂O – 400 µl
6. přidané množství D₂O – 400 µl
7. přidané množství D₂O – 300 µl
8. přidané množství D₂O – 100 µl

Přidávání se odehrálo při teplotě 6°C pro oba vzorky, umístěné zároveň uvnitř revolverového kyvetového držáku.

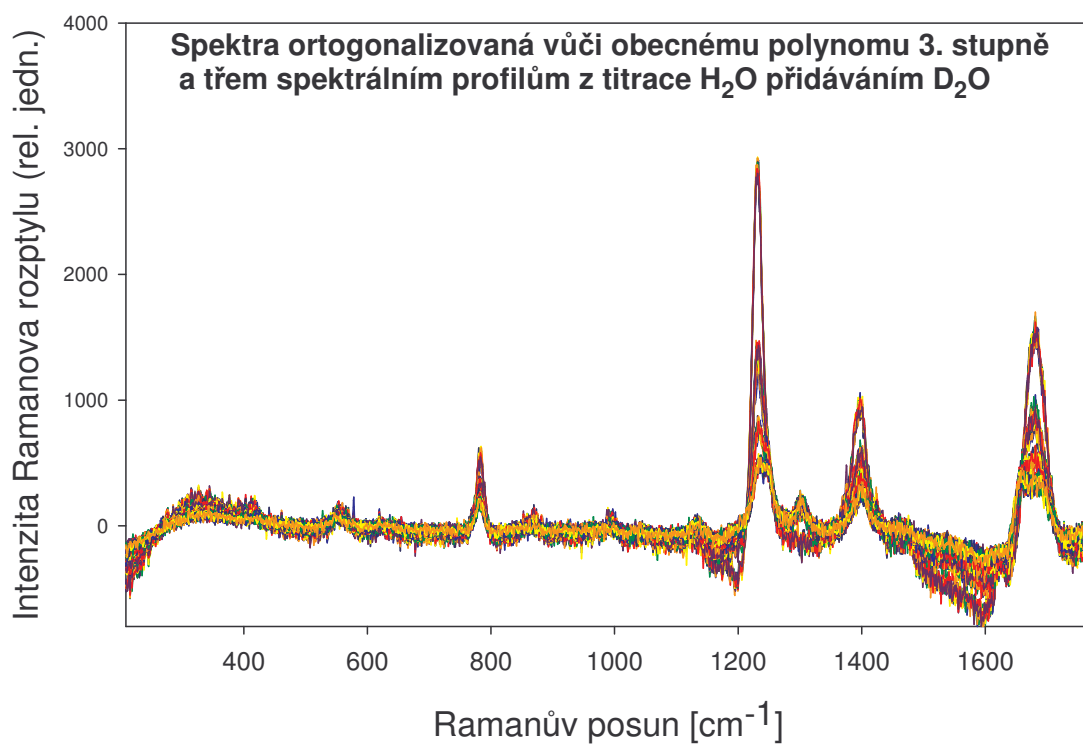
Spektrální oblasti, v nichž titrační měření probíhala, spolu s časovými charakteristikami nabírání spekter, počtem opakování titrací, objemů míchaných vzorků, a dalších podmínek, za nichž experiment probíhal, shrnuje velmi přehledně tabulka 10.

Spektra naměřená v nízkofrekvenční spektrální oblasti centrované na 1015 cm^{-1} jsou uvedena na obrázku 59 nahoře. Je zřejmé, že díky mnohem vyšší koncentraci než v případě cytosinu nebo uracilu jsou pásy uridinu dominantní a zcela překrývají pásy vody. Také úroveň pozadí je relativně nižší. Proto byly pro korekci pozadí použity pouze funkce obecného polynomu 3. stupně a dále spektrální profily H_2O , HDO a D_2O určené z referenčních měření popsanych v předchozí části práce. Následně byla aplikována faktorová analýza (SVD), nejprve na všechna spektra. Opět se objevily typické průběhy koeficientů ukazující na jediné časové změny kromě stabilních úrovní mezi přidavky D_2O , a to zvýšení šumové úrovně při přidávání. Následně byla tato spektra vyloučena a SVD analýza zopakována. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 61.

Z výsledků SVD analýzy vyplývá, že série spekter obsahuje pouze dvě významné složky, což potvrzuje naše očekávání, že v této spektrální oblasti bude záležet především na tom, zda je protonovaná nebo deuterovaná iminoskupina na uracilové části molekuly. Třetí, statisticky nevýznamná komponenta v sobě obsahuje zčásti šum a zčásti jiný typ závislosti na přidávání D_2O , který patrně vyjadřuje vliv deuterace OH skupin ribózy na Ramanova spektra. S ohledem na velikost příslušného singulárního čísla v porovnání se šumovou úrovní je však tento spektrální příspěvek zcela zřejmě zanedbatelný.

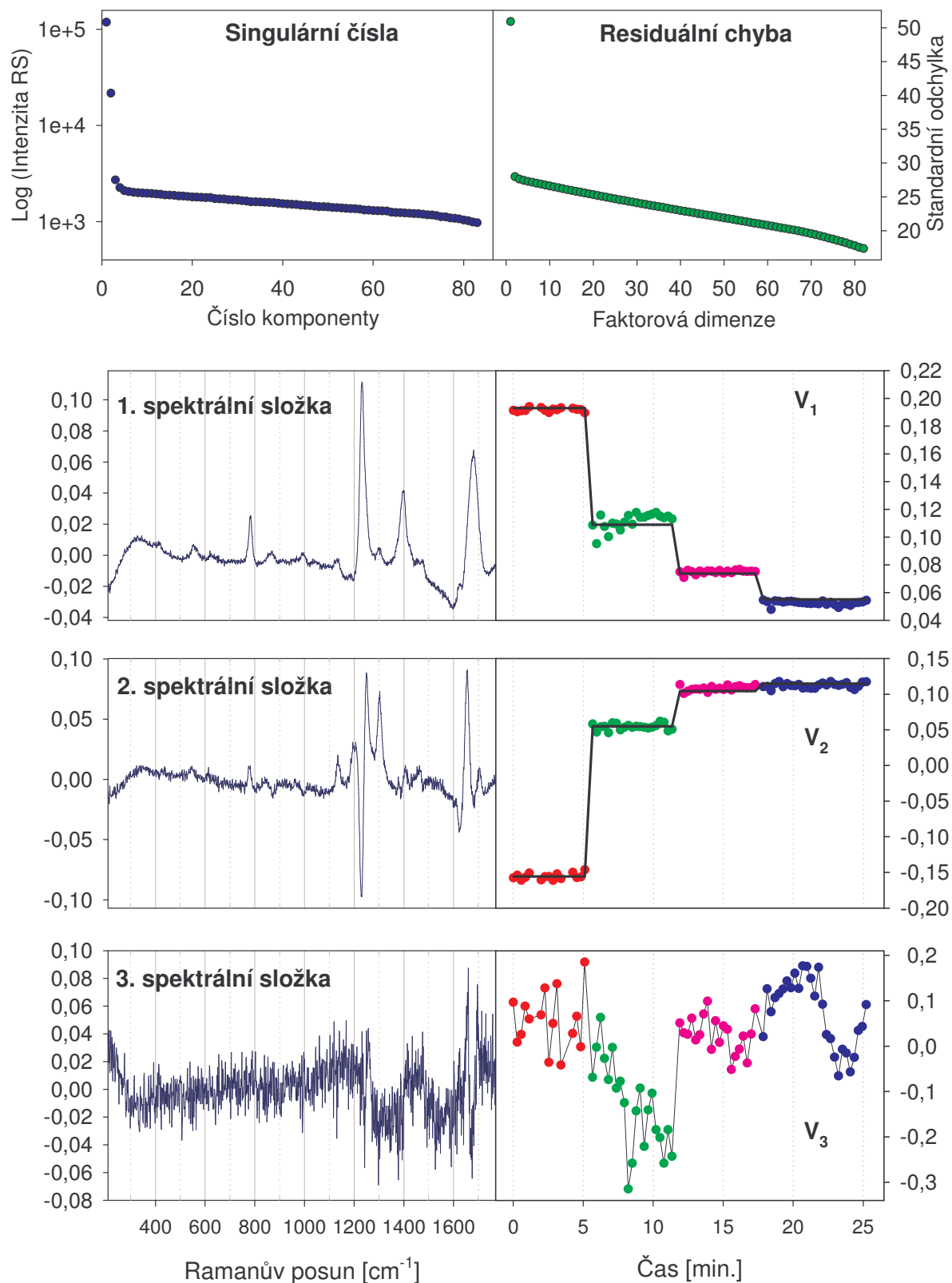


Obr. 58: Spektra Ramanova rozptylu z první spektrální oblasti 200 – 1800 cm^{-1} , při postupném přidávání D_2O (přidávaná množství jsou v tabulce 10) do 1 ml 500 mM roztoku uridinu v H_2O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.



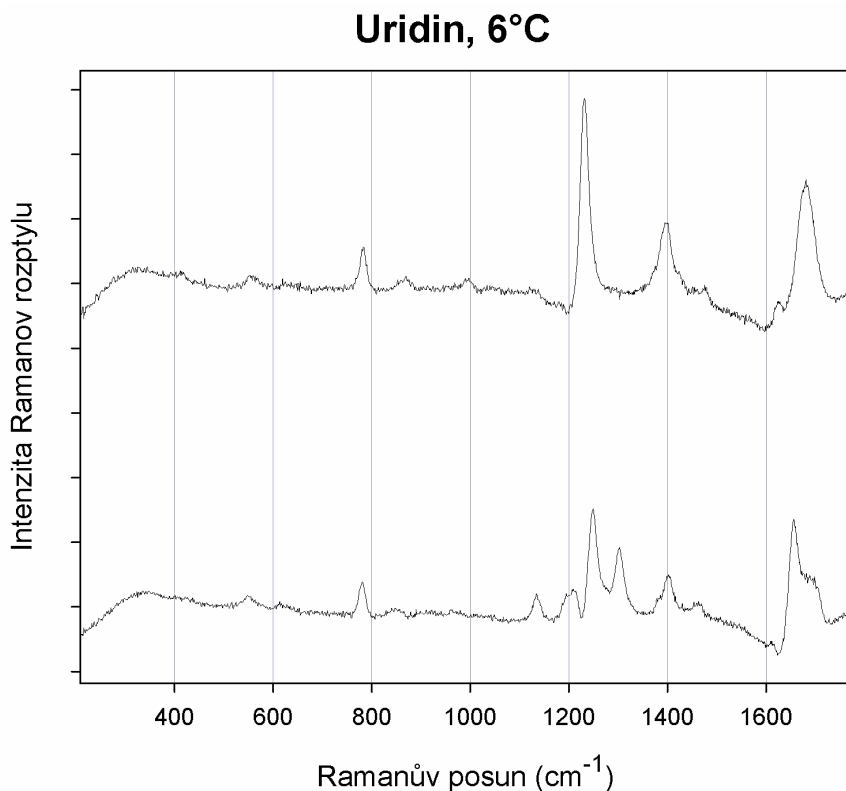
Obr. 59: Spektra z obrázku 58 dole, po eliminaci podílu Ramanova signálu rozpouštědla pomocí ortogonalizace vůči třem komponentám získaným z referenčního měření s přidáváním D₂O do H₂O.

Výsledky SVD



Obr. 60: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter při přidávání D_2O do 1 ml 500 mM roztoku uridinu, zobrazených na obrázku 59. Černé křivky v grafech průběhů koeficientů V_1 a V_2 jsou výsledky fitu při uvažovaných sumárních koncentracích molekul s protonovanou a deuterovanou iminoskupinou.

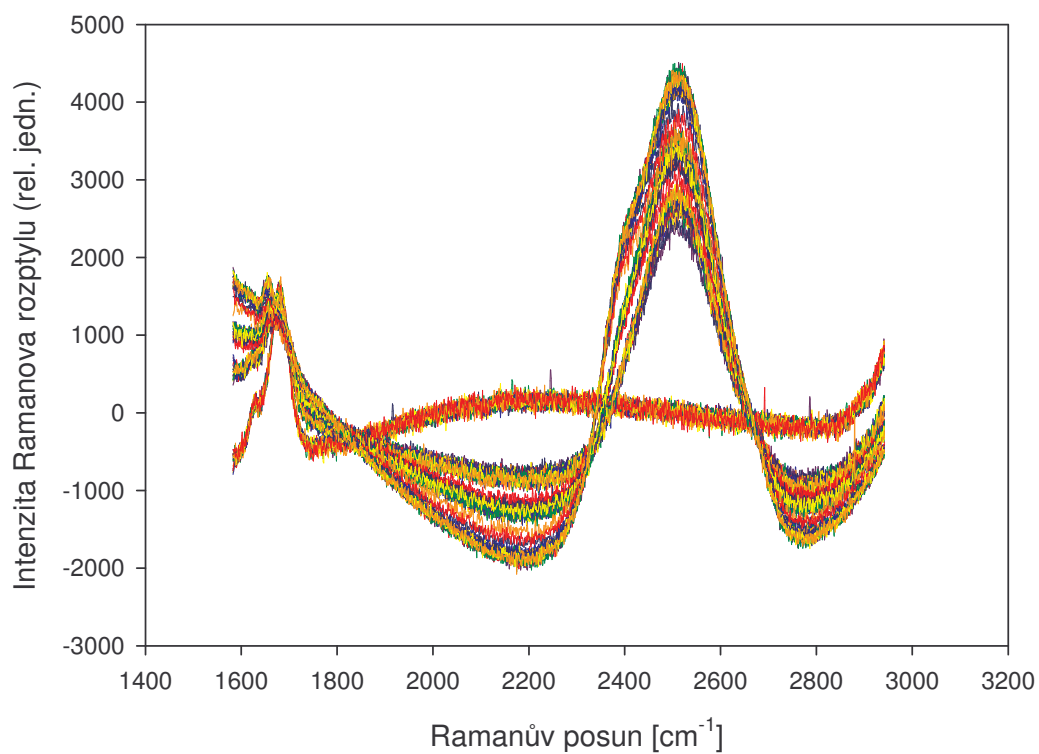
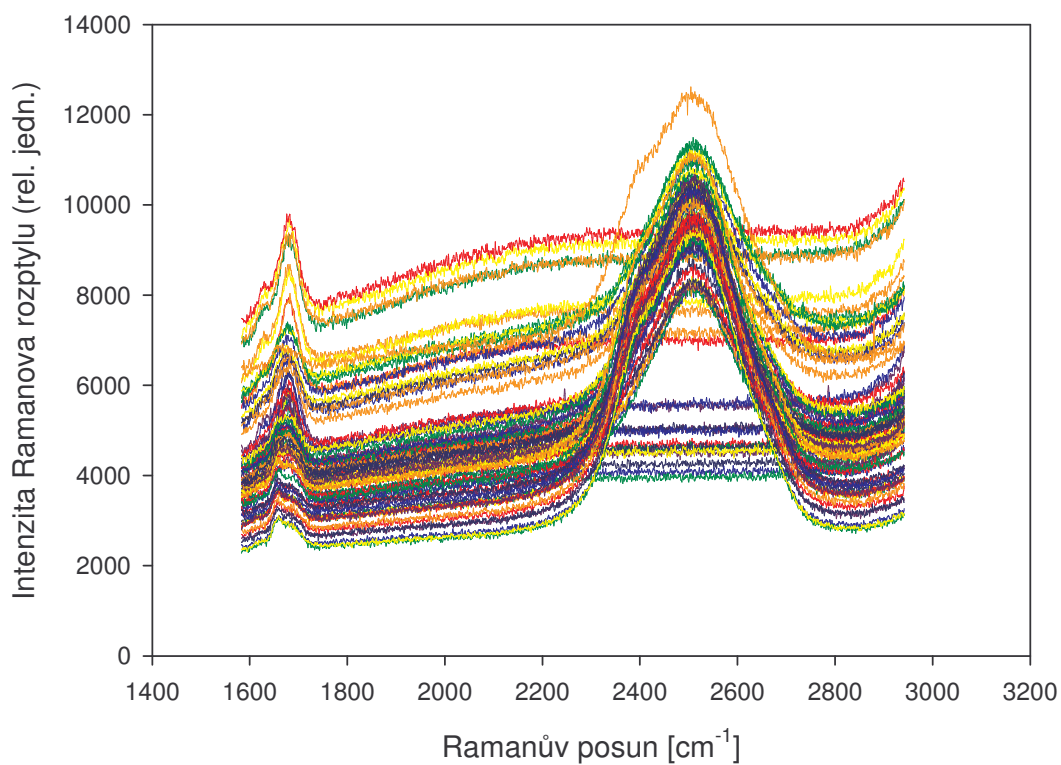
Znalost koncentrací obou forem molekul (tabulka 9) v jednotlivých fázích titračního experimentu nám dovoluje extrahovat Ramanova spektra těchto komponent postupem uvedeným v kapitole 2.5.3. Nafitované průběhy jsou rovněž zakreslené na obrázku 60. Jak je vidět, velmi dobře souhlasí s experimentálně zjištěnými průběhy. Na základě transformačních koeficientů určených z těchto fitů byla určena spektra obou forem – viz obrázek 61.



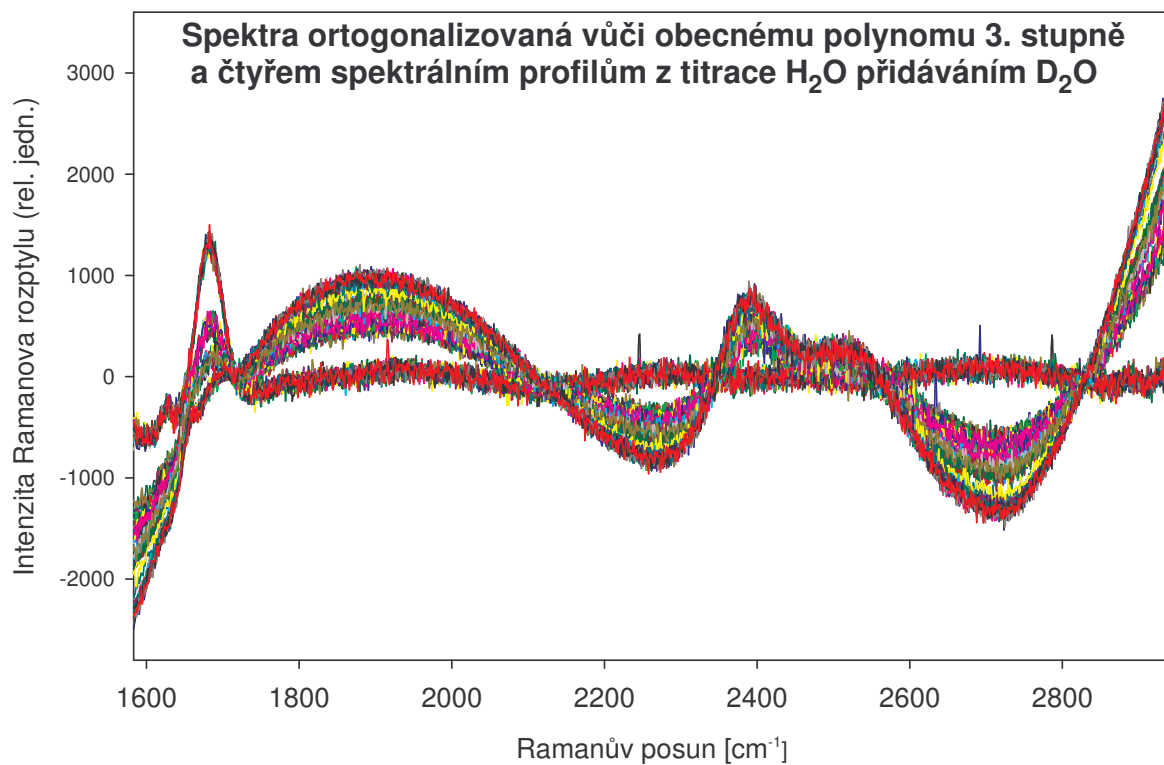
Obr. 61: Spektra uridinu extrahovaná z experimentu při přidávání D_2O do 500 mM roztoku uridinu v H_2O podle tabulky 9. Spektra jsou určena pro jednotkovou 1 mM koncentraci. Nahoře je spektrum uridinu s protonovanou iminoskupinou a dole spektrum s deuterovanou iminoskupinou.

Obdobně se prováděla měření v oblasti centrované na 2290 cm^{-1} . Naměřená spektra, korigovaná ortogonalizačním postupem na vliv pozadí a rozpouštědla, jsou na obrázcích 62 a 63. S ohledem na vysokou intenzitu Ramanova spektra rozpouštědla (HDO a D_2O) v této spektrální oblasti, není překvapivé, že spektra jsou po ortogonalizaci poměrně zašuměná a zdeformovaná. Výsledky SVD analýzy (již s odstraněním spekter se zvýšeným šumem naměřených při přidávání D_2O) jsou na obrázku 64.

V tomto případě je faktorová dimenze rovna třem. Průběhy především první a třetí komponenty ukazují, že v této oblasti jsou významné zejména valenční vibrace O-D na deuterovaných pozicích na ribóze. To znamená, že v této spektrální oblasti nemůžeme fitovat pouze podle stavu deuterace iminoskupiny uracilu, ale je nutné uvažovat všechny deuterované formy uridinu. V tom případě nám ale bohužel naměřená spektra nedávají dostatek spektrální informace, aby bylo možno fitem rozlišit jednotlivé typy deuterovaných forem (tím je míněno rozlišit plně protonovanou, sumárně 1x deuterované, sumárně 2x deuterované, sumárně 3x deuterované a plně deuterovanou formu na pozicích lehko vyměnitelných vodíků), protože máme jen tři různé spektrální komponenty pro pět různých očekávaných spekter. Pro rozšíření spektrální informace bude zřejmě nutné zvětšit rozsah titrací a kromě titrace roztoku v H_2O přidáváním D_2O provádět i opačnou titraci, tedy přidávání H_2O do roztoku v D_2O .

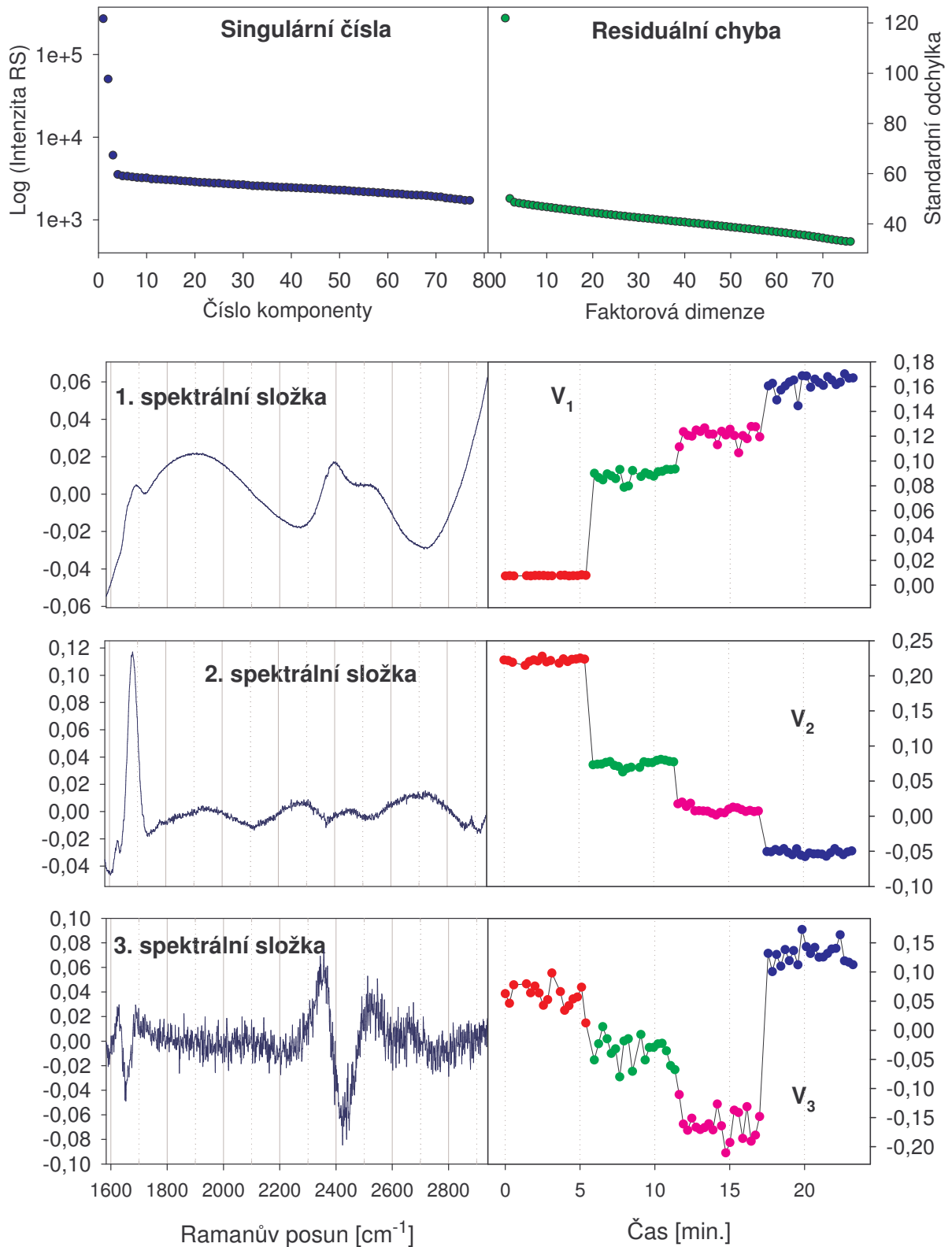


Obr. 62: Spektra Ramanova rozptylu ve spektrální oblasti valenčních vibrací deuteria při postupném přidávání D₂O (přidávaná množství jsou v tabulce 10) do 1 ml 500 mM roztoku uridinu v H₂O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně.



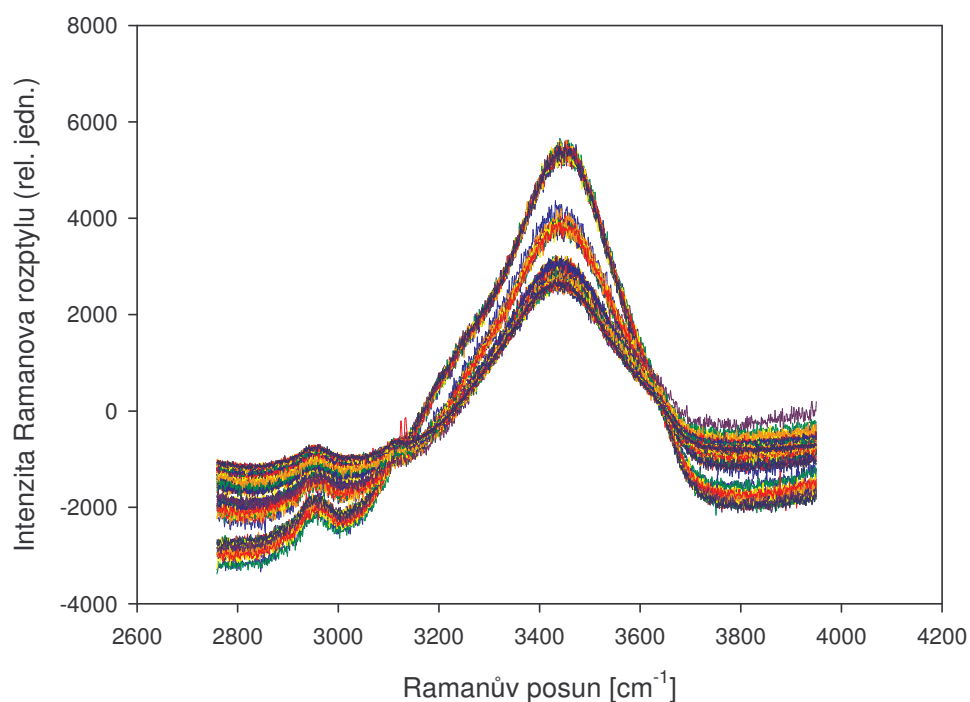
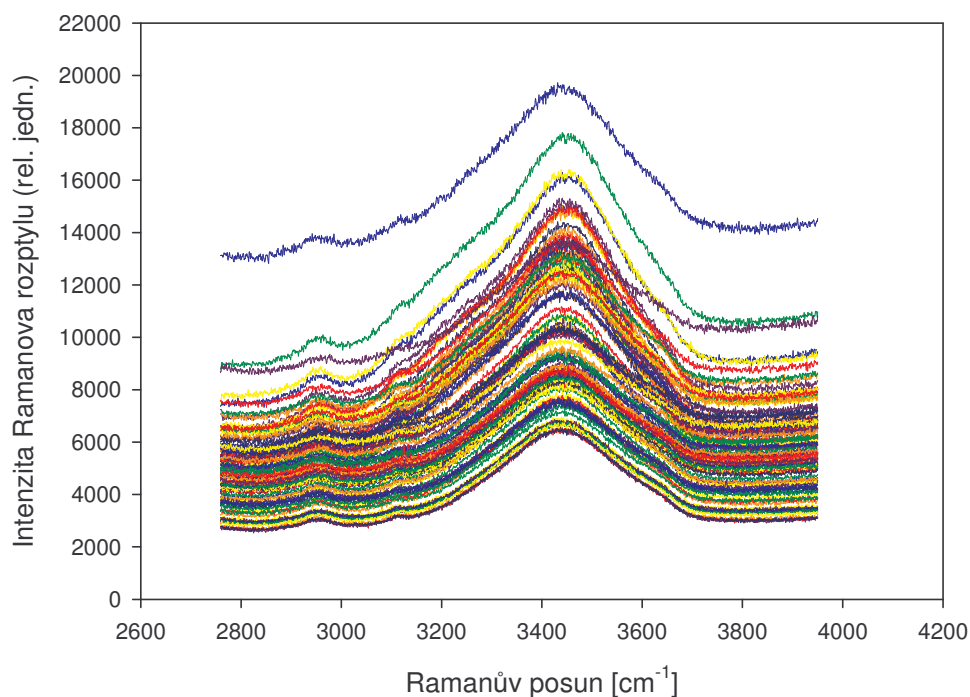
Obr. 63: Spektra z obr. 62 dole, po eliminaci podílu Ramanova signálu rozpuštědla pomocí ortogonalizace vůči čtyřem komponentám získaným z referenčního měření s přidáváním D₂O do H₂O.

Výsledky SVD



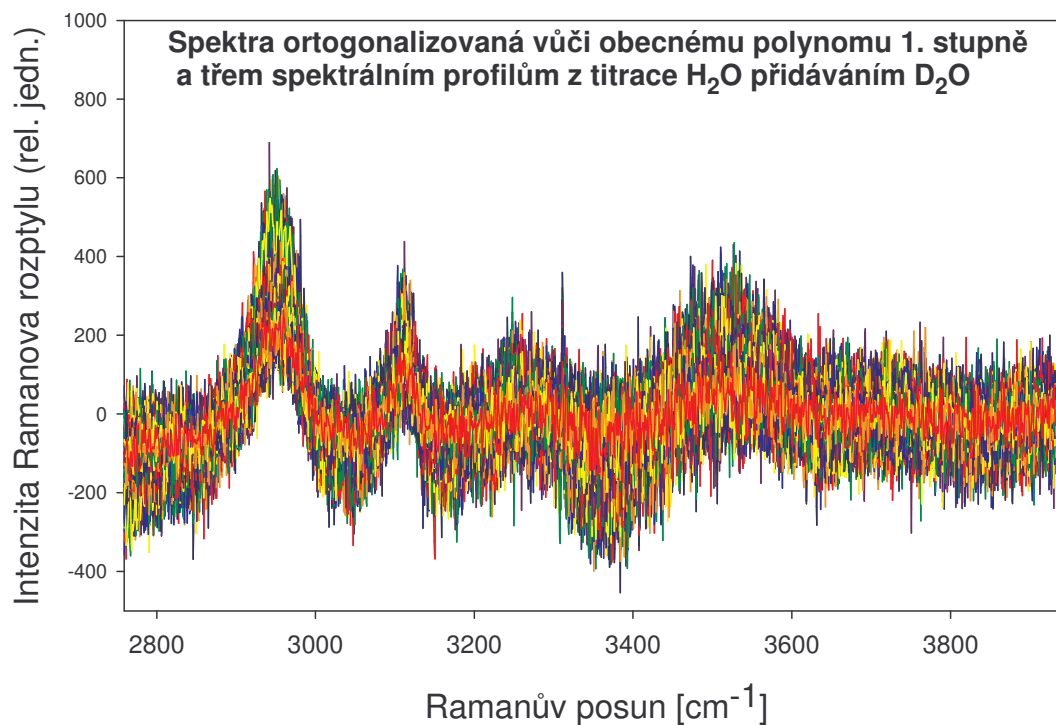
Obr. 64: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter ve spektrální oblasti valenčních vibrací deuteria při přidávání D_2O do 1 ml 500 mM roztoku uridinu, zobrazených na obrázku 63.

Třetí měření bylo prováděno v oblasti centrované na 3380 cm^{-1} , kde jsou dominantní valenční vibrace O-H. Naměřená spektra jsou na obrázku 65 nahoře, dole pak spektra, která v tomto případě byla s ohledem na nízkou úroveň pozadí ortogonálně ortogonalizována pouze vůči polynomu 1. stupně.



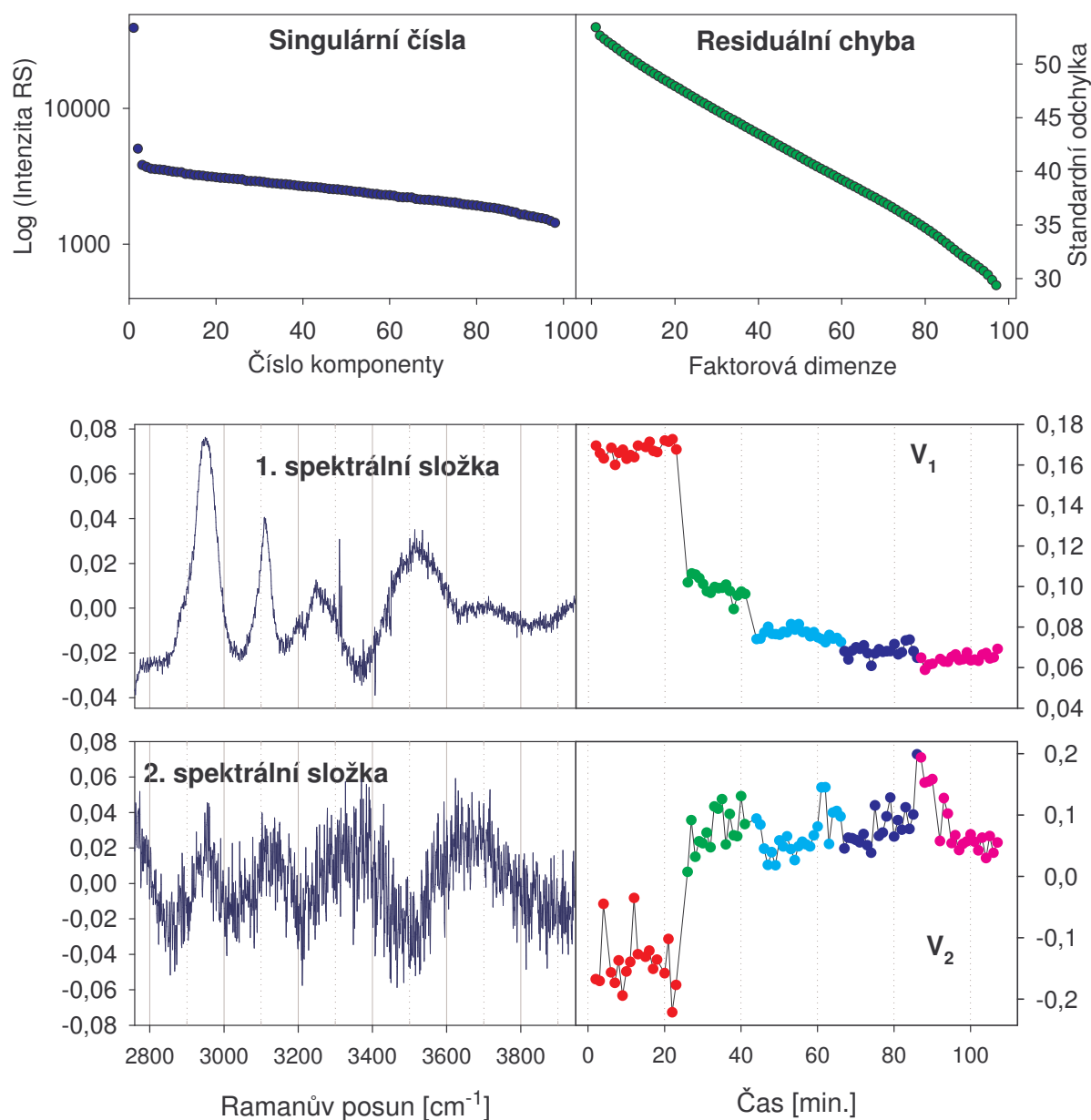
Obr. 65: Spektra Ramanova rozptylu ve spektrální oblasti valenčních vibrací protonů při postupném přidávání D₂O (přidávaná množství jsou v tabulce 9) do 1 ml 500 mM roztoku uridinu v H₂O (pH 6,8). Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 1. stupně.

Obrázek 66 pak ukazuje tato spektra dále ortogonalizovaná vůči třem spektrálním průběhům pro rozpouštědlo. Výsledky SVD analýzy (již s odstraněním spekter se zvýšeným šumem naměřených při přidávání D₂O) jsou na obrázku 67



Obr. 66: Spektra z obr. 65 dole, po eliminaci signálu rozpouštědla pomocí ortogonalizace vůči třem komponentám získaným z referenčního měření s přidáváním D₂O do H₂O.

Výsledky SVD



Obr. 67: Výsledky faktorové analýzy série Ramanových spekter ve spektrální oblasti valenčních vibrací lehkého vodíku při přidávání D₂O do 1 ml 500 mM roztoku uridinu, zobrazených na obrázku 66.

Faktorová dimenze poněkud překvapivě obsahuje pouze jednu významnou spektrální složku. Další složka je již statisticky málo významná s ohledem na velký podíl šumu jak v subspektru, tak v časovém průběhu hodnot koeficientu V₂. První subspektrum zřejmě odpovídá spektru uridinu v plně protonovaném stavu. Příslušný koeficient však nejvíce odpovídá poklesu obsazení jedné pozice snadno vyměnitelného vodíku protonem a určitě ne ubývání plně protonované formy, které je podstatně výraznější (viz tabulka 9). Podle všeho výsledky SVD ukazují, že Ramanovy pásy protonových valenčních vibrací jsou jen velmi málo citlivé na deuteraci v jiných polohách snadno vyměnitelných vodíků.

Měření při 60 °C

Kromě měření proton-deuteronové výměny při 6°C, byla prováděna též měření při teplotě 60°C zaměřená na zjištění možností detekce výměny na pozicích těžko vyměnitelných vodíků. Tato měření se realizovala tak, že výsledné vzorky po přidávání D₂O za teploty 6°C byly po ukončení měření umístěny v chladničce, kvůli maximálnímu zpomalení dějů. Vzorky, vychlazené zhruba na teplotu 8°C, byly pak ještě týž den postupně umísťovány do karuselu držného na teplotě 60°C a ihned měřeny, každý ze vzorků byl použit pro měření v jiné spektrální oblasti. První spektrum se tedy nabíralo vždy v průběhu ohřívání vzorku na teplotu 60°C, během nabírání druhého spektra se již teploty vyrovnaly. Doba nabírání jednoho spektra byla přibližně 7 minut a měření se uskutečnila v průběhu asi jedné hodiny po dosažení stabilní teploty vzorku. Po změření byly vzorky ponechány v karuselu temperovaném na 60°C přes noc a po 20 hodinách opětovně přeměřeny při této teplotě. Parametry tohoto experimentu přehledně shrnuje tabulka 11.

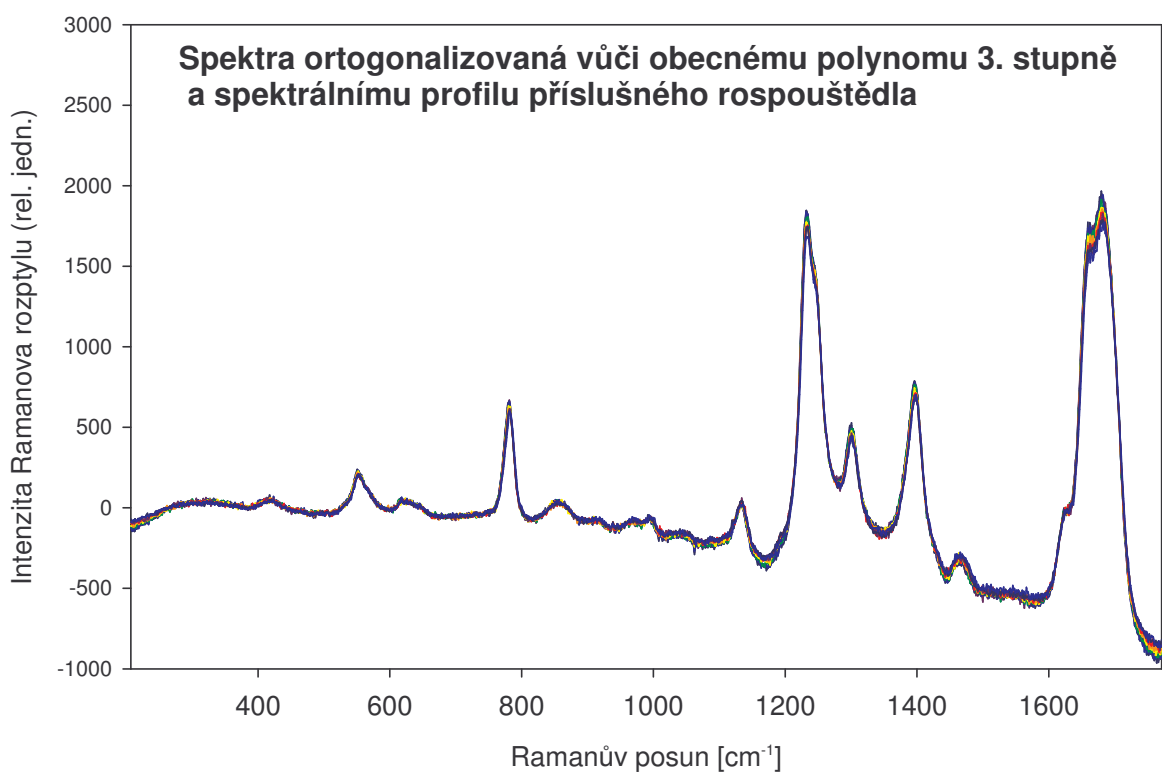
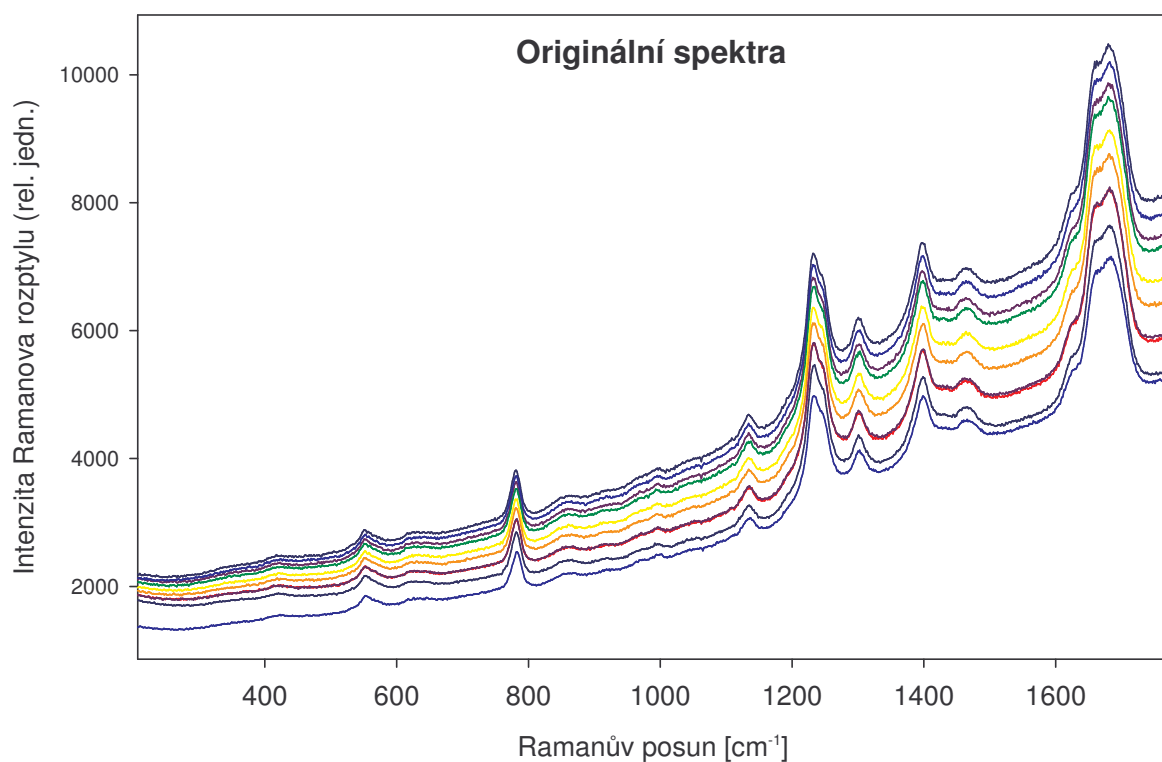
Tab. 11: Časový průběh měření deuterace uridinu, měřený při 60°C

Střed sp. oblasti	Doba integrace	Četnost integrací	Čas na 1 sp.	Počet spekter
1015 cm ⁻¹	10 s	30 x	416 s	10
2290 cm ⁻¹	10 s	30 x	416 s	9
3380 cm ⁻¹	10 s	30 x	416 s	10

Tato měření v případě cytosinu a uracilu nepřinesla uspokojivé výsledky kvůli špatnému poměru signál/šum, kvůli kterému se v časovém průběhu spíše daly identifikovat spektrální charakteristiky odpovídající kolísání signálu rozpouštědla. V případě vzorků, kde byla pouze směs H₂O a D₂O nebyla zaznamenána žádná charakteristická časová změna a bylo získáno referenční spektrum rozpouštědla pro korekci pozadí spekter uridinu.

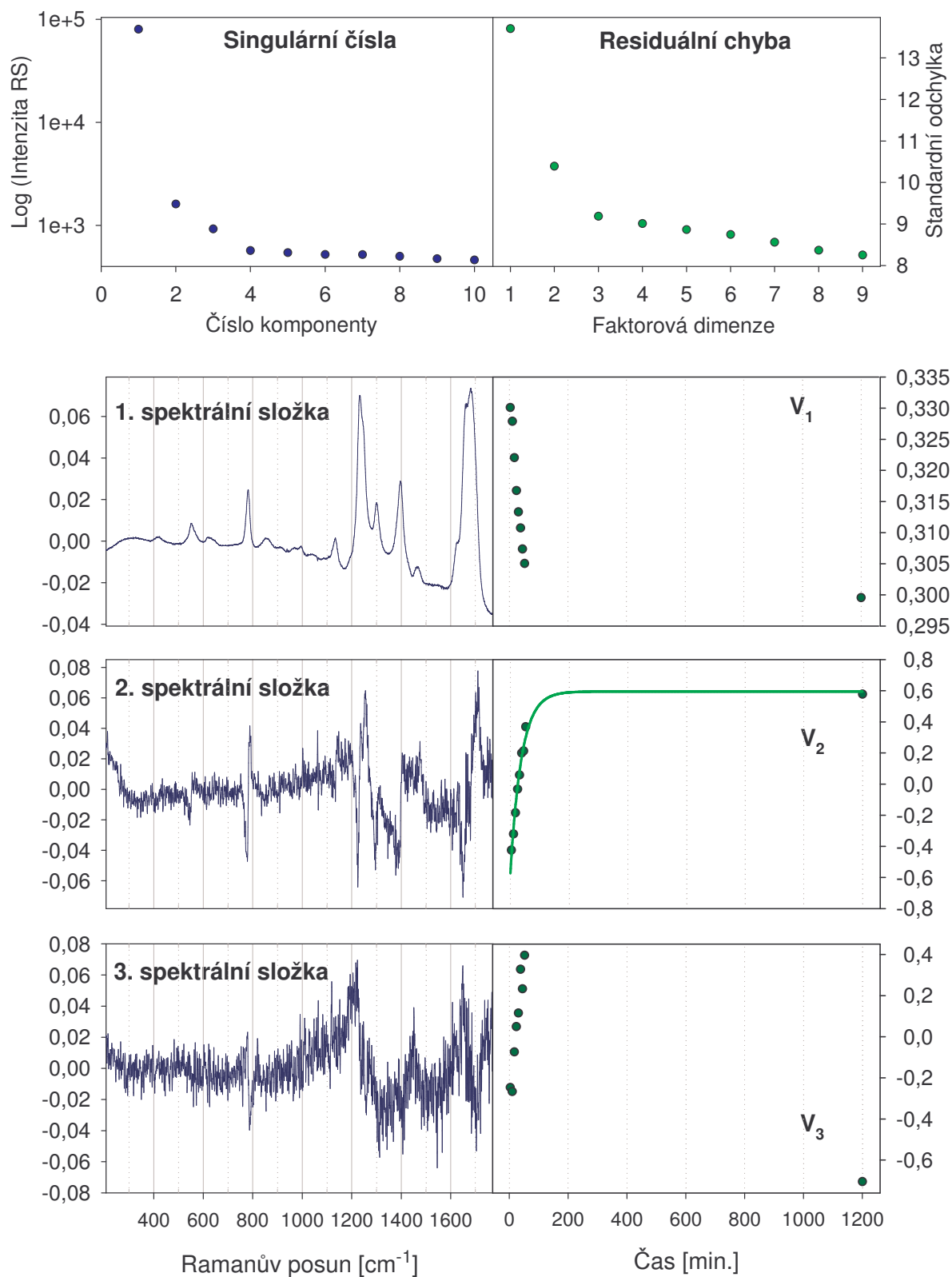
Měření na uridinu byla provedena ve všech třech spektrálních pásmech, ale pouze v oblasti vibrací o nižších frekvencí se podařilo zjistit jasnou časovou závislost. Příslušná spektra jsou na obrázku 68. Výsledky faktorové analýzy těchto spekter jsou na obrázku 69. Z výsledků je zřejmé, že faktorová dimenze je rovna třem. Zatímco však druhá komponenta odpovídá sumárním změnám spektra vyvolaným záměnou lehkých vodíků deuteriem v pozicích těžko vyměnitelných vodíků (lze předpokládat, že spektrálně významné jsou především výměny aromatických vodíků uracilu), třetí komponenta v sobě směšuje jemnější spektrální rozdíly vyvolané různou rychlostí výměny s kolísáním signálu rozpouštědla (podíl pásů H₂O, HDO a D₂O) i poměrně vysokou hladinou šumu. Není tedy možné ji využít pro detailnější analýzu spektrálních změn, ale ukazuje, že při zlepšení poměru signál/šum a korekce vlivu rozpouštědla bude možné tyto analýzy provádět.

Časová rychlost výměny byla určena exponenciálním fitem časového průběhu koeficientu V_2 zakresleným v obrázku 69. Tento fit poskytl jako střední časovou konstantu pro spektroskopicky sledovanou výměnu na těžko vyměnitelných pozicích za teploty 60°C hodnotu 38 minut.



Obr. 68: Spektra Ramanova rozptylu při časovém vývoji spekter 230 mM roztoku uridinu ve směsi H₂O a D₂O (pH 6,8, 0,5 M NaCl, poměr H/D 5:6) měřená za teploty 60°C. Nahoře jsou uvedena originálně naměřená spektra, dole spektra po eliminaci vlivu pozadí a podílu Ramanova signálu rozpouštědla pomocí ortogonalizace vůči obecnému polynomu 3. stupně a profilu rozpouštědla (viz obr. 54).

Výsledky SVD



Obr.69: Výsledky faktorové analýzy série spekter časového vývoje Ramanova rozptylu 230 mM roztoku uridinu ve směsi H_2O a D_2O za teploty 60°C z obrázku 68 dole.

6. Závěr

V rámci diplomové práce byla ověřena funkce Ramanova spektrometru T64000 (ISA Jobin-Yvon) a spektrometr se podařilo upravit pro uživatelsky pohodlná přesná měření Ramanových spekter v běžných podmínkách laboratoře.

Byl zkonstruován a realizován teplotně stabilizovaný držák čtyř kyvet v karuselu umožňujícím jejich jednoduché přesouvání do měřícího místa. Testovací měření ukázala, že teplota roztoku uvnitř kyvety se neliší od teplotou kontrolované teploty pevné části držáku o více než $0,1^{\circ}\text{C}$. Dále byla změřena časová konstanta pro vyrovnání teplot mezi pevnou částí držáku a roztokem uvnitř kyvety. Její hodnota $\tau = 58 \pm 2$ s ukazuje na výborné tepelné vlastnosti, kdy hlavní prodleva při skokové změně teploty v kyvetě je dána především časovou prodlevou při změně teploty lázně termostatu.

Byla provedena řada pilotních experimentů při kterých se proměřila Ramanova spektra vybraných složek nukleových kyselin, cytosinu, uracilu a uridinu, při probíhající proton-deuteronové výměně. Na základě statistické analýzy (Singular Value Decomposition) byly zjištěny klíčové údaje pro určení metodických možností získávání Ramanových spekter různě deuterovaných složek nukleových kyselin. Získané výsledky vedou k následujícím závěrům:

1. Časové změny výměny na pozicích lehce vyměnitelných vodíků probíhají i za teplot blízkých 0°C tak rychle, že je nelze postihnout v časovém sledu Ramanových spekter snímaných po několika desítkách sekund. Hlavním problémem je skutečnost, že po přidání D_2O pipetou do roztoku se vzorek stává silně nehomogenním a tento přechodový stav vede k deformaci Ramanova spektra, která překrývá možný efekt postupné výměny. Po obnovení homogenního stavu roztoku je již i obsazení snadno vyměnitelných vodíkových poloh v ustáleném stavu. Z tohoto důvodu nelze předpokládat, že by nové možnosti mohlo přinést samotné zlepšení citlivosti měření (například užití rezonanční excitace). Je však možné, že by se mohly ukázat určité možnosti pro rozlišení různých rychlostí výměny některých snadno vyměnitelných vodíků při použití mikrofluidního směšovacího systému.

2. Bylo ukázáno, že titrační měření měnící poměr H/D v roztoku mohou za nízkých teplot (6°C) poskytnout v oblasti vlnočtů pod 1800 cm^{-1} oddělená Ramanova spektra forem měřených molekul s různým stupněm deuterace na pozicích snadno vyměnitelných vodíků, tedy spektrum forem s jednou deuterovanou pozicí, dvěma deuterovanými pozicemi, ... , a tak dále až do úplné deuterace všech poloh snadno vyměnitelných vodíků. Dobré rozlišení těchto spekter bude však vyžadovat podrobnější titrační měření. Vzhledem k tomu, že při přidávání D_2O do již připraveného roztoku dochází ke snižování koncentrace měřených molekul, bude vhodnější titrační měření provádět na samostatně připravených roztocích s různým poměrem H/D, aby se využila maximální rozpustnost měřených molekul. To platí zejména v případě omezeně rozpustných bází nukleových kyselin. Na druhé straně je třeba zdůraznit, že samotná titrační měření nemohou rozlišit formy se stejným stupněm deuterace, ale v případě více než jedné pozice snadno vyměnitelného vodíku poskytnou sumární spektrum všech forem se stejným stupněm, ale jinou lokalizací deuterace. Tato spektra jsou sice unikátní, ale jejich využitelnost je spíše jen pro případnou konfrontaci s teoretickými výpočty vibračních spekter.

3. Možnosti získávání spekter v oblasti valenčních vibrací lehkého vodíku a deuteria jsou zřejmě omezené. Především je možné na základě prováděných měření říci, že v těchto oblastech má cenu provádět měření jen v případě molekul s dostatečnou rozpustností, aby bylo možné pracovat s koncentracemi v řádu několika desetin M. Dalším problémem analýzy

získaných výsledků je zjištěná skutečnost, že Ramanova spektra jednotlivých valenčních vodíkových vibrací jsou jen velmi málo citlivá na deuterace probíhající na jiných polohách vodíků. Tím se stává problematickým spektrální rozlišení částečně deuterovaných forem.

4. Dále bylo zjištěno, že za vyšších teplot (60°C) lze pozorovat časový vývoj spekter způsobený postupnou deuterací na místech těžko vyměnitelných vodíků. Naše experimenty naznačují, že bude možné i rozlišit některé pozice na základě různých rychlostí výměny. Vzhledem k možným kombinacím deuterace na snadno a těžko vyměnitelných pozicích bude však vyžadovat tento typ experimentů provedení série časově závislých měření za použití různého H/D složení rozpouštědla. Výsledky našich měření však na druhé straně ukázaly, že tyto typy experimentů bude možné s úspěchem realizovat jen v případě molekul s vyšší rozpustností (pokud nebudou využity například možnosti rezonanční excitace).

Použitá literatura

- [1] V. Prosser. a kol.: Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha 1989, ISBN 80-200-0059-3.
- [2] V. Baumruk: Rozptylové metody v optické spektroskopii, učební texty na <http://alma.karlov.mff.cuni.cz/ooe012/>, MFF UK, Praha 2007
- [3] Jan Palacký: Diplomová práce, Spektroskopické studium vlastností nových modifikovaných oligonukleotidů - potenciálních chemoterapeutik, MFF UK, Praha 2005.
- [4] Fišer J: Úvod do molekulové symetrie, SNTL, Praha 1980.
- [5] J. Štěpánek: Investigation of nucleic acids and their interactions by Raman spectra and their factor analysis, podklady k sérii přednášek na University Paris VI., 2005
- [6] J. M. Benevides, S. A. Overman, G. J. Thomas, Jr, Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes, Journal of Raman Spectroscopy 2005
- [7] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Voda>
- [8] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Cytosin>
- [9] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Uracil>
- [10] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Uridin>
- [11] E. R. Malinowski: Factor Analysis in Chemistry, J. Wiley & Sons, New York, 2002 (3. vydání), ISBN 0-471-13479-1
- [12] Štěpánek J., Vincent M., Turpin P.-Y., Paulin D., Femandjian S., Alpert B., Zentz C.: C→G base mutations in the CArG box of *c-fos* serum response element alter its bending flexibility, *FEBS Journal* 274 (2007), 2333–2348
- [13] Aamouche Ahmed, Ghomi Mahmoud, Grajcar L., Baron M. H., Romain F., Baumruk Vladimír, Štěpánek Josef, Coulombeau C., Jobic H., Berthier G.: Neutron inelastic scattering, optical spectroscopies and scaled quantum mechanical force fields for analyzing the vibrational dynamics of pyrimidine nucleic acid bases: 3. Cytosine. *J. Phys. Chem. A* **101** (1997) 10063-10074.
- [14] Lane M. J., Thomas G.J. Jr.: Kinetics of hydrogen-deuterium exchange in guanosine 5'-monophosphate and guanosine 3':5'-monophosphate determined by laser-Raman spectroscopy. *Biochemistry* 18, (1979), 3839-3846.
- [15] T. Li, J.E. Johnson and G.J. Thomas Jr.: Raman dynamic probe of hydrogen exchange in bean pod mottle virus: base-specific retardation of exchange in packaged ssRNA. *Biophysical Journal* 65 (1993), 963-1972.
- [16] R. Tuma and G.J. Thomas Jr.: Theory, design, and characterization of a microdialysis flow cell for Raman spectroscopy. *Biophysical Journal* **71** (1996), 3454-3466.

- [17] A. Aamouche, M. Ghomi, C. Coulombeau, H. Jobic, L. Grajcar, M. H. Baron, V. Baumruk, P. Y. Turpin, C. Henriët, and G. Berthier: Neutron Inelastic Scattering, Optical Spectroscopies and Scaled Quantum Mechanical Force Fields for Analyzing the Vibrational Dynamics of Pyrimidine Nucleic Acid Bases. 1. Uracil. *J. Phys. Chem.* **13** (1996), 5224–5234.
- [18] M. Rozenberg, G. Shohama, I. Revab and R. Faustob: Low temperature FTIR spectroscopy and hydrogen bonding in cytosine polycrystals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **60** (2004), 463-470.
- [19] Properties of Nucleic Acid Derivatives. Tabulky firmy Calbiochem, document No. 4955, San Diego 1964
- [20] Saenger W.: Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York 1984
- [21] B. Alberts et al. ,Molecular biology of the cell, Garland Science, New York 2002