

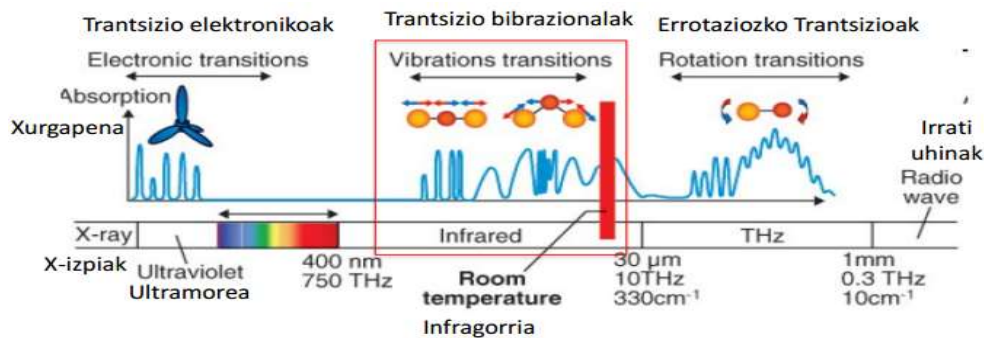
# 6. gaia

## Espektroskopia bibrazionala

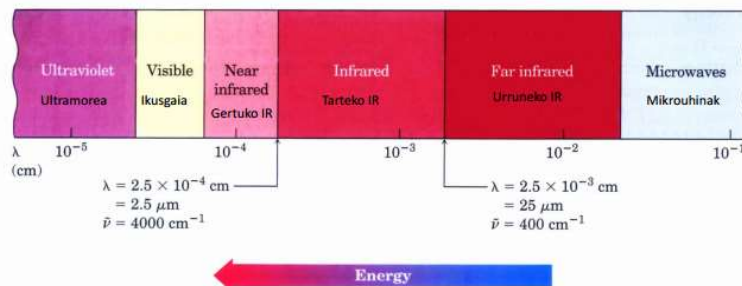
### 1. Sarrera

Gai honetan infragorria eta trantsizio bibrazionalak ikusiko ditugu.

Dakigun bezala, trantsizio elektronikoetarako energia gehiago behar da bibrazionaletarako baino. Hau horrela izanik, trantsizio bibrazional hauek izpi infragorrien ondorioz emango dira.



Beraz, espektroskopia bibrazionala burutzeko, argi infragorria erabiliko dugu. Eskualde infragorria espektro ikusgaiko gorriaren ondoren hasten da. Infragorria hiru eskualde txikiagotan banatzen da: gertuko infragorria, tarteko infragorria eta urruneko infragorria. Normalean tarteko infragorria erabiltzen da.



Uhin luzera geroz eta handiagoa da eskualde ultramoretik infragorrirantz goazen heinean, baina kasu honetan uhin luzeraren ordez uhin zenbakia ( $\tilde{\nu}$ ) erabiliko dugu, uhin luzeraren alderantzizkoa dena. Ondorioz, uhin luzeraren unitatea adibidez cm-a baldin bazen, uhin zenbakiaren unitatea  $\text{cm}^{-1}$  izango da.

Eskualde infragorriaren uhin luzera tartea  $2,5 \times 10^{-6}$  -  $1,7 \times 10^{-5}$  metrokoa da. Uhin zenbaki tartea aldiz,  $4000$ - $600 \text{ cm}^{-1}$ -koa. Tarteko infragorriaren uhin luzera tartea  $2,5 \mu\text{m}$ -tik  $25 \mu\text{m}$ -ra doana da. Uhin zenbakietan hitz eginez aldiz,  $4000$ - $400 \text{ cm}^{-1}$ -ko tartea da.

## Eskualde infragorria

Tarte ikusgaiko gorriaren muturretik mikrouhinetara doan eskualdea da, 780nm-tik  $10^6$ nm-tara alegia ( $12800\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ ). Aipatu dugun bezala hiru eskualde daude: gertuko infragorria, tarteko infragorria eta urruneko infragorria.

Eskualde erabiliarena, edo  $4000\text{ cm}^{-1}$ -tik  $650\text{ cm}^{-1}$ -ra doana da.

Hiru aukera ditugu energia ikusteko: fotoi energia bezala, uhin luzera bezala, edo uhin zenbaki bezala, baina guk normalean uhin zenbakia erabiliko dugu.

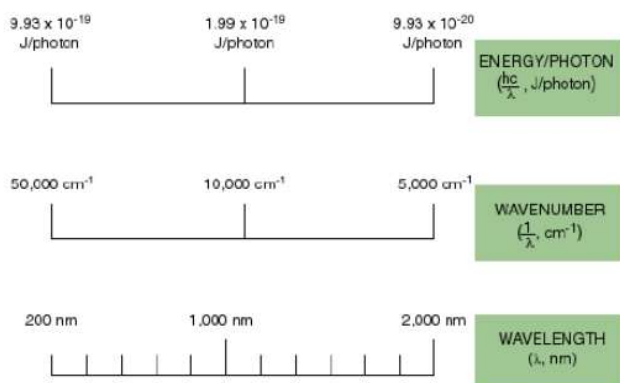


Table E1.3. IR spectral regions

Region	Wavelength range, $\mu\text{m}$	Wave number range, $\text{cm}^{-1}$	Frequency range, Hz
Near	0.78–2.5	12 800–4000	$3.8 \times 10^{14}$ – $1.2 \times 10^{12}$
Middle	2.5–50	4000–200	$1.2 \times 10^{14}$ – $6.0 \times 10^{12}$
Far	50–1000	200–10	$6.0 \times 10^{12}$ – $3.0 \times 10^{11}$
Most used	2.5–15	4000–670	$1.2 \times 10^{14}$ – $2.0 \times 10^{13}$

$(\lambda)$                        $(\nu = 1/\lambda)$                        $(\nu)$

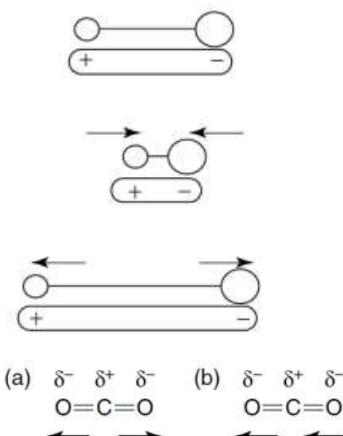
## 2. Oinarria

### IR seinalearen jatorria

- Trantsizioak maila bibrazionalean gertatzen dira.
- Trantsizio elektronikoarena baino energia gutxiagokoak dira trantsizio bibrazionalak, hau da, infragorriek ez dute energia nahikorik trantsizio elektroniko bat emateko.
- Uhin zenbaki tartearen, uhin luzeraren alderantzizkoa dena ( $\tilde{\nu}=1/\lambda$ ),  $200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ -ekoa da.
- Induzitutako dipolo trantsizioak intentsitatea zehazten du. Banden intentsitatea induzitutako dipoloaren menpekoa da. Honen seinalea baxua denez askotan, analisiak egiteko kontzentrazio altuak behar dira.
- Urak neurketak oztopatzen ditu, interesezko tartean bibratzen duelako.

### Infragorriaren xurgapena

- Molekularen momentu dipolarra aldatu behar da bibrazio edo errotazioaren eraginez. Aldaketa honek infragorriaren erradiazioaren eremu elektrikoarekin elkarrekintzak baimentzen ditu. Hau da, infragorria aktiboa izateko dipolo aldaketa eman behar da, bestela ez dugu trantsizio bibrazionalik izango. Gainera dipolo simetrikoren bibrazioak baldin badira, infragorrian ez dugu adierazpenik izango. Adibidez, karbono dioxidoaren kasuan bibrazioa simetrikoa denez, infragorrian ez da bandarik ikusiko. Dipoloaren aldaketa netoa 0 baldin bada ez da adierazpenikegongo.



- Erradiazioaren maiztasuna eta bibrazioarena berdinak izan behar dira. Bibratzen duten atomoen masa desberdina denean, bi atomoen arteko masa zentroa kalkulatu behar da.

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Masa erreduzitua

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Maiztasuna

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Uhin zenbakia

k: indarraren Kte.a (Nxm<sup>-1</sup>)  
c: argiaren abiadura hutsean  
(2.998x10<sup>8</sup>ms<sup>-1</sup>)  
μ: masa erreduzitua

### 3. Xurgapen infragorria eta bibrazio motak

#### Xurgapen infragorria

- Molekulak bolak izango balira bezala eta loturak malgukiak izango balira bezala kontsideratuko ditugu kalkuluak egiteko.
- 3n-6 bibrazio normal, n atomo kopurua izanik.
- Koordinatu kartesiarra (x,y,z) x n atomo kopurua= 3N (askatasun graduak)
  - o Askatasun gradu bibrazionalak= 3 (x,y,z)
  - o Askatasun gradu errotazionalak= 3 (angeluak, α,β,γ)
- 3n-6 askatasun gradu bibrazional.
- Xurgapen infragorri motak:
  - o Funtsezko bandak funtsezko bibrazioekin lotzen diren bandak dira. Makromolekula batean zaila izaten da hauek erlazionatzea, baita espektroetan ere. Normalean espektro bateko bandak lotura baten bandak adierazten ditu.
  - o Konbinazio tonuak (batura)
  - o Diferentzia tonuak (kenketa)
  - o Armonikoak edo sobretonuak (multiploa)

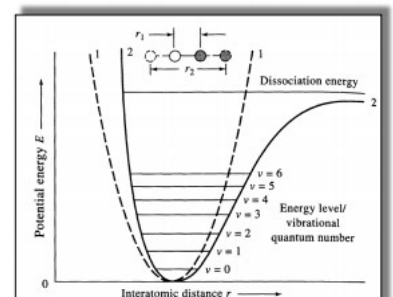
Mekanika kuantikoaren ikuspuntutik:

1. Molekula baten energia bibrazionala kuantifikatuta dago formula bat jarraituz.

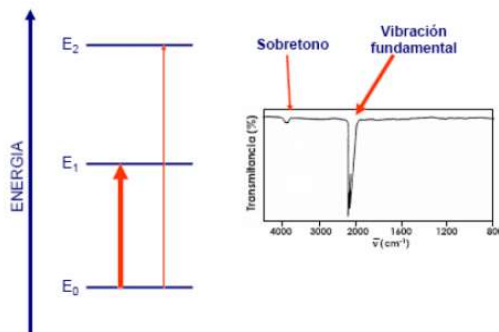
$$E = (v + \frac{1}{2})h\nu_m \quad \nu_m \rightarrow \text{bibratzeko maiztasuna}$$

V= 0,1,2,3,..... → zenbaki kuantikoa

2. Eman daitezkeen trantsizioak beti dira batekoak: ΔV=+-1.
3. Horregatik funtsezko bibrazio bakoitzeko xurgapen maiztasun bakarra dago (ΔE = hν<sub>m</sub>).
4. Molekulak normalean maila basalean egongo dira, eta kitzikapen batekin beste mailetara igoko dira. Normalean maila energetiko baxuetarako antzeko emaitzak lortzen dira.
5. Maila altuetan ΔE txikitu egiten da. ΔE =+-2,3 (sobretonuak)



Funtsezko bandetan, maila bibrazionaletan egongo dira, eta bibrazioarekin gertatuko den mugimendua  $E_0$ -tik  $E_1$ -era izango da kasu honetan. Piko handi bat lortzen da, baina baita piko txikia ere, sobretonua izango dena. Azken hau ez denez asko gertatzen, bandaren intentsitatea txikiagoa da. Espektroa egiterakoan beraz, trantsizio bakoitzarentzat banda bat lortuko dugu, eta hauen intentsitatea desberdina izango da gertatzen den trantsizioaren arabera.



### Xurgapen infragorria

Xurgapen infragorrian ematen diren trantsizioak hainbat ezaugarriren arabera ematen dira.

- Talde funtzionalen arabera, hau da, beraien arteko lotura kopuruaren arabera. Zenbat eta lotura gehiago, orduan eta energia gehiago beharko da trantsizio bibrazionala emateko. Ondorioz, lotura hirukoitzak dira energia gehien behar duten loturak.
- Loturan parte hartzen duten atomoek ere eragina dute. Atomo hauen masa zenbat eta desberdinagoa izan, orduan eta energia gehiago beharko da trantsizio bibrazionala eman ahal izateko. C-H-ren kasuan energia handiagoa behar da C-O-ren kasuan baino, masa desberdintasuna handiagoa delako.

#### a) Funtsezko bibrazioa

- Molekula linealak:  $3n-5$
- Molekula ez-linealak:  $3n-6$

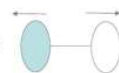
#### b) Makromolekula baten bibrazioak funtsezko bibraziotan banatu daitezke.

- Kontuan izan behar dira tarte bakoitzean gertatzen diren bibrazioak. Normalean multzoaren bibrazioan akoplamenduak ematen dira, hau da, bibrazioak solapatu egiten dira.

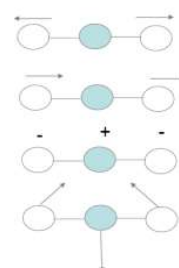
### Askatasun graduak

Molekula linealetan modu kopuruak  $3n-5$  dira ( $n$ = atomo kopurua), eta ez linealetan  $3n-6$  izango dira. Beraz, karbono dioxidoan 4 modu izango ditugu ( $3 \times 3 - 5$ ), eta hauek bibrazio motaren arabera banatuko ditugu. Hala ere kasu honetan guztiak ez dira aktiboak. 4 modu horietatik soilik 3 dira aktiboak infragorrian, 3 soilik ikusten dira espektroan.

1) HCl:  $3(2)-5 = 1$  modo



2) CO<sub>2</sub>:  $3(3)-5 = 4$  modos



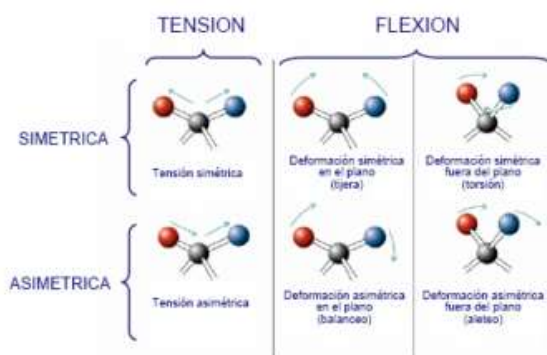
- Tentsio simetrikoan ez dago aldaketarik eta beraz ez dugu ikusten.
- Tentsio asimetrikoan dipoloaren aldaketa bat dago eta beraz aktiboa da.
- Makurdurazkoak aktiboak dira (bi daude).

Beraz, askotan modu batzuk ez dira aktiboak, dipoloaren arabera da. Azido klorhidrikoaren kasuan, modu bakarra izango luke ( $3 \times 2 - 5$ ), baina modu hau ez da aktiboa infragorrian. Normalean molekula diatomikoak ez dira aktiboak izaten.

## Bibrazioak

Funtsezkoak (lotura bakoitzeko):

- Tentsio bibrazioak: loturaren norabide berean ematen diren mugimenduak dira, hau da, loturaren luzera aldatzean oinarritzen dira.
- Makurdurazkoak: bibrazio hauek deformazio bibrazioak dira, mugimendu perpendikularrekin lagunduak izaten dira normalean. Loturaren luzera konstante mantentzen dute, baina loturaren deformazioa emateko modu desberdinak daude (guraizea, tortsioa...).



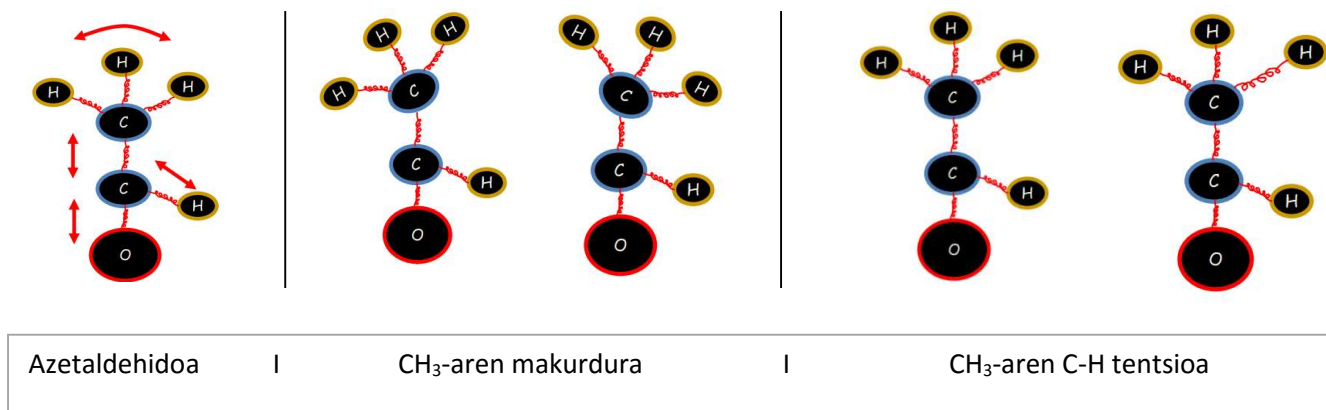
Orokorrean, tentsioak energia handiagoa behar dute makurdurak baino. Kontuan izan behar da modu hauetatik asko infragorrian ez direla aktiboak izango. Molekulak multzoaren bibrazioak dira.

CH<sub>2</sub> taldean, makurdura mugimendu batzuk daude, eta baita tentsio mugimendu batzuk ere. Kloroformoaren kasuan (gorria karbonoa eta horiak hidrogenoak) tentsiozko hainbat mugimendu daude. Tentsioak v letrarekin izendatu ohi dira, eta makurdurak  $\delta$ -rekin.

Kimika organikoan hauek ezagutzea garrantzitsua da, banda guztiekin molekula baten estruktura jakin dezakegulako infragorriaren espektroa ikusita. Normalean beste teknika batzuk ere erabiltzen dira. Adibidez, RMN-rekin informazio anitz lortzen da molekularen estruktura jakiteko.

Molekula txikien banden esleipena egiteko, infragorriak informazio ugari ematen digu, baina molekula handiekin lan egitean, ordea, pikoak solapatu egiten dira. Kasu hauetan ezingo dugu estrukturaezagutu eta horregatik beste teknika batzuk erabili behar dira. Hala ere espektro hauetatik informazio nahiko atera daiteke.

Adibide moduan azetaldehidoa aztertuko dugu. Azetaldehidoan, zenbait tentsio eta makurdura ikus daitezke. Lotura guztietan izan daitezke tentsioak edo makurdurak, eta bakoitzak bere uhin zenbakia izango du. Esaterako  $\text{CH}_3$ -aren C-H loturen artean tentsioa izango dugu, energia nahikoa beharko duena ( $\tilde{\nu}=2960\text{-}2870\text{ cm}^{-1}$ ). Tentsioak aurkituko ditugu C-C karbono loturen artean ( $\tilde{\nu}=1165\text{ cm}^{-1}$ ), CHO-ren C-H loturan ( $\tilde{\nu}=2720\text{ cm}^{-1}$ ) eta C=O loturaren artean ( $\tilde{\nu}=1730\text{ cm}^{-1}$ ). Horrez gain makurdurak ere aurki ditzakegu  $\text{CH}_3$  loturan.



#### 4. Hautaketa arauak

- Soilik molekularen momentu dipolarraren aldaketak eragiten dituzten trantsizioak dira. Hau da, momentu dipolarrean aldaketa bat egon behar da.
- Molekula baten bibrazioa funtsezko bibrazioetan bana daiteke.
- Funtsezko moduak independenteak dira beraien artean. Batera gerta daitezke konplexuagoa dirudien bibrazio bat emateko.

##### 1.- Momentu dipolarra aldatu behar da.

Molekula simetrikoki zein diatomikoek ez dute seinalerik emango.

- Etanoaren ( $\text{CH}_3\text{-CH}_3$ ) C-C tentsioa ez da aktiboa da infragorrian lotura simetrikoa delako.
- Trikloroetanoaren ( $\text{CH}_3\text{-Cl}_3$ ) C-C tentsioa aktiboa da
- $\text{SO}_2$ ren kasuan, bai, aktiboa izango da.
- Etenoaren ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) C-H arteko tentsioa aktiboa da.
- Etenoa: mugimendu simetrikoa burutzen duenez ez da aktiboa
- Aktiboa
- Ez aktiboa

Molecule	Motion
(a) $\text{CH}_3\text{-CH}_3$	C—C stretching
(b) $\text{CH}_3\text{-CCl}_3$	C—C stretching
(c) $\text{SO}_2$	Symmetric stretching
(d) $\text{CH}_2=\text{CH}_2$	C—H stretching:
(e) $\text{CH}_2=\text{CH}_2$	C—H stretching:
(f) $\text{CH}_2=\text{CH}_2$	$\text{CH}_2$ wag:
(g) $\text{CH}_2=\text{CH}_2$	$\text{CH}_2$ twist:

##### 2.- Banden intentsitatea sortzen den dipoloaren intentsitatearen arabera da.

Karboniloaren kasuan, sortzen den dipoloa handia denez, intentsitate handiko banda izango dugu, baina etilenoan dipoloa txikia denez, intentsitate oso txikiko xurgapen banda izango dugu. Beraz, zenbat eta banda intentsuagoa izan, orduan eta intentsuagoa izango da dipoloa.

## 5. Aplikazioak

### Espektroa

Loturen arabera banda desberdinak ikusiko ditugu. Kasu honetan ultramorean edo ikusgaian baino banda gehiago eta zorrotzagoko espektroak lortuko ditugu. UM ikusgaian bandak oso zabalak izaten dira, baina hemen oso zorrotzak, eta beraz informazio gehiago izango dugu.

Molekula bakoitzak bere banda eredua izango du; espektro espezifikoa izango du beraz. Horrela azterketa kualitatibo eta kuantitatiboak egin ditzakegu. Kualitatiboak molekulak identifikatzeko edo talde funtzionalak aztertzeke erabiliko dira. Gainera, abantaila handia da hatz markaketan agertzen diren banda guztiak molekularekiko espezifikoak izatea. Gure kasuan normalean egitura sekundarioen inguruko informazioa lortuko dugu.

Azterketa kuantitatiboan, aldiz, banden intentsitatea aztertuz molekularen kontzentrazioaren inguruko informazioa lor dezakegu. Hau burutzeko, normalean transmitantzia % vs. uhin zenbakia egiten da.

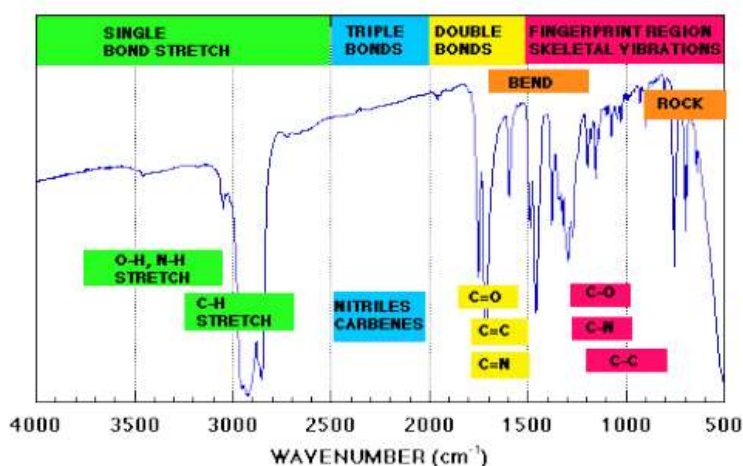
### Analisi kualitatiboa

- **Talde funtzionalen determinazioa.** Talde funtzional bakoitzak uhin zenbaki bereizgarri bat xurgatzen du eta talde funtzionalaren ingurunearen arabera uhin luzeraren aldaketa txikiak ematen dira.
- **Lagin mota desberdin askoren analisia.** Egoera solidoan, likidoan zein egoera gaseosoan burutu daiteke. Normalean ohikoena modu gaseosoan erabiltzea izaten da, adibidez hirietako airearen kutsadura neurtzeko. Egoera puruan edo disoluzioan egin dezakegu eta gainera laginaren gune bakar bat soilik aztertzea baimentzen du. Beraz, modu ezberdineko azterketak burutu daitezke.
- **Konposatuen identifikazioa.** 100-600  $\text{cm}^{-1}$  tarteari *hatz marka* deritzo. Hatz marka hau konposatu bakoitzaren oso bereizgarria da.

### Eskema orokorra

Aurkitzen diren talde funtzionalen azterketa 3600  $\text{cm}^{-1}$  eta 1200  $\text{cm}^{-1}$  tartea aztertuz.

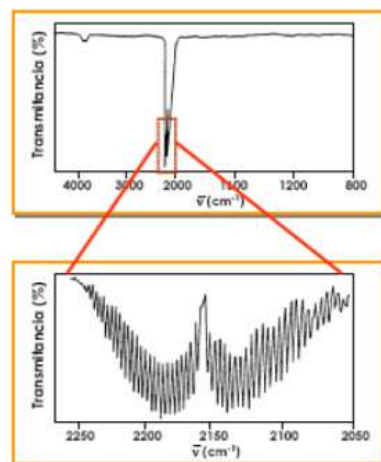
Banda bakoitza espezifikoa da talde konkretu bakoitzarentzako eta beraz konposatu bakoitzak bere banda propioak izango ditu. Irudian kolore arrosaz ikusten dena hatz marka espezifikoa izango da.





Infragorrien bidez trantsizio bibrazionalak neurtuko ditugu, baina horrez gain, errotaziozko trantsizioak ere ditugu, mikrouhinetan aztertzen direnak. Molekula baten elektroiak beste maila bibrazional batera igotzean izan dezakegun joera ezberdina da, zeina tenperaturaren arabera izango den (orokorrean tenperatura altuetan maila handiagoetara igoko da). Horrela trantsizio anitz gerta daitezke, bakoitza probabilitate ezberdinekin. Horregatik, banda ezberdin asko lortuko dira, bakoitza intentsitate ezberdinekoak.

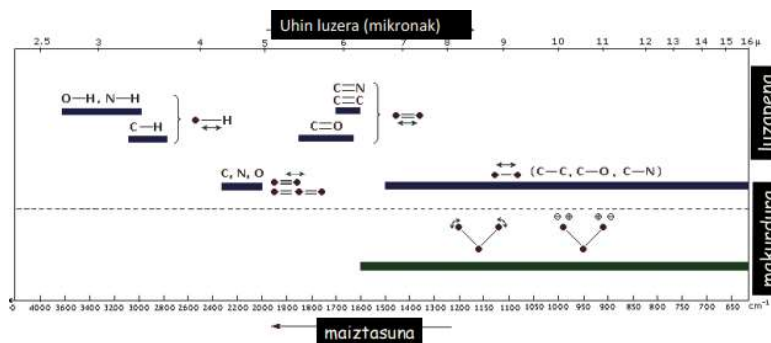
Espeketroan funtsezko banda bakarra dela badirudi ere, bereizmen handiagoko tresna bat erabiliz, piko ezberdinez osatuta dagoela ikus dezakegu. Beraz, erresoluzio oso handiarekin trantsizio errotazionalak ere ikus ditzakegu. Hala ere, espeketro normaletan ez dugu horren bereizmen handirik izango.



### Taldeen maiztasun tartea ( $\text{cm}^{-1}$ )

- Talde funtzional askoren maiztasuna ( $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}\equiv\text{O}$ ,  $\text{C}-\text{H}$ ,  $\text{O}-\text{H}$ ) masa atomiko eta indar konstanteetatik atera daiteke
- Posizioa inguruko atomoen arabera pixka bat aldatzen da
- Molekulak ezagutzeko lehenengo urratsa izaten da

Datu base asko daude lotura bakoitza aztertzeko erabilgarriak izango direnak eta bertatik lotura bakoitzaren uhin zenbaki tartea zein den jakin dezakegu.



Bond	Type of Compound	Frequency Range, $\text{cm}^{-1}$	Intensity
C-H	Alkanes	2850-2970	Strong
C-H	Alkenes	3010-3095 675-995	Medium strong
C-H	Alkynes	3300	Strong
C-H	Aromatic rings	3010-3100 690-900	Medium strong
O-H	Monomeric alcohols, phenols Hydrogen-bonded alcohols, phenols Monomeric carboxylic acids Hydrogen-bonded carboxylic acids	3590-3650 3200-3600 3500-3650 2500-2700	Variable Variable, sometimes broad Medium broad
N-H	Amines, amides	3300-3500	medium
C=C	Alkenes	1610-1680	Variable
C=C	Aromatic rings	1500-1600	Variable
C≡C	Alkynes	2100-2260	Variable
C-N	Amines, amides	1180-1360	Strong
C≡N	Nitriles	2210-2280	Strong
C-O	Alcohols, ethers, carboxylic acids, esters	1050-1300	Strong
C=O	Aldehydes, ketones, carboxylic acids, esters	1690-1760	Strong
$\text{NO}_2$	Nitro compounds	1500-1570 1300-1370	Strong

### Ingurune kimiko eta ordezkatzaileren eragina

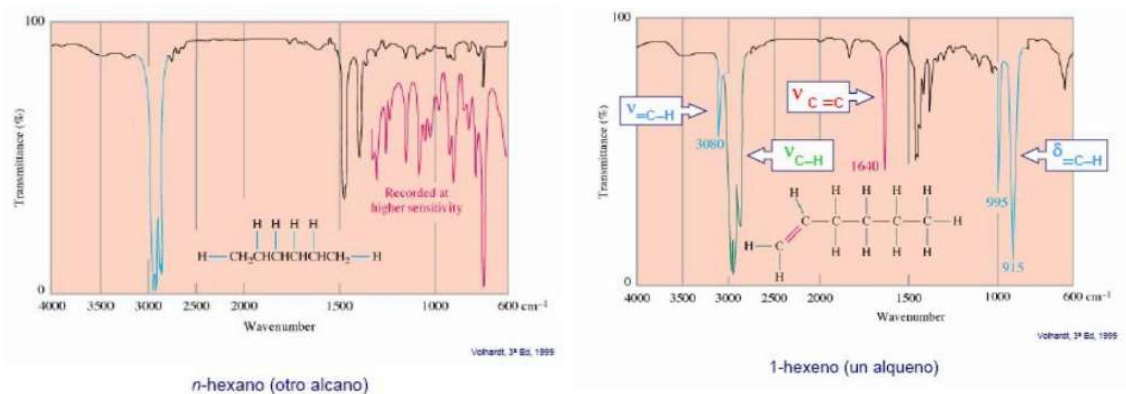
#### Efektu induzitzailea

Bandak aztertzeko garrantzitsua izango da sortzen den dipoloa aztertzea, hau eraldatzeko gai den edozerk eragina edukiko duelako banden intentsitatean. Kontuan izan behar dugu elektroiek loturetan parte hartzen dutela:

- elektroiak egonkortzen dituen konposatu batekin kontaktuan baldin badaude, bibrazioa emateko energia gehiago behar da.



C-H loturaren tentsio bibrationalak banda oso handi bat (C-H lotura guztiei dagokie). Horrez gain makurdurazko beste banda bat ere ikusten da, intentsitate txikiagoko. Arrosaz hatz marka ikus dezakegu. Molekula aldatzen badugu ( $\text{CH}_3$  bat gehituz) tentsio eta makurdura bandan nahiko antzekoak izan arren, hatz marka asko aldatzen dela ikusten dugu. 1-hexenoaren espektroan esaterako, banda gehiago ikusten ditugu,  $\text{C}=\text{C}$  lotura bikoitzaren banda berri bat agertuko baita. Azkenik ziklohexilaminaren espektroan N-H loturaren tentsioa ageri da.



### Analisi kuantitatiboa

- Zehaztasunari dagokionez ultramorea eta ikuskorrekoea baino txikiagoa da, beraz espektro konplexuak lortuko dira.
- Instrumentazioaren limitazioak izango ditugu (detektagailuak potentzia txikiagoa izango dute) eta molekularen aldaketa txikiek asko aldatuko dute espektroaren seinalea. Instrumentazioa ez da horren sentikorra eta askotan soinu arazoak izaten dira. Horregatik espektro asko egin behar izaten dira espektro on bat lortzeko.
- Abantaila: selektibitatea, konposatu desberdinek infragorrian espektro desberdinak erakutsiko dituztelako
- Aplikazioetako bat: airearen kutsaduraren azterketa.

### 6. Instrumentazioa

IR bandek intentsitate gutxiago izaten dute xurgapen koefiziente molarrak txikiagoak direlako eta beraz kontzentrazio altuagoak erabili behar dira. Gainera, banden intentsitatea indusitutako dipoloaren magnitudearen araberakoa izango da. Urak biologikoki garrantzitsua den tarte zabal batean xurgatzen du eta beraz D<sub>2</sub>O pelikula lehorrak erabiltzen da. Ur pisutsua erabiltzen badugu ez dugu O-H loturarik izango, deuterioa izango dugu. Kasu honetan bi atomoen arteko ezberdintasuna txikiagoa izango denez bandak mugitu egiten dira. Azkenik, instrumentuen detekzio sistemak sentikortasun txikiagoa izaten dute.

### Espektrofotometroak

- Aparatuaren osagaiak
  - Iturria (lanpara)
  - Gelaxka: ez da inoiz beirazkoa izango, beirak uhin infragorriak xurgatzen dituelako
  - Detektagailua

Bi motatako espektrofotometroak erabiltzen dira:

1. Dispertsio edo transmisio metodoa: uhin luzera hautatzaile bat erabiltzen du laginaren ondoren. Hau da, lanpara izango dugu, ondoren lagina, hautatzailea eta azkenik detektorea. Infragorrian lagina uhin luzera guztiekin irradiatzen da eta elektroi gutxi daukanez laginean ez du kalterik sortuko. Infragorrian ez da inolako uhin hautaketarik egiten, laginetik ateratzen denean egiten da hautaketa.

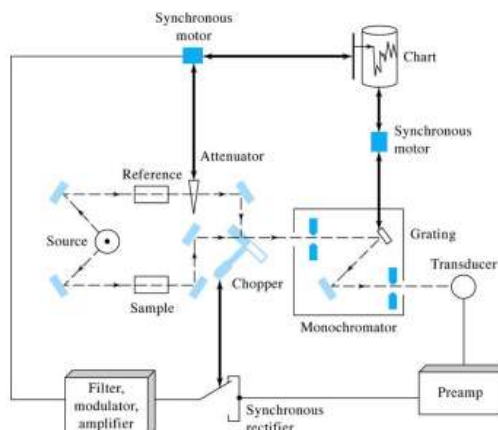


2. FT-IR metodoa: interferometro bat izango dugu. Lehenik lanpara egongo da, ondoren interferometroa, lagina eta azkenik detektagailua. Laginak uhin luzera guztiekin batera irradiatzen da, baina interferometroari esker uhin luzera guztiak batera detektatzen dira, espektroak oso azkar lortuz.



### Espektrofotometro konbentzionala

UM-ikuskorreko espektrofotometroen antzekoa da. Desberdintasun nagusiak lanpara eta detektagailua dira. Argia lehenengo laginetik pasatzen da eta gero monokromadoretik.



### Erradiazio iturria

Infragorri izpien igorpen iturriak 1500-220K-tara elektrikoki berotzen diren solidoak izaten dira, eta berotzerakoan argia igortzen dute.

- Nernst lanpara: Elektrikoki berotutako lur arraroen oxidozko zilindro bat da. Platinozko elektrodoak ditu konexio elektrikorako. Korrante elektriko bat pasatzerakoan berotu egiten da 1200-2200 K-etara. Lortzen dugun espektroaren tartea  $670\text{-}10000\text{cm}^{-1}$ -koa da, oso tarte zabala.
- Global iturria: Nernst lanpararen antzekoa da baina silizio karburoa erabiltzen da. Hemen ere antzeko tartea lortzen da.

- Goritasun alanbrea: Elektrikoki berotutako kromonikelezko edo radiozko alanbreak ditu. Nernsten lanpararen printzipio berdina jarraitzen du. Aurreko biak baino intentsitate txikiagoa lortzen da, baina bizitza luzeagoa du.  
-CO<sub>2</sub> laserra: Gasen nahastura bat da: % 70 helio, % 15 CO<sub>2</sub> eta % 15 N<sub>2</sub>. Gasen boltai bat eratzen da N<sub>2</sub> maila bibrazional baxuetara kitzikatuz. N<sub>2</sub> kitzikatuak CO<sub>2</sub>-ren bibrazio asimetrikoak eragiten ditu talken bidez. 100 cm<sup>-1</sup> tako bandak eratzen ditu 900-1100 cm<sup>-1</sup> tartean. Lan egiteko tarte txikia da baina interesatzen zaizkigun konposatu askok xurgatzen dute tarte horretan. Hemen erresoluzio oso handia lortuko dugu, oso intentsoa.
- Beste batzuk: Merkuriozko arku lanpara (urruneko IR), tungstenozko lanpara (gertuko IR).

## Lagina

1. Lagin likidoak
2. Pelikulak:
  - a. Disolbatzailearen ebaporazioa
  - b. Solidifikazioa
3. Disko prentsatuak (pelikulak eratzen ez direnean):
  - a. KBr-z prentsatutako pastilak
  - b. Lagina KBr-arekin nahasten. Molekula askeekin asko erabiltzen da, ez ordea biomolekulekin
4. Olio gardenak nahasten dira

## KBr diskoen prestaketa

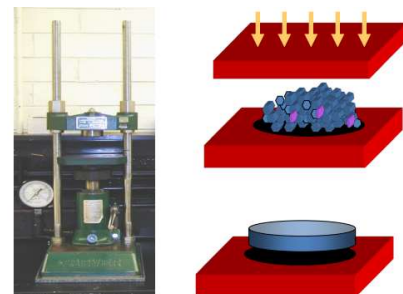
Gure laginarekin nahastuko dugu egoera solidoan eta horrela uraren pikoak kentzen ditugu. Guztiarekin pastilla bat eratzen da, disko bat, eta hau ondoren infragorrian sartuko dugu.

## Olioetan disolbatuta

Olio gardenak erabiltzen dira gure laginarekin nahasturik. Gero plaka bat sartzen da (ez beirazkoa IR-an xurgatzen duelako, normalean gatzaz osatutakoak izaten dira) eta ondoren espektrofotometroan sartzen da.

## IR soluzioan

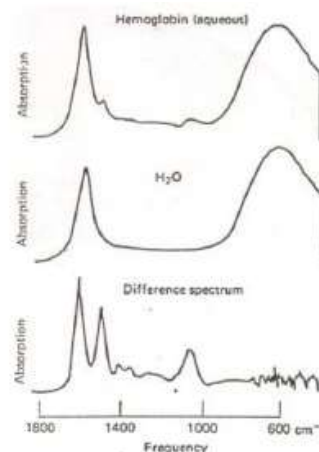
IR tarte osoan gardena den disolbatzailerik ez dago. Disolbatzaile perkloratua oso ona izaten da: karbono tetrakloruroa, kloroformoa eta tetrakloroetanoa. Hala ere biomolekulekin hauek ezingo ditugu erabili. Urak momentu dipolarra dauka eta argia xurgatzen du infragorrian. Beraz askotan D<sub>2</sub>O nahasturak erabiltzen dira arazoa ekiditeko. Geruza fin hidratatuak ere erabili daitezke.



## Uraren arazoa

Uraren OH tentsio bibrazionalak xurgapen oso handiak adierazten ditu ( $3500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ). Honi aurre egiteko soluzio ezberdinak daude:

- Film lehorrak, diskoak, olioak...
- Espektroen kenketak egin. Uretan disolbatutako makromolekularen espektroari soilik uraren espektroa kenduko diogu programa baten bidez makromolekularen banda zehatzak zeintzuk diren jakiteko.

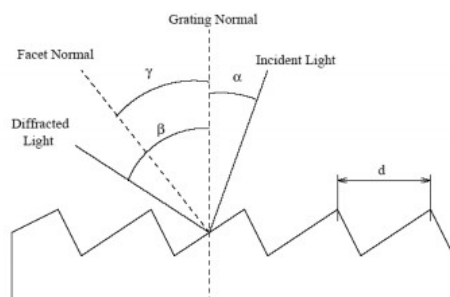


## ATR (attenuated total reflectance)

Laginaren seinalea amplifikatuko dugu honen bidez. Azal berezi bat dugu eta azal honen gainean lagina kokatzen da. Lagina argi infragorriarekin irradiatzean argia laginetik pasa eta ondoren islatu egiten da, berriro ere laginetik pasaz eta seinalearen amplifikazioa emanez. Lortutako espektroak olioetan disolbatutako solido edo KBr pastillekin lortutako baino hobeak dira.

## Monokromadorea

Honek difrakzio sare bat du. Ezin dira beirazko prismak erabili, xurgatu egiten duelako.



## Detektagailua

Dispersiozko infragorrian bi motatakoak erabiltzen dira:

1. Detektagailu termikoak: tenperatura desberdintasuna ( $\Delta T$ ) neurtzen dute gorputz beltz batek IR xurgatzen duenean. Baliagarria izaten da ia IR maiztasun guztientzat. Desabantaila nagusia inguruneko soinuari oso sentikorra dela izango da, horregatik bero iturrietatik isolatuta eta hutsean burutzen da.
  - Termoparea: elkartuta dauden metal desberdineko bi xafra ditugu. Metal desberdinak abiadura desberdinean berotzen dira eta potentzial desberdintasun bat eratzen da. Hau izango da detektagailu termiko ohikoena.
  - Bolometroa: material erdieroale edo metalezko xaflak (Pt, Ni) erabiltzen dira. Oso sentikorra da eta  $5\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ -ko tartean xurgatzen du ( $200\text{-}25\mu\text{m}$ ), baina ez du balio erdiko infragorrirako, horregatik ez da hainbeste erabiltzen.

2. Detektagailu piroelektrikoa: bi elektrodoen artean aurkitzen den materialepiroelektrikozko xafila bat da. infragorriarekin berotu eta horrela kargen banaketa aldatzen da.

### Dispersiozko Espektrofotometroa

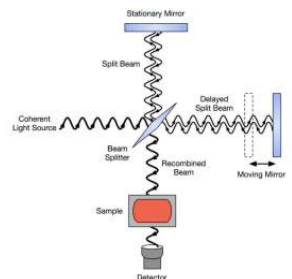
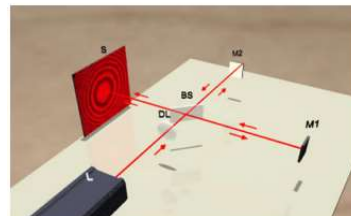
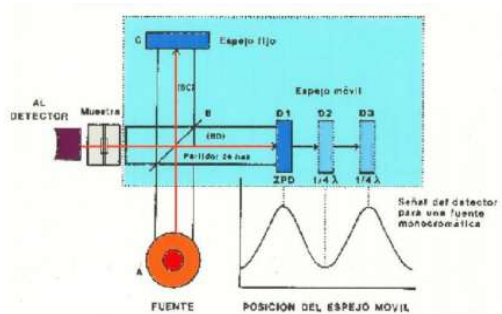
Normalean infragorriko espektro bat burutzean intentsitatea txikia izaten da eta soinu seinale handia izaten dugu, beraz intentsitatea handitzeko eta soinua gutxitzeko hainbat espektro egin behar izaten dira. Modu honetan azkenean espektro bat lortuko dugu soinu seinalea gutxituz.

Monokromadorea izango dugu lagin ostean, UM/ikuskorrean laginaren aurrean fotodegradazioa ekiditeko, hau da, kasu honetan, laginera uhin luzera guztiak iritsiko dira. Infragorriak energia gutxiago du eta monokromadoreak infragorriaren background argia deuseztatzen du. Arazoa iturriak energia gutxi duela izango da. Hori dela eta scan luzeak burutu behar ditugu, detektagailuaren erantzuna motela eraginez.

### FT-IR espektrofotometroa

Lanpara, interferometroa lagina eta detektagailua ditugu espektrofotometro mota honetan. (irudia). Emaitzekin interferograma bat lortuko da eta hau interpretatuz, ordenagailu bidez espektroa lortuko da. Abantaila nagusia oso azkarra (1 segundu) dela izango da, detektagailuak uhin luzera guztiak batera neurtzeko aukera duelako, maiztasun guztiak batera neurtzen ditu. Michelson-en interferometriari oinarritutako metodoa da hau. Interferometroa izpi banatzaile batez osatuta (beamsplitter) egongo da, eta ispilu finko bat eta beste mugikor bat izango ditu. Izpi banatzaileak, erradiazioaren %50a transmititzen du, eta beste %50a islatu.

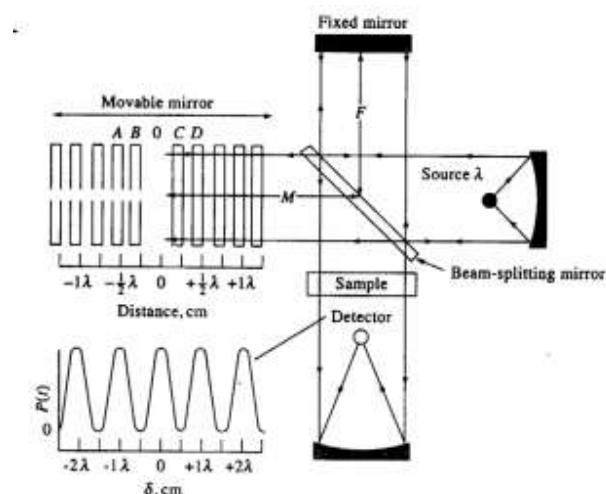
### Michelson-eninterferometroa



- 1) Igorritako argia ispilu baten bidez erdibitzen da intentsitate berdineko bi argi-izpietan.
- 2) Argi sorta bakoitza ispilu batera heltzen da, islatu eta orduan bi sortak errekonbinatzen dira. Gero laginean zehar detektagailuraino pasatzen dira.
- 3) Ispilu bat finkoa da eta bestea mugikorra izango da. Ispiluak mugitzean, bi argi izpien faseak aldatzen dira interferentzia eraginkor eta suntsikorrak sortuz.

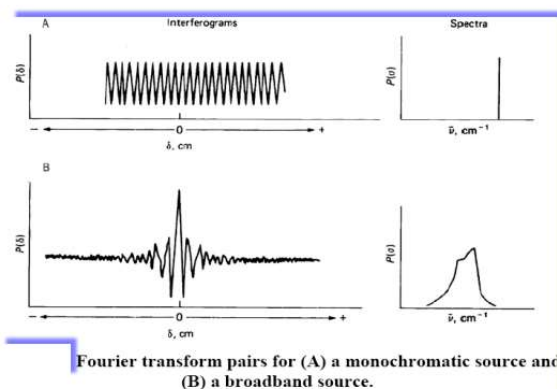
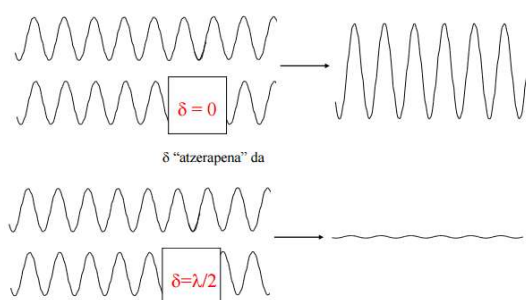
Infragorriaren uhin luzera eta ispilua mugitutako distantzia erlazionatzeko:

- $$v_m \tau = \frac{\lambda}{2}$$
- $v_m$  = ispilua mugituko abiadura
  - $\tau$  = ispilua  $\lambda/2$  mugitzeko behar den denbora



## Interferentzia

Interferentzia sortuko da puntu berera iristeko bi uhinen arteko distantzia desberdina denean. Bi uhinen arteko distantzia  $\lambda$ -ren multiplo osoa bada, uhinak fasean egongo dira. Haien arteko distantzia  $\frac{1}{2} \lambda$ -ren multiplo bakoitia bada  $180^\circ$  desfasea egongo da eta interferentzia suntsikorra sortuko da.

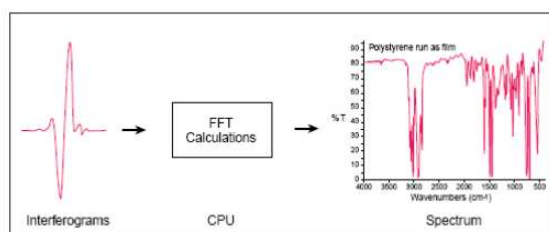


Michelson-en interferometroak  $\lambda$  hautatzen du denbora. Infragorriko uhin luzera bakoitzak intentsitate vs denbora perfil bat edukiko du.

Aipatu bezala, espektrofotometro mota honekin interferogramak lortuko ditugu, jarraian ordenagailuaren bidez kalkulu batzuk egin eta espektroak lortzeko. Kalkuluak egiteko Fourier-en transformatua erabiltzen da.

## Fourier-en transformatua

Kurba konplexu bat da lortuko da interferograman. Bere konposatueta banatzeko erabiltzen den eragiketa matematikoa.





### FT-IR espektrofotometroaren abantailak

- Maiztasun guztiak batera detektatu daitezke, espektro osoa 1 segundutan burutuz.
- Interferogramaren seinalea eskaneo desberdinen batazbestekoa da, seinale/soinu erlazio altua da.
- Infragorrian erradiazioa zuzenean iristen da laginera, ez dago monokromadorerik, sentikortasuna hobetuz.
- FT-IR-ko aparatuek HeNe-ko laser bat dute, barne kalibrazioa eta datuen digitalizazioa ahalbidetzen duena.
- Erresoluzio oso handia lortzen da bandetan ( $<0.1\text{ cm}^{-1}$ ).

## **Biomolekulen infragorria**

### **1. Sarrera**

#### Abantailak:

- Lipido eta proteinei buruzko informazioa lortzen dugu aldi berean, bakoitzak bere bandak uhin zenbaki desberdinetan dituelako.
- Laginak solido, uretan disolbatuta, pelikula... moduan erabili daitezke.
- Material kantitate gutxi behar da.
- Datuak zuzenean lortzen dira ikasten ari garen molekulatik, ez da zundarik behar.
- Molekula baten atal desberdinetatik lor daiteke informazioa.
- Espektroen lorpena azkarra eta erraza da.
- Ez dute lagina kaltetzen, gero lagina berreskuratu daiteke beste analisiak egiteko.

#### Desabantailak:

- Urak interferentziak sortzen ditu, gure intereseko tartean xurgatzen duelako.
- Aldaketa isotopikoa geldoa da. Isotopoak jarritz bandak aldatzen dira, baina isotopo horiek erabiltzeko denbora behar da.
- Ez du informaziorik ematen egitura tertziarioari buruz

### **2. Uraren arazoak**

Molekula biologikoek beraien funtzioa soluzioan betetzen dute, uretan normalean, beraz, lagina uretan disolbaezina den bi leihatilen tartean kokatuko da, normalean gatzez osatuak daudenak. Leihatila mota bakoitzak transmitantzia tarte bat dauka. Analisi hauetan kristala ezin dugu erabili, izan ere, beirak infragorria xurgatzen du. Horregatik, beste kristal motak erabiltzen dira, gatzez osatuak egon ohi direnak, eta transmitantzia %100-ekoa izaten dute uhin luzera konkretu batean.

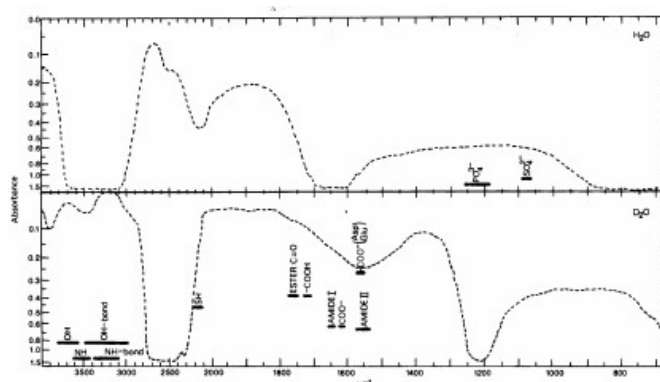
Esan bezala, urak infragorrian erradiazioa xurgatzen du  $3500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ -ko tartean. Baina tarte honetan molekula biologikoek ere xurgatzen dute, hala nola,  $\text{CH}_2$  tentsioek, amida I eta II loturek...

Arazo honen aurrean konponbide ezberdinak ditugu:

1. Laginak pelikula lehorretan egitea: ez du balioko biomolekulak aztertzeke, proteinak agregatu eta desnaturalizatzen direlako, beraz, estrukturak galduko lirateke.
2. KBr-zko pastilak erabili edota lagina deshidratatu eta oliotan disolbatu: ez dira erabilgarriak biomolekulak aztertzeke.

Aukera hauek guztiak baldintza ez fisiologikotan egiten dira, beraz gure kasuan ezin ditugu erabili.

3. Espektroen kenketa (lagina + ura) – ura egin daiteke: laginean ur gutxi badago soilik erabili daiteke metodo hau. Disolbatzailea ura bada, OH bandak asko xurgatzen du eta ezin da espektroen arteko kenketa burutu. Uraren seinaleak proteinarena estaliko du, eta ez da ezer ere ikusiko.
4.  $H_2O/D_2O$  aldaketa: Ur pisutsuak  $2200-2500\text{cm}^{-1}$ -tan xurgatzen du. Hidrogeno eta deuterioaren arteko masa desberdintasuna txikiagoa denez hidrogeno eta oxigenoarena baino, energia gutxiago beharko da, eta beraz bandak eskuinerantz desplazatuta daudela ikusten dugu, proteinen bandak hobeto ikusiko direlarik. Horrela, seinaleekin ez da inolako interferentziarik sortuko.
5. Kubetaren pasu-optikoa txikitu.



### **3. IR:PROTEINAK**

#### IR seinalearen jatorria

Infragorriak erabiliz ezin izango dugu proteinen egitura tertziarioari buruzko informaziorik jakin, baina egitura sekundarioa bai. Infragorriak erabilita,  $\alpha$ -helizeak eta  $\beta$ - orriak detekta ditzakegu, eta biak nahastuta egotekotan, bakoitzaren portzentaia ere bai.

#### Proteinen egitura sekundarioa

B-orri zein  $\alpha$ -helize egiturak izan ditzakegu. Egitura hauek infragorrian ikus ditzakegu baina hidrogeno zubiez baldintzatuta egongo dira. Hau da, infragorrian espektroak desberdindu egiten dira hidrogeno zubi ezberdinak eratzen direlako. Tentsioak ere ezberdinak izaten dira desnaturalizatuta daudenean.

## Lotura peptidikoa

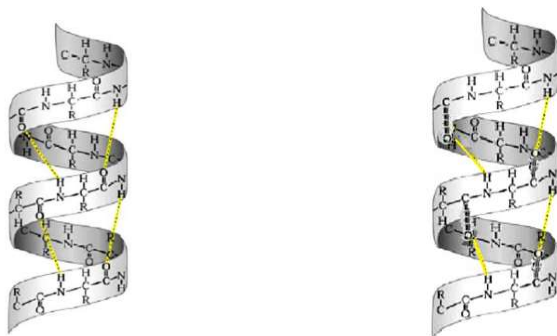
Lotura peptidikoak kromoforo garrantzitsuena izango dira. Espektro konplikatuak lortzen dira kasu hauetan. Lotura peptidiko desberdinak lortuko dira ingurune desberdinetan. Egitura sekundarioa eratzerakoan, amiden  $H_2$  zubiek banda bibrazionalen desplazamenduak eragiten dituzte. Egitura sekundarioaren arabera, gainera, hidrogeno zubien orientazioa desberdina da eta beraz horren bibrazioa ere desberdina izango da.

Egitura sekundarioan ematen diren aldaketen azterketarako, proteinen agregazioa, edota desnaturalizazioa bezalako prozesuak azter daitezke, lotura peptidikoaren inguruko informazio anitz ematen dizkigutenak. Orokorrean, amida I banda karboniloaren tentsioarekin ( $C=O$ ) ematen da eta amida II banda, aldiz, C-N loturarekin.

$\alpha$ -helize egituran, oxigenoaren lotura amidaren hidrogenorantz luzatzen da, eta honekin bibrazio bat sortuko da.

Beraz, egitura sekundarioan  $\alpha$  helizeak eta  $\beta$  orriak ditugu, azken hauek paraleloak edo antiparaleloak izan daitekeelarik. Lotura peptidikoak begiratzen baditugu H zubiak eratzen dira.

Kasu honetan loturak luzatzen dira, H zubiek  $C=O$ -ren lotura luzatzea eragiten baitute. Hau, O amidaren H-rengana luzatzen saiatzen delako gertatzen da.



## *Banden esleipena*

Banden esleipena egiteko:

- Molekula analogo sinpleekin konparatuz burutzen da. Bibliografiara jotzen dugu eta tauletatik informazioa jasoko dugu.
- Ordezkapen isotopiko bidezko desplazamenduen azterketa. Hau geldoa da. Ordezkapen honetan guk atomo bat markatzen dugu, eta orduan ikusiko dugu espektroa aldatzen duen edo ez. Horrela konparatuz jakin dezakegu banda isotopoaren arabera den edo ez.
- pH, T eta beste faktore batzuek efektuaren bidez.
- Kalkulu teorikoak burutu bandak zein uhin zenbakitan dauden jakiteko.
- Orientatutako laginen polarizazio espektroak egin ditzakegu.
- Proteina eta polipeptidoen espektroa normalean lotura peptidikoarekin erlazionatzen da banda handiak sortzen direlako, eta hauek **amida bandak** deitzen dira.

CONH talde zapal hipotetiko batek 9 amida banda ditu: amida A, amida B eta amida I-VII (maiztasun handienetik txikienera izendatuak):

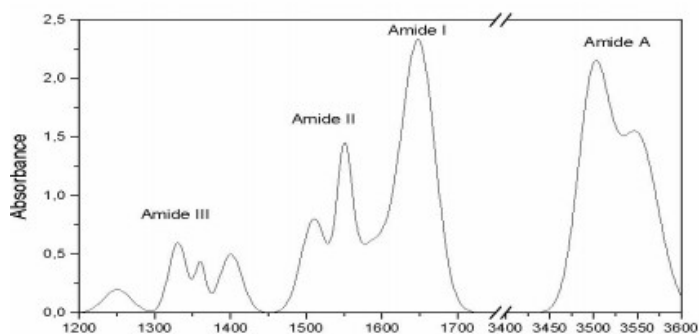
Bandas características asociadas con el enlace peptídico. Tomada de Arrondo y cols., 1993.

Simetría	Descripción	Frecuencia aproximada (cm <sup>-1</sup> )	Descripción.
En el plano	Amida A	3300	NHs (100%)
	B	3100	
	I	1650	COs (80%), CNs, CCNd
	II	1550	NHib(60%), CNs (40%), COib, CCs, NCs
	III	1300	CNs (40%), NHib (30%), CCs # (20%), Coib
Fuera del plano	Amida IV	625	COd (40%), CCs#(30%), CNCd
	V	725	NHob, CNt
	VI	600	COob, CNt
	VII	200	NHob, CNt, COob

s, tensión; d, deformación; t, torsión; ib, flexión en el plano; ob, flexión fuera del plano; s #, tensión metilo-C.

Bandak:

- Amida I (1600-1700 cm<sup>-1</sup>) batez ere karbonilo taldearen (C=O) tentsioaren bidez ematen da (%80). Asko erabiltzen da egitura sekundarioa determinatzeko.
- Amida II (1520-1550 cm<sup>-1</sup>) askotan C-N tentsioa N-H makurdurari akoplatua. Banda honetan mugimendu desberdinak sortzen dira.
- Amida III (1350-1200 cm<sup>-1</sup>) C-N tentsioa bibrazioa N-H makurdurari akoplatua, baina kasu honetan hidrogenoa planoan dago.

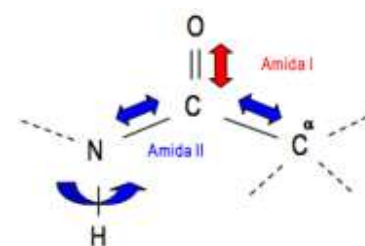


### Egitura sekundarioa-eredu polipeptidikoak

Polipeptido sintetiko asko erabili dira proteinen espektroa ezagutzeko. Horretarako erabiltzen diren polipeptidoek egitura sekundario ezaguna dute, eta konparaketaz azterketak egin dira. Adibidez, polilisinak asko erabili izan dira. Honek, tenperatura eta pH-aren arabera egitura desberdinak izaten ditu molekula honek. Lan esperimental eta teoriko handiak egin dira polipeptido sintetikoekin eta orduan aztertu da egitura bakoitzeko aldagarritasun eta maiztasunari buruzko informazio asko.

## Amida I banda

Amida I lotura peptidikoaren C=O tentsioengatik ematen da. Bibrazioen maiztasuna C=O eta N-H-k eratzen dituzten hidrogeno zubien menpekoa da. Eratzen dien hidrogeno zubiak, proteinaren egitura sekundarioaren menpekoak dira gainera.

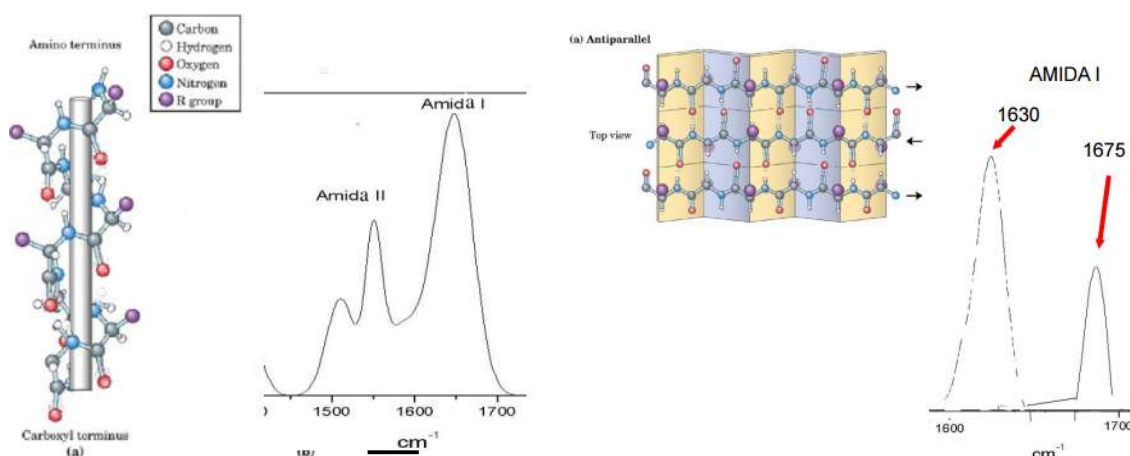


Amida I banda proteinetan ematen diren egitura sekundarioen aldaketekiko oso sentikorra da, horregatik aztertzen da banda hau proteinetan.

1.  $\beta$ -orriak: amida I-en xurgapena eskeletoaren konformazioak zehazte du. Aminoazidoen albo kateen ekarpena arbuigarria da (hidrofobizifate, karga). Maiztasunak: 1630 eta 1675  $\text{cm}^{-1}$  tako bi banda ikusten dira, lehena indartsua eta bigarrena ahulagoa.
2.  $\alpha$ -helizeak: amida I-ko bibratzeko maiztasuna 1652  $\text{cm}^{-1}$  da eta amida II-ko bibratzeko maiztasuna 1548  $\text{cm}^{-1}$ . Banda bakarra ikusiko da.

Banda	Uhin zenbakia ( $\text{cm}^{-1}$ )	
$\alpha$ -helizea	1650	
	1660	
$\beta$ -orria	1630 eta 1675	antiparaleloak
	1630 eta 1648	paraleloak
agregatuak	1618 eta 1682	
begizta	1660 eta 1700	

Aminoazidoei dagokionez 20 aminoazidoen artean soilik 9k xurgatzen dute amida I/II tartean: Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Tyr, Phe eta His. Hala ere, hauen bibrazioak intentsitate txikikoak direnez, ez dira oso garrantzitsuak, ez baititugu ikusiko.



## Mugak

Normalean pikoak gainjartzen dira eta ezagutzeko oso zailak izaten dira. Urak neurketak oztopatzen dituenez, azterketa estrukturaletan 1645  $\text{cm}^{-1}$  banda kentzen da ur pisutsuagatik ordezkatuz, baina hau oso prozesu geldoa da.

Bandas de absorción de H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O y HOD.  
Tomada de Mendelsohn & Mantsch., 1986.

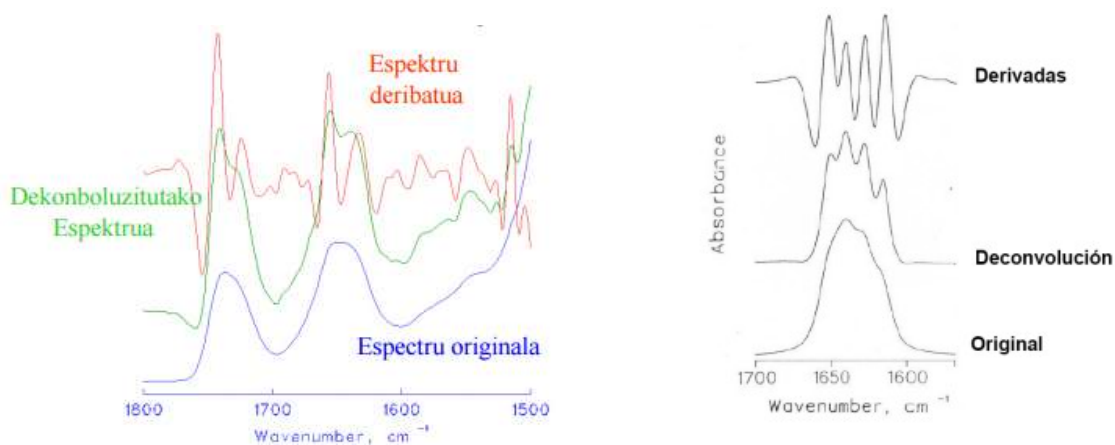
Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Descripción de la vibración	Símbolo
3490	tensión H-O-H	$\nu(\text{O-H})$
3280		
3380	tensión H-O(D)	$\nu(\text{H-OD})$
2540	tensión D-O-D	$\nu(\text{O-D})$
2450		
2500	tensión D-OH	$\nu(\text{D-OH})$
2125	banda asociada a H <sub>2</sub> O	$\nu_{\text{A}}(\text{H}_2\text{O})$
1645	flexión H-O-H	$\delta(\text{H}_2\text{O})$
1555	banda asociada a D <sub>2</sub> O	$\nu_{\text{A}}(\text{D}_2\text{O})$
1455	flexión H-O-D	$\delta(\text{HOD})$
1215	flexión D-O-D	$\delta(\text{D}_2\text{O})$

### Proteinen informazio estrukturala

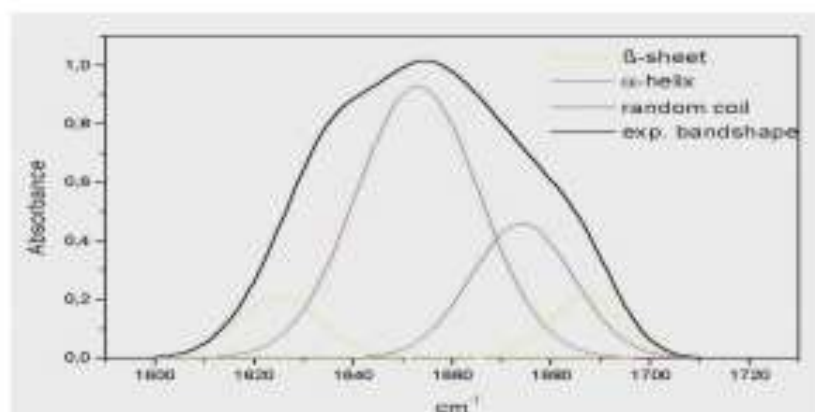
- 1- Datu baseetan dauden egiturekin konparatu gure laginaren egitura sekundarioa zein de jakiteko. Dikroismo zirkularra baino zehatzagoa da analisi hau.
- 2- Banden doikuntza: deribatuak eta dekonboluzioak erabiltzen dira. Lagin biologikoak konplexuak dira eta banda konplexuak banda desberdinengatik osatuta daude (solapamendu bidez).

➔ Teknika hauei esker banda eratzen duen osagaiak zeintzuk diren aztertu daiteke, *erresoluzio handipeneko teknikak* deitzen zaie.

### Datuen prozesamendua eta erresoluzioaren handipena

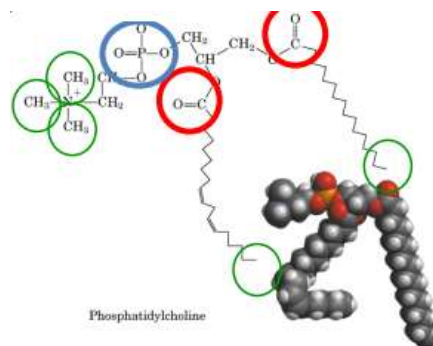


Dekonboluzioaren bidez banda desberdinak ikusiko ditugu, eta laugarren deribatua erabiliz ziurtatuko ditugu ikusten ditugun bandak. Espektru deribatua erabiltzen da ziurtatzeko banda horiek ditugula, dekonboluzioaren espektroarekin bandak ikus ditzakegu.

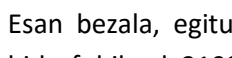


#### 4: IR: Lipidoak

gantz azidoak ditu.

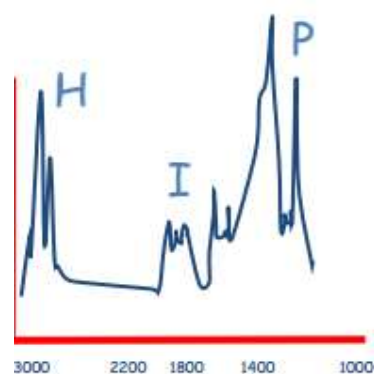
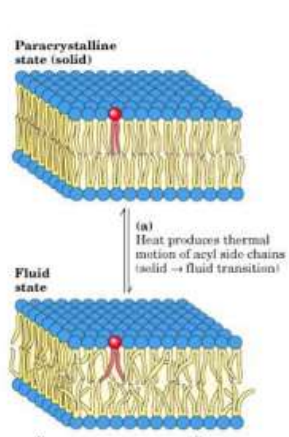
 $\text{CH}_3$  O

ezberdinak har dit

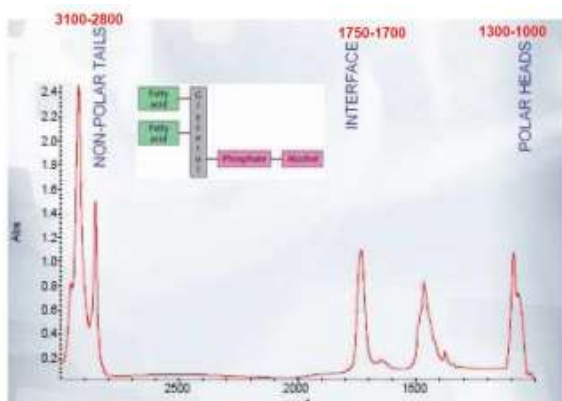


Esan bezala, egitura hauen adierazpena ezbedina izango da infragorrian. Espektroan talde hidrofobikoak  $3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ -ko tartean ikusiko ditugu, interfasea  $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  tartean eta talde polarra  $1300\text{-}100\text{ cm}^{-1}$ -ko tartean. Horregatik lipidoak dauden egoeraren arabera bandak aldatuko dira.





Fosfato taldeak fase lamelar batetik fase hexagonal batera pasatzean baino ez du aldaketarik jasaten bere bibrazioetan.

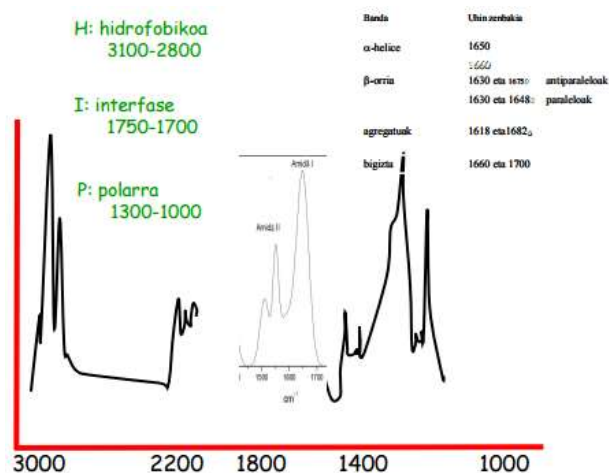


1732  $\text{cm}^{-1}$ -ean interfasean dagoen katea ikusten da: karboniloen luzapena.

Teknika honek lipido-proteinen arteko elkarrekintzak aztertzeko balio du proteinekin eta lipidoekin maiztasun desberdinak xurgatzen dituztelako.

## Banden esleipena

Rango de frecuencias	Descripción de la vibración	Simbología utilizada
3012 $\pm$ 2	tensión C-H	$\nu$ (H-C=)
2956 $\pm$ 1	tensión asimétrica CH <sub>3</sub>	$\nu$ (CH <sub>3</sub> )
2920 $\pm$ 3	tensión antisimétrica CH <sub>2</sub>	$\nu_{as}$ (CH <sub>2</sub> )
2873 $\pm$ 1	tensión simétrica CH <sub>3</sub>	$\nu_s$ (CH <sub>3</sub> )
2851 $\pm$ 2	tensión simétrica CH <sub>2</sub>	$\nu_s$ (CH <sub>2</sub> )
1473 $\pm$ 1	flexión CH <sub>2</sub> en tijera ("scissoring") (triclinica)	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
1468 $\pm$ 1	flexión CH <sub>2</sub> en tijera (hexagonal)	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
1472 $\pm$ 1	flexión CH <sub>2</sub> en tijera (ortorrómbica)	$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
1463 $\pm$ 1		
1460 $\pm$ 5	flexión asimétrica CH <sub>3</sub>	$\delta_{as}$ (CH <sub>3</sub> )
1378 $\pm$ 1	flexión simétrica CH <sub>3</sub>	$\delta_s$ (CH <sub>3</sub> )
1385 $\pm$ 1	flexión simétrica de isopropilo	$\delta_s$ ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH)
1365 $\pm$ 1		
1343 $\pm$ 2	flexión de torsión ("wagging") CH <sub>2</sub>	$\omega$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
720 $\pm$ 1	flexión de balanceo ("rocking") CH <sub>2</sub> (hexag.)	$\gamma$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
730 $\pm$ 1	flexión de balanceo CH <sub>2</sub> (ortorrómbica)	$\gamma$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>
720 $\pm$ 1		
718 $\pm$ 1	flexión de balanceo CH <sub>2</sub> (triclinica)	$\gamma$ (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>



Fase desberdinak ikusiko ditugu. Gainera, amida I eta amida II ere ikusiko dira.

## 5. IR: Azido nukleikoak

Azido nukleikoetan amida I eta amida II bandak ikusteko aukera izango dugu.  $\beta$ -orrietan beti izango ditugu bi amida I banda,  $\alpha$ -helizeetan berriz bakarra.

### Azido nukleikoen konformazioa

- 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ -ean lotura bikoitzak aztertu daitezke.
- 1500-1250  $\text{cm}^{-1}$ -ean lotura glikosidikoaren tortsioa.
- 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$ -ean azukreak eta fosfatoak.
- <100  $\text{cm}^{-1}$ -ean fosfodiester loturak.
- Fosfato taldeen tentsioak (1200-1250  $\text{cm}^{-1}$ -ean). DNAREN konformazio ezberdinen indikatzaile ona (A, B eta Z konformazioak).

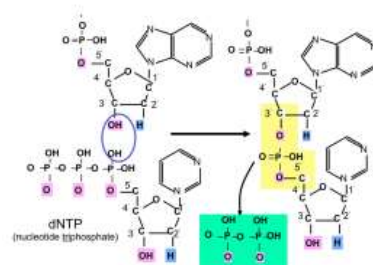


Table 7.8 Major infrared bands of nucleic acids [30]

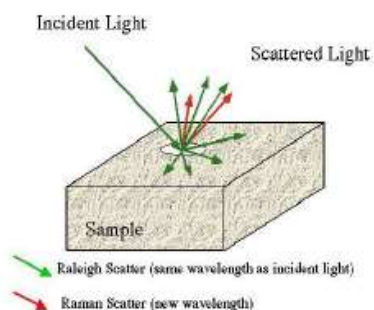
Wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )	Assignment
2960–2850	$\text{CH}_2$ stretching
1705–1690	RNA C=O stretching
1660–1655	DNA C=O stretching; N–H bending; RNA C=O stretching
1610	C=C imidazole ring stretching
1578	C=N imidazole ring stretching
1244	RNA $\text{PO}_2^-$ asymmetric stretching
1230	DNA $\text{PO}_2^-$ asymmetric stretching
1218	RNA C–H ring bending
1160, 1120	RNA ribose C–O stretching
1089	DNA $\text{PO}_2^-$ symmetric stretching
1084	RNA $\text{PO}_2^-$ symmetric stretching
1060, 1050	Ribose C–O stretching
1038	RNA ribose C–O stretching
1015	DNA ribose C–O stretching
996	RNA uracil ring stretching; uracil ring bending
970, 916	DNA ribose–phosphate skeletal motions

Generalized 2D correlation analysis: korrelazio bat burutzen da denborarekin zein aldaketa gertatu diren ikusiz, korrelazioa egingo dugu banda eta denboraren artean. Banden intentsitatea handiagoa denean kolore gorria ikusiko dugu, korrelazio oso ona. Zelula kultiboan bidez analisiak zeluletan egin daitezke. Azkenik, esan bezala emaitzak korrelazioetan oinarritzen dira, horrela perturbazioa izan eta gero zer gertatu den molekuletan aztertzen dugu.

## Raman espektroskopia

### 1. Sarrera

Trantsizio bibrazionalak ikertzeko metodo osagarri bat da. Infragorrian ez bezala (absortzioa) Raman espektroskopia dispersioan oinarritzen da. Bi dispersio mota ematen dira: elastikoa (Rayleigh scatter) eta inelastikoa (Raman scatter). Raman fenomenoan dispersioarekin batera bibrazio bat emango da. Dispersatutako fotoiaren energia normalean argi intzidentearena baino txikiagoa izaten da; kasu gutxi batzuetan handiagoa izanik.



## 2. Oinarria

Lagina argi izpi batekin kitzikatzen da eta dispersioa gertatzen denean Raman edo Rayleigh efektua gertatuko da. Rayleigh dispersioa gertatzen da dispersatutako uhinaren maiztasuna irradiatutakoaren berdina berean (dispersio elastikoa). Aldiz, uhin luzera aldatzen bada Raman fenomenoa emango da, dispersio inelastikoa. Hauen artean bi mota bereizten dira:

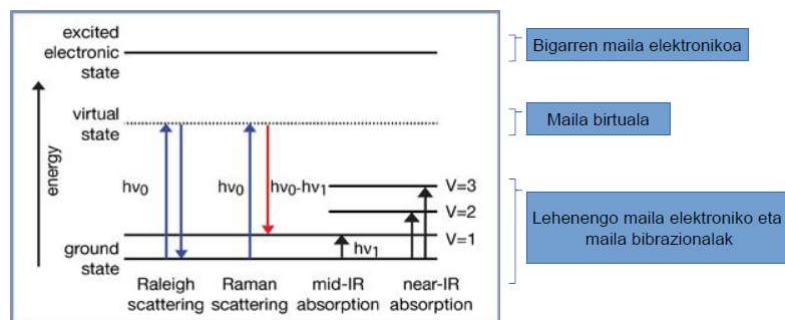
- Stokes: dispersatutako erradiazioak maiztasun txikiagoa duenean, energia txikiagoa. Hau da ohikoena.
- Anti-Stokes: dispersatutako erradiazioak maiztasun handiagoa duenean. Oso gutxitan ematen da bigarren hau.

### Maila energetiko birtualak

Infragorrian elektroiek jasaten duten egoera aldaketa zuzena eta diskretua da orokorrean.  $V_0$ -tik  $V_1$  maila bibrazionalera aldatzen dira kitzikatu ondoren.

Ramanen, ordea mailen aldaketa ez da diskretua eta elektroiak maila bibrazionalak baino egoera energetiko handiago batera kitzikatzen dira. Hala ere, ez dira hurrengo maila elektronikora iristen, erdiko puntu batean geratzen dira, eta hauei maila energetiko birtualak deritze.

Gu maila bibrazional hutsean gaude. Molekula kitzikatzean ez da maila elektronikoa aldatzera heltzen, tarteko maila energetiko birtual batean geratzen da. Erlaxatzean maila bibrazional hutsera bueltatzen badira Rayleigh fenomenoa ematen da, dispersio elastikoa. Aldiz, beste maila bibrazional batera bueltatzen baldin bada dispersio inelastikoa izango dugu, Raman fenomenoa.

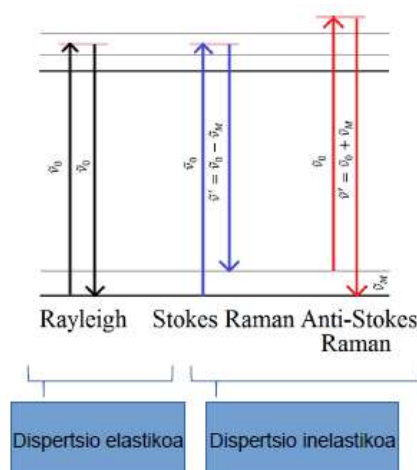


Maila energetiko birtuala ez da benetako maila energetikoa. Elektroien lainoen distortsioa eta fotoiak elektroiekin duen elkarrekintzarengatik ematen dira (Feynman diagrama). Infragorrian dipolo bat sortzea behar badugu ere, kasu honetan ez da horrela gertatzen. Egoera honetan elektroien lainoak fotoiarekin duen elkarrekintzarengatik deformazio bat izango du eta hau gertatzean dispersio efektuak gertatzen dira.

Ez da egonkorra, elektroiak azkar erlaxatzen dira energia azkar askatuz. Normalean ez dugu lanpara bat erabiliko Ramanen, laser bat erabiliko dugu, uhin zenbaki konkretu bat izango duena (energia konkretua aplikatuz). Horregatik, egoera birtualaren energia maila erradiazio elektromagnetiko intzidentearen energiaren menpekoa da (laserraren arabera).

### Stokes eta Anti-Stokes

- Stokes: elektroiak oinarritzko egoera bibrazionalean daude eta kitzikatu ondoren lehenengo maila bibrazionalera erlaxatuko dira. Askatutako erradiazioaren maiztasuna txikiagoa izango da. Beraz, uhin luzera handiagoa izango du.
- Anti-Stokes: hasieran elektroia ez dago oinarritzko maila bibrazionalean. Kitzikatu ostean oinarritzko mailara jaitsiko da, askatutako erradiazioaren maiztasuna handiagoa izanik. Hau da uhin luzera txikiagoa izango du.



Lagineria iristen diren fotoietatik gutxi batzuk bakarrik jasango dute dispertsioa, normalean xurgapena emango baita.

Rayleigh fenomeno bakarra ematen da 10.000-tik eta Raman, aldiz, bakarra 10.000.000-tik.

### 3. Hautaketa arauak

#### Polarizabilitatea

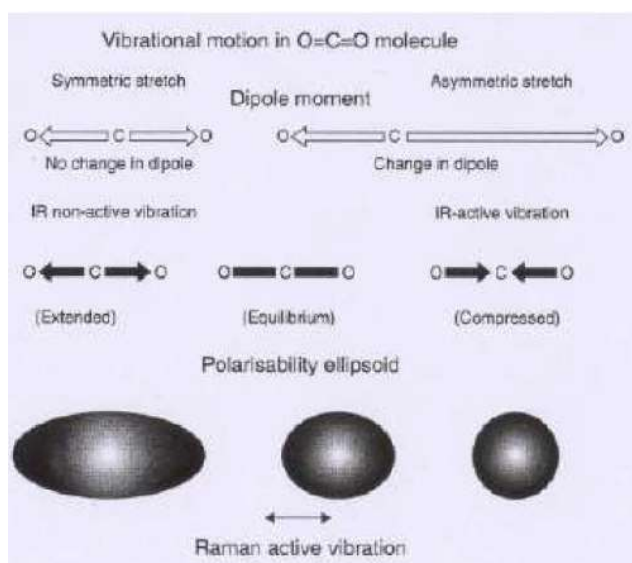
Molekula edo atomo batek eremu elektriko baten eraginpean elektroia lainoa deformatzeko duen ahalmena da polarizabilitatea. Dispertsioa ez da dipoloarekin erlazionatzen, baizik eta polarizabilitatearekin. Honen ondorioz erradiazio elektromagnetikoaren dispertsioa ematen da. Molekula simetrikoak edo diatomikoak adibidez, infragorrian ez dira aktibo. Ramanen, ordea, bai izan dezakegu bibrazioaren adierazpena.

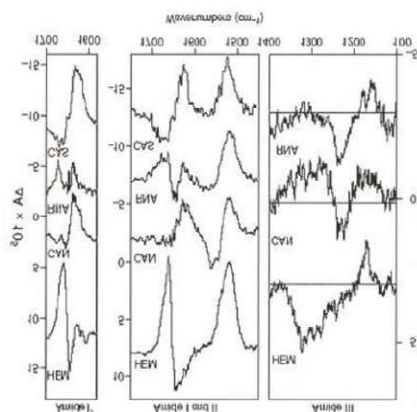
Molekularen polarizabilitatea handiagoa bada aktiboagoa izango da.

*Adibidez:*

Nitrogeno diatomikoaren bibrazioa ez genuke ikusiko infragorrian, dipoloaren aldaketarik ez baitu eragiten, baina loturaren polarizabilitatean aldaketak ematen direnez (lainoen deformazioa ematen da) Ramanen aktiboa da.

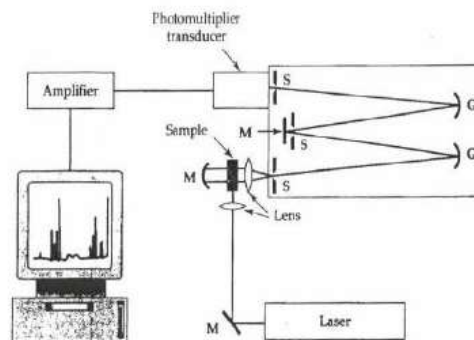
CO<sub>2</sub>-ren kasuan dipoloaren aldaketa ezberdinak izan ditzake eta beraz infragorrian aktiboa izango da. Baina karbonilo loturaren luzapena ematen denean polazirabilitatearen aldaketak ematen dira, beste loturaren luzapenaren aldaketarekin baliogabetuz.





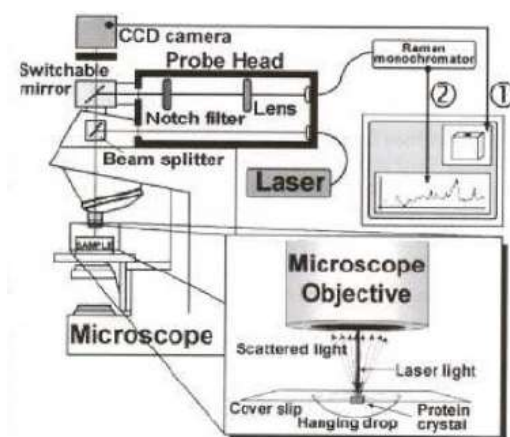
## 6. Instrumentazioa

Espektrofotometro bereziak erabiltzen dira. Iturria eta detektagailuaren artean  $90^\circ$  daude. Zuzen kokatzen badira ( $0^\circ$ -tara) igorritako erradiazioa detektagailura iritsiko da. Lanpara kasu honetan laser bat izango da. Molekulan fluoroforo bat badugu, igorritako seinalea ekidin behar da. Beraz erabiliko den laserrak fluoroforoa kitzikatzea saihestu beharko da. Hau da, erabiliko dugun laserrak gure fluoroforoa kitzikatzen ez den uhin zenbaki batekoa izango da.



### Raman mikroskopiaok

Laserra laginera iritsi, dispersioa eman eta ordenagailuz espektroa lortuko da.



## 7. Aplikazioak

1. Informazio kualitatiboa
  - a. Infragorrian aztertzen ez diren talde funtzionalen azterketa
  - b. Lagin urtsuen azterketa
  - c. Lagin mota askotarako erabilgarria: organikoak, inorganikoak eta biologikoak
2. Analisi kuantitatiboa
  - a. Infragorrian baino errazagoa, banda gutxiago dugulako
  - b. Fluoreszentziarekin arazoa egon daiteke (laserra aukeratzeko kontuan hartu beharrekoa)
  - c. Seinalea ahula izaten da askotan

### 1. Raman vs IR

- Raman espektroak IR espektroak baino sinpleagoak dira.
- Raman eta IR espektroetan seinale esanguratsuak ez dira berdinak: metodo osagarriak dira.
- Uraren eragina txikiagoa da honetan (interferentzia txikiagoa).
- Linealki polarizatutako erradiazioa erabiltze da: laserrak.

- Raman eta ir teknikak osagarriak kontsideratzen dira.
- IR-n beharrezkoa da dipoloaren aldaketa bat ematea; Ramanen, aldiz, polarizabilitatean aldaketa bat eman behar da.

#### Raman abantailak

- Disolbatzailearen interferentzia asko ekiditen ditu.
- Banden selektibitate altuagoa, banda estuagoak.
- IR-n aktiboak ez diren modu bibrazionalak detekta daitezke.

#### Desabantailak:

- Raman-en fluoreszentzia arazoak egon daitezke.
- Banden intentsitatea txikia eta Rayleigh agertzen da beti.
- Ramanerako aparatuak garestiagoak izaten dira.
- Espektroak IR-n metro tarte zabala batetan zehar ematen da, Ramanen tartean nm batzutakoa izaten da (20-50 nm).

➔ Ondorioa: bi teknikak osagarriak direla