

**Új nyomás kalibráns tesztelése nagy nyomású gyémántcellás
infravörös spektroszkópai mérésekhez.**

OTDK dolgozat

**Oláh Tamás István
Fizika Msc. I évfolyam**

Témavezető:

**Dr. Smeller László
Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet**

Budapest 2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
1.1. A nagy nyomás.....	2
1.1.1. A nagy nyomás előállítása.....	3
1.1.2. A nagy nyomás a biofizikai mérésekben.....	4
1.2. Az infravörös spektroszkópia.....	5
1.3. A fluoreszcens spektroszkópia.....	6
1.4. A polietilén.....	7
1.5A spektroszkópiában alkalmazott csúcspozíció-meghatározás pontossága.....	8
1.5.1 A csúcspozíció statisztikus hibája	9
1.5.2 A statisztikus hiba emissziós spektroszkópia esetén	9
1.5.3 A statisztikus hiba abszorpciós spektroszkópia esetén	10
2. Célkitűzések.....	10
3. Eredmények	11
3.1 Miért merült fel egy új nyomás kalibráns bevezetésének lehetősége?	11
3.2 A polietilén infravörös spektruma.....	12
3.3 A polietilén csúcsainak viselkedése nyomás függvényében.....	13
3.4 A 731cm^{-1} -nél található csúcs különböző típusú fóliák esetén.....	16
3.5 Az Alufix LDPE polietilén fólia nyomáskalibrációja	20
3.6 A kalibrált csúcs eltolódásának vizsgálata a nyomáscsökkentés hatására.....	25
3.7 A nyomáskalibráció pontossága.....	27
3.8 Összefoglalás.....	28
4. Köszönetnyilvánítás.....	28
5. Hivatkozások.....	29
1. Függelék.....	30

1.Bevezetés

A TDK dolgozatomban a polietilén fóliákon végzett kísérleteimet fogom bemutatni, amelyek alapján megállapítottam, hogy a polietilén fólia alkalmas egy új nyomás–kalibráns szerepére. Kísérleteimben meghatároztam a kalibrációs görbét, valamint elemeztem a polietilénnel végzett nyomásmérés pontosságát, ill. a hőmérséklet hatását.

A Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében végzett méréseim során merült fel igény egy új nyomásdetektálásra alkalmas anyag használatára. Az általam vizsgált poliglutaminsav mintákon való mérések során kiderült, hogy a nyomás meghatározásához eddig használt BaSO_4 nem minden esetben alkalmazható a nyomás meghatározásához infravörös spektroszkópiai mérések esetén. Így találnunk kellett helyette egy másik anyagot melynek segítségével a mérés elvégezhető. A belső kalibránsként használt anyag nem lehet vízzoldékony, nem szabad kémiai reakcióba lépnie a vizsgálandó mintával és a spektrumában található abszorpciós sávoknak nem szabad átfednie a vizsgálandó minta sávjaival. Az általunk nyomás meghatározására használt polietilén, mint látni fogjuk egy lehetséges alternatíva az eddig használt bárium szulfát helyett a nagy nyomás alatt végzett infravörös spektroszkópiai méréseknél, sőt a fólia használata lényegesen lerövidíti a minta előkészítést. A kalibrációhoz kétféle mérést végeztem, az infravörös spektroszkópiában használatos bárium szulfátot és a nagyobb mólra visszatekintő fluoreszcens méréseknél használt rubint is felhasználtam. A dolgozat első felében ismertetem röviden a nagy nyomás előállítására használt módszereket és a mérések során használt eszközöket. Ezenkívül kitérnék röviden a nagynyomású infravörös spektroszkópiai mérésekre a biofizikában, mivel ezek kapcsán merült fel a probléma és a polietilénnek az alkalmazhatóságát is elsősorban ezekhez a mérésekhez vizsgáltam. A dolgozat második felében ismertetem az eredményeimet.

1.1 A nagy nyomás

A nyomás egy igen fontos termodinamikai paraméter. A nagy nyomás hatására az anyagok fizikai tulajdonságai megváltozhatnak, és szerkezeti átalakulások is végbemehetnek. A nyomás függvényében végzett kísérletek során fontos szerkezeti információkhoz juthatunk. Nagy nyomás alatt a fizikában a 100MPa-t meghaladó nyomásokat értik. Speciális technikákkal akár 100 GPa is elérhető. (A nagy nyomás alatt 100 MPa - 1,5 GPa tartományt fogom érteni a továbbiakban.)

A hétköznapi életünk során általában normál légköri nyomással találkozunk, azonban léteznek olyan helyek a bolygónkon ahol az általunk megszokottól lényegesen eltérő körülmények között is van élet az óceánok mélyén, ahol a nyomás eléri a légköri nyomás több százszorosát is.

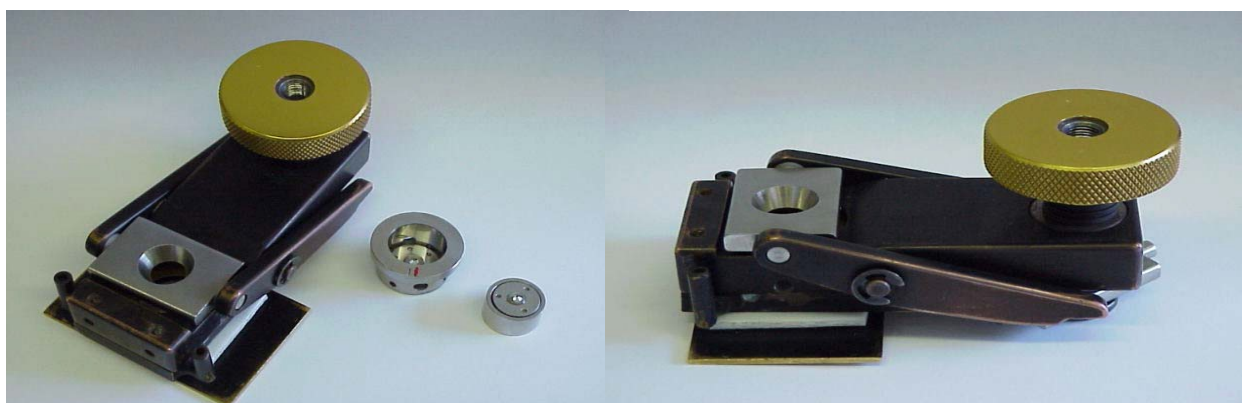
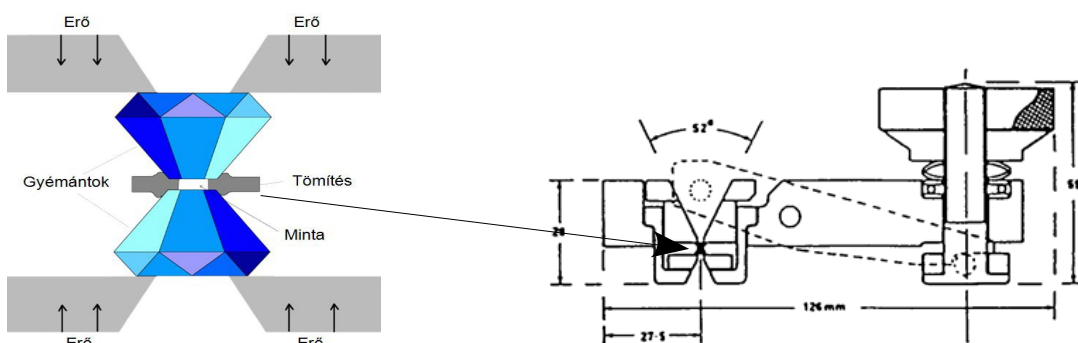
A nagy nyomást az ipar számos területén is alkalmazzák, egyik ilyen fontos alkalmazása a gázok cseppfolyósítása, melyre külön üzemeket építettek. A 90-es évektől Japánban kezdték a nagy nyomást az ételek tartósítására és sterilizálására is alkalmazni, azóta már több kontinensen is kaphatóak ilyen módon kezelt élelmiszerek. A berendezésekben 700 MPa nyomásnak vetik alá az ételeket 5-10 percig. A nagy nyomás a hőkezeléshez hasonlóan az élelmiszerben található kórokozókat elpusztíthatja. A hőkezeléssel szemben ennek a technikának előnye, hogy kevésbé károsítja az ételt így az frissebb és egészségesebb marad, mint a hőkezelt vagy vegyszerekkel kezelt ételek. Az így tartósított ételeknek nincsenek káros mellékhatásai.



1. ábra nagy nyomással kezelt élelmiszerek

1.1.1 A nagy nyomás előállítása

Az alapkutatásban a nagy nyomás előállításának két elterjedt technikája van. Az egyik egy vastag falú mérőcella (néhány ml térfogatú). Ezt a cellát zafir ablakkal szokták ellátni. Ilyen cellával általában 600 MPa-ig lehet felmenni. A másik módszer, amelyet a méréseim során használtam a gyémántcellás nyomásmérés DAC (Diamond Anvil Cell), amivel akár 100 GPa nyomás is elérhető.



2. ábra A Diacell gyártmányú gyémántcella és felépítése

A mintát két oldalról gyémánt veszi körül. A gyémántok között egy rozsdamentes vékony acéllemez található, aminek a közepén 0,5mm lyuk található. Az acéllemez tömítésre szolgál, illetve megakadályozza, hogy a gyémántok közvetlenül érintkezzenek. A minta az acéllemezbe fűrt kis lyukban helyezkedik el, így a nyomást körülbelül 50 nl-es térfogatban állítjuk elő. A nyomás a két gyémántra kifejtett nyomóerővel változtatható. A gyémánt átlátszóságát kihasználva optikai méréseket végezhetünk. A nyomás meghatározása a mintatérbe helyezett belső kalibráns segítségével történik, oly módon, hogy nyomon követjük ennek egy nyomásérzékeny spektrumvonalának az eltolódását.

1.1.2 A nagy nyomás a biofizikai mérésekben

A biológiai rendszerekben a folyamatok általában nagy nyomáson és állandó hőmérsékleten zajlanak le. Ennek ellenére számos értékes információhoz juthatunk azáltal, hogy a kísérletek során ezen paramétereket változtatva vizsgáljuk a rendszerek viselkedését. A legelső publikáció amely a nagy nyomásnak a fehérjékre hatására történő hatásával foglalkozott (Brigdmann) 1914-ben jelent meg. Ezután hosszú időnek kellett eltelnie mire újra előtérbe került a kutatás. A nagy nyomásnak a fehérjékre kifejtett hatását szélesebb körben a 90-es évektől vizsgálják.

Nagy nyomás hatása kémiai folyamatokra és azok egyensúlyára

A nyomás hatását a kétállapotú rendszereken mutatom be. A nyomás hatására az ilyen rendszerek a Le Chatelier-Braun elvet követve igyekeznek a kisebb térfogatú állapotukat felvenni. Vegyünk egy egyensúlyra vezető reakciót, amely a K egyensúlyi állandóval jellemezhető. Ekkor:

$$\left(\frac{\partial \Delta G}{\partial p}\right)_T = -RT \ln\left(\frac{\partial \ln K}{\partial p}\right)_T = \Delta V \quad (1)$$

ahol ΔV a rendszer térfogatváltozása a reakció során 1 mól anyagra. Ha ΔV nyomástól való függése elhanyagolható, akkor:

$$\ln K = \frac{-p \Delta V}{\Delta T} + konst \quad (2)$$

A biológiai rendszerekben végbemenő enzimatis reakciók esetén a reakció során gyakran található egy aktivált állapot amelyen a reakció folyamán áthaladunk. Ennek a kezdeti állapothoz viszonyított energiája az aktivációs energia E_a az aktivációs térfogat V_a a kezdeti állapothoz viszonyított térfogatváltozás. Így a (2) egyenlethez hasonló összefüggés írható fel reakciósebesség és az aktivációs térfogat között:

$$\ln\left(\frac{k}{k_0}\right) = \frac{-p \Delta V_a}{RT} + konst \quad (3)$$

ahol k , illetve k_0 a *kiindulási állapot* $\rightarrow$ *átmeneti komplex* folyamat sebességi állandója p , illetve p_0 nyomáson. Az $\ln K$ -t, ill. az $\ln k$ -t állandó hőmérsékleten a nyomás függvényében ábrázolva a meredekségből megkaphatjuk a reakció során fellépő térfogatváltozást, ill. az aktivációs térfogatot.

A nagy nyomás hatása a fehérjékre

A fehérjék esetén kétfajta folyamatot kell szemügyre vennünk, amelyeknek a nyomásfüggése érdekes lehet. Az egyik csoportba a fehérje, vagy fehérje aggregátumok olyan konformáció-változása tartozik, amelynek során a rendszer összterfogata megváltozik. A fehérjék denaturációja, azaz a polipeptidlánc széttekeredése során a szerkezetet stabilizáló hidrogénhid kötések

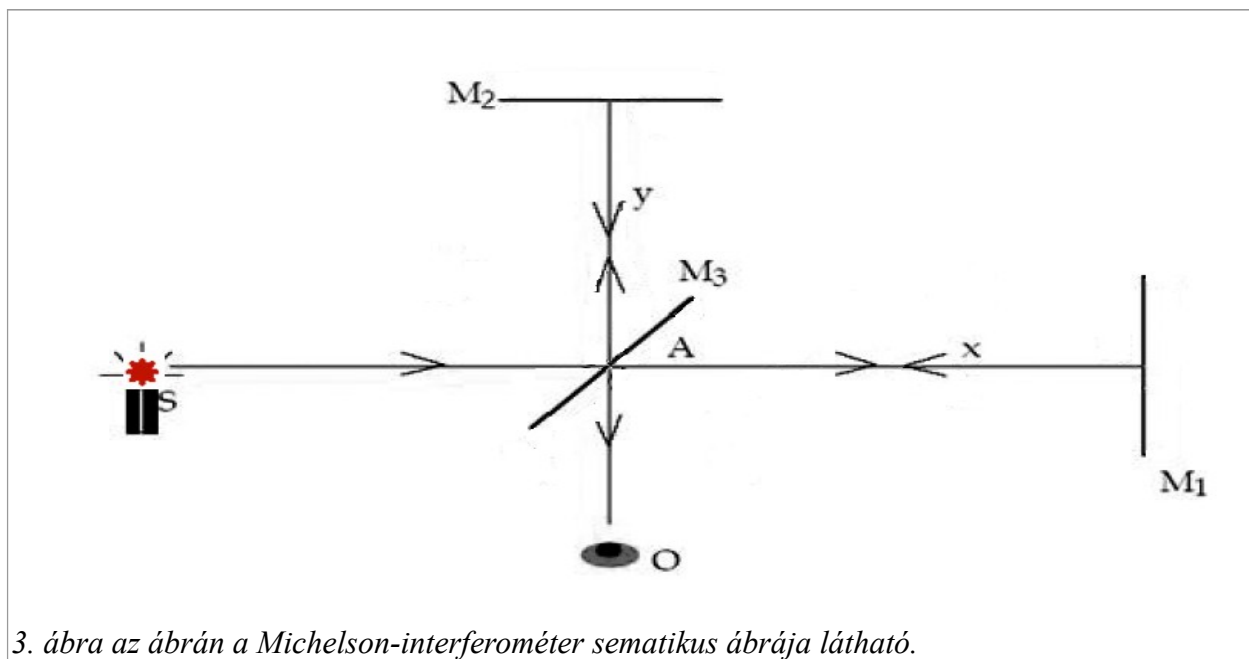
felszakadnak, helyettük fehérje-víz hidrogénhidak jönnek létre. A fehérje kevésbé kompakt szerkezetet vesz fel, aminek következtében annak felülete megnő. A fehérjékhez köthető másik típusú folyamat, amelynek nagy nyomás alatti tanulmányozása érdekes lehet maga az enzimműködés. Annak a kémiai folyamatnak a tanulmányozása, amelyet a fehérje katalizál. Ebben az esetben a reakció aktivációs térfogatát és reakció-térfogatát kapjuk meg a nyomás függvényében végzett mérések és az előzőekben említett termodinamikai összefüggések felhasználásával. Ehhez az egyensúlyi reakcióállandót, illetve a folyamat kinetikáját kell mérnünk a nyomás függvényében. Az aktivációs, illetve a reakció-térfogat útmutatást adhat a reakció mechanizmusát illetően. A külső nyomás az enzimfehérjék működését és az enzimkinetikát abban a nyomástartományban is befolyásolja, ahol a fehérje még nem denaturálódik. Ezáltal a fiziológias körülmények között lezajló folyamatokról is lényeges információkat szerezhetünk.

1.2 Az infravörös spektroszkópia

Az elektromágneses sugárzásnak a 800 nm és 1 mm közé eső hullámhosszúságú tartományba eső részét infravörös fénynek nevezzük. Spektroszkópiai szempontból az infravörös tartományt három részre szokták bontani közeli 0,8 μm -2,5 μm , közép 2,5 μm -25 μm , távoli 25 μm -1000 μm tartományra. Infravörös sugárzással gerjeszthetők a molekulák rezgési és rotációs nívói közti átmenetek. A rezgési spektroszkópiában a hullámhossz helyett annak reciprokát a hullámszámot (ν) használják. Az általunk használt közép infravörös tartománynak a 400cm^{-1} - 4000cm^{-1} tartomány felel meg

Az infravörös gerjesztés hatására az elektronszerkezet nem változik. Azok a molekularezgések amelyek során a molekula dipólusmomentuma megváltozik, gerjeszthetők az infravörös sugárzással. Gerjesztéskor a gerjesztő sugárzás energiája megegyezik a végső és a kiindulási állapotok energiáinak a különbségével. $hf = |E_v - E_k|$ Az átmenet során a rezgési kvantumszám $n \pm 1$ -et változik. A rezgés nagyon érzékeny a rezgésben részt vevő atomokat összekötő kémiai kötések erősségére, illetve a molekula szerkezetére.

A mérések során BRUKER VERTEX 80V FTIR spektrométert használtam. A detektor folyékony nitrogén hűtésű MCT (HgCdTe) detektor. A készülék egy nagy felbontású Fourier transzformációs spektrométer. A spektrométer alapja egy Michelson interferométer.



3. ábra az ábrán a Michelson-interferométer sematikus ábrája látható.

Az M3 féligáteresztő tükör a beérkező nyalábot kettéosztja. A kettéosztott nyaláb az M1 és M2 tükrökről visszaverődve ismét találkozik és interferencia jön létre. A detektorba beérkező nyaláb a két úton haladó nyaláb összege.

$$\Phi(t) = \Phi_0 e^{i(\omega t - kd_1)} + \Phi_0 e^{i(\omega t - kd_2)} \quad (4)$$

Az egyszerűség kedvéért feltettem, hogy a két hullám amplitúdója megegyezik és $x=d_1-d_2$. Ahol d_1 és d_2 a két ágon megtett út. Ekkor a mért intenzitás.

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} B(v) \cos(v(x)) dx \quad (5)$$

Az intenzitásból inverz Fourier transzformációval megkapható hullámszám függvényében a spektrum.

$$B(v) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} I(x) e^{-ivx} dx \quad (6)$$

A valóságban az M1 mozgatható tükör elmozdulása véges, ezért csak -L-től L-ig integrálunk. A spektrumot egyéb hatások is torzíthatják pl az apertúrák. A mért spektrum

$$B_m(v) = B(v) F(v) \quad (7)$$

$F(v)$ az átviteli függvény Fourier transzformáltja és a mérő berendezésre jellemző. Az abszorpciós spektroszkópiában a minta elnyelését az abszorbanciával jellemezzük, ami a következőképpen van definiálva:

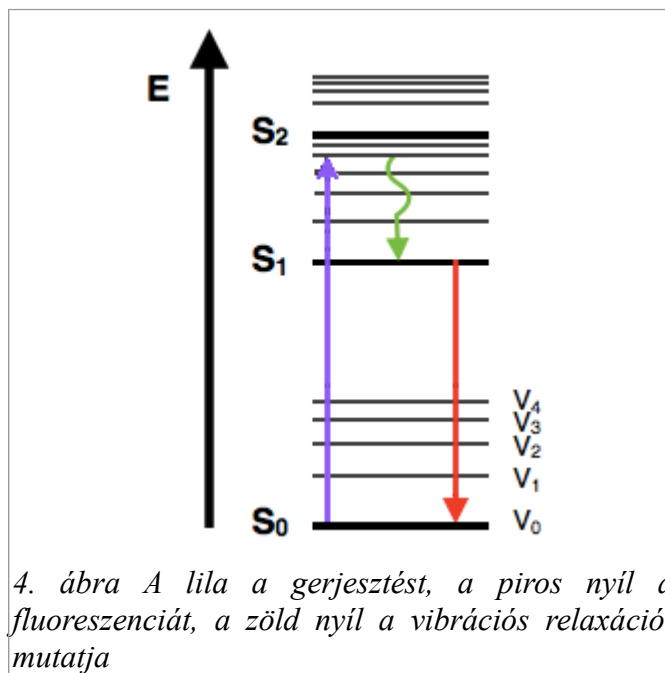
$$A(v) = \lg\left(\frac{I_0(v)}{I(v)}\right) \quad (8)$$

$I_0(v)$ a minta nélkül mért intenzitás.

Az infravörös spektroszkópia segítségével nem csak ujjlenyomatszerűen azonosíthatjuk a mintákat, hanem az előző pontban tárgyalt szerkezeti változásokról is információkhoz juthatunk a fehérjékkel kapcsolatban. A fehérjék másodlagos szerkezetének változása a hidrogénhidak felszakadása, a fehérje le és felgombolyodása a spektruma alapján jól nyomon követhető.

1.3 A fluoreszcens spektroszkópia

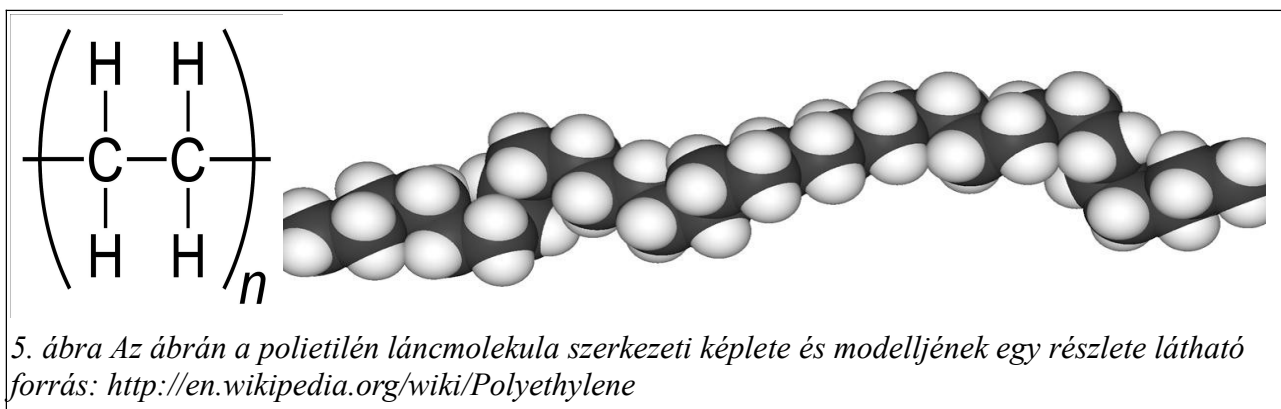
A fluoreszcens spektroszkópiai méréseknél az infravörössel szemben mindig elektron átment is történik. Itt az elektromágneses sugárzással felgerjesztett minta által kibocsátott sugárzást detektáljuk, ebben az esetben emissziós spektrumot mérünk. A molekulában a gerjesztő fény hatására többféle folyamat játszódhat le, melyeket a Jablonski diagramon szemléltetnek (4.ábra). A sugárzásos átmeneteket az egyenes nyilak jelölik, a sugárzás nélkülieket hullámos nyilak. A gerjesztő foton elnyelése után a molekula az S_0 alapállapotból egy magasabb energiájú állapotba juthat, általában az S_1 valamelyik magasabb vibrációs szintjére ahonnan vibrációs relaxációval S_1 alapállapotába jut. S_1 alapállapotból egy kibocsátott fotonnal ismét S_0 nivójára kerül, ahonnan vibrációs relaxációval visszakerülhet az S_0 alapállapotába. A kibocsátott foton energiája alacsonyabb, mint a gerjesztő fotoné.



1.4 A polietilén

A polietilén az egyik legszélesebb körben használt műanyag, éves termelése sok millió tonna. A polietilén az etilénmolekulából (C_2H_4) polimerizáció során keletkezik általában valamilyen katalizátor anyag hozzáadásával, amilyen pl a Ziegler- Natta katalizátor. A polietilénből készült termékeket több kategóriába szokás sorolni tulajdonságaik alapján.

- **UHMWPE** (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) A sűrűsége $0,930-0,935 \frac{g}{cm^3}$. Ez egy kemény anyag és a kémiailag is igen ellenálló. Sok helyen alkalmazzák, készítenek belőle orvosi implantátumokat és golyóálló mellényt is.
- **HDPE** (High Density Polyethylene) sűrűsége legalább $0,941 \frac{g}{cm^3}$. A HDPE-ben kevesebb az elágazás, így erősebb intermolekuláris kölcsönhatások tudnak létrejönni, a szakítószilárdsága magasabb. Az olvadáspontja $120-130^\circ C$.
- **MDPE** (Middle Density Polyethylene) sűrűsége $0,926 \frac{g}{cm^3}$ és $0,940 \frac{g}{cm^3}$ közötti. A HDPE-hez hasonló módon ezt a polietilént is króm/szilícium-dioxid, Ziegler-Natta vagy metallocén katalizátorokkal szokták előállítani. A HDPE-nél ütésállóbb és kevésbé repedezik.
- **LDPE** (Low Density Polyethylene) sűrűsége $0,910 \frac{g}{cm^3}$ és $0,940 \frac{g}{cm^3}$ közé esik. Az LDPE-nél a polimer láncoknak magas az elágazottsága, ennek köszönhetően az intermolekuláris kölcsönhatások gyengébbek, leginkább csak pillanatnyi dipól vagy indukált dipól kölcsönhatások jelentkeznek. Ez okozza, hogy az LDPE-nek kisebb a szakítószilárdsága, viszont a hajlékonysága magasabb. Az olvadáspontja $105-115^\circ C$. Leggyakrabban műanyagzacskókat készítenek belőle.



A polietilén szerkezetében találhatóak kristályos monoklin és rombos tartományok, illetve köztes amorf tartományok is, melyek aránya az előállításra használt technológiától függ. A polietilénláncnak 14 rezgési módusa van ezek közül 5 infravörös aktív. A szerkezethez köthető rezgések a spektrumban 3 helyen jelennek meg a 720 cm^{-1} és 731 cm^{-1} -nél lévő hintázó rezgés, 1463 cm^{-1} -nél és 1473 cm^{-1} -nél ollózó rezgés és a 1176 cm^{-1} -nél lévő himbáló rezgésnek megfelelő csúcs. A nagy nyomás hatására a polietilénben fázisátalakulások történnek pl. 6 GPa környékén az ortorombos monoklin P2m fázisátmenet. [Luca Fontana és mtsai 2010]. A számomra érdekes tartományon, ahol a fehérjék vizes oldatait vizsgálni lehet, 1GPa alatt ezek az átalakulási folyamatok még nem játszódnak le.

1.5 A spektroszkópiában alkalmazott csúcspozíció-meghatározás pontossága

A spektroszkópiában a csúcspozíció meghatározására a Shavitzky-Golay módszert alkalmazzák.[5] A módszer lényege, hogy a spektrális csúcs közelében a mérési pontokra polinomot illesztünk, majd a polinom együtthatóinak felhasználásával számoljuk ki a maximum helyét. Legyenek x_i, y_i ($i=0,1,2, \dots, n$) a mért spektrum pontjai. A módszer azon alapul, hogy amennyiben az x_i -k egymáshoz képest azonos távolságra helyezkednek el, akkor az illesztett polinom együtthatói a spektrum y értékeinek lineáris kombinációjaként fejezhetőek ki. Az illesztett m -ed fokú polinom n -edik ($n=0,1..m$) együtthatója az alábbiak szerint írható fel:

$$a_{m,n} = \frac{1}{C_{m,n}} \sum_{i=-k}^k c_{m,n,i} y_{i+i_0} \quad (9)$$

ahol $C_{m,n}$ egy normálási tényező, a $c_{m,n,i}$ -k pedig súlyfaktorok. Ezzel az összefüggéssel az x_0 pont környezetében lévő $2k+1$ ($2k+1 > m$) pontra illesztünk polinomot. Shavitzky és Golay megadták ezeket a $c_{m,n,i}$ ill. $C_{m,n}$ együtthatókat. Parabola illesztése esetén ($m=2$)

$$x_{cs} = x_0 + \left(i_0 - \frac{a_{2,1}}{2 a_{2,2}} \right) \quad (10)$$

egyenlet adja meg a csúcs pozícióját.

A csúcspozíció hibájának két fő oka lehet: Az egyik a mérés statisztikus hibája. Ezt a mérőkészülék zaja, vagy a mért jelenség okozza, vagy mindkettő. A másik ok lehet a polinom nem megfelelő illeszkedése a spektrumra. Zajmentes esetben sem lehet egy Gauss- vagy Lorentz-görbét polinommal tökéletesen illeszteni. Ez a csúcspozíció szisztematikus hibáját okozhatja. A tökéletlen illeszkedésből eredő hibát az illesztésben részt vevő pontok száma erőteljesen befolyásolja. Túl nagy k választása esetén az illeszkedési hiba nő, túl kicsi k esetén a statisztikus hiba lesz nagyobb. A legtöbb alkalmazás esetén nem annyira a vizsgált spektrális csúcs pozíciója maga, hanem annak eltolódása az amire kíváncsiak vagyunk. Így a szisztematikus hibának kisebb jelentősége van, hiszen, ha nem változtatjuk a k paramétert, a szisztematikus hiba sem változik.

1.5.1. A csúcspozíció statisztikus hibája

Az $a_{m,n}$ együttthatók $\sigma_{m,n}$ szórás négyzetét, a hibaterjedés szabályai szerint az illesztésben használt y_i és σ_i szórásaiból a következő egyenlettel kaphatjuk meg [6]:

$$\sigma_{m,n}^2 = \frac{1}{C_{m,n}^2} \sum_{i=-k}^k (c_{m,n,i})^2 \sigma_{i+i_0}^2 \quad (11)$$

Ha a (10)-es egyenletet használjuk a csúcspozíció kiszámolásához, akkor ennek a pozíciónak a hibája:

$$\sigma_{cs} = \sqrt{\left(\frac{\partial x_{cs}}{\partial a_{2,1}}\right)^2 \sigma_{2,1}^2 + \left(\frac{\partial x_{cs}}{\partial a_{2,2}}\right)^2 \sigma_{2,2}^2} \quad (12)$$

$$\sigma_{cs} = \frac{\Delta x}{a_{2,2}^2} \sqrt{a_{2,2}^2 \sigma_{2,1}^2 + a_{2,1}^2 \sigma_{2,2}^2} \quad (13)$$

egyenletet adja. Megjegyzendő, hogy a (13) egyenlet alapján a csúcspozíciót akár nagyobb pontossággal is meghatározhatjuk, mint a spektrum lépésköze (Δx). Ehhez azonban nagyon pontos y_i értékekkel kell rendelkezünk.

1.5.2. A statisztikus hiba emissziós spektroszkópia esetén

Itt megvan az az előnyünk, hogy a jelenség matematikailag jól leírható, hiszen fotonszámolásos detektálás esetén a Poisson-eloszlás alkalmazható. A Poisson eloszlásnál a szórásnégyzet és a várható érték megegyezik. Ha μ -t a mért y_i -vel becsüljük és (12)-t a (11) egyenletbe behelyettesítjük, akkor a

$$\sigma_{m,n}^2 = \frac{1}{C_{m,n}^2} \sum_{i=-k}^k (c_{m,n,i})^2 y_{i+i_0} \quad (14)$$

összefüggéshez jutunk. Figyeljük meg, hogy a $\sigma_{m,n}$ ugyanúgy az y_i -k lineáris kombinációjaként adódik, mint az $a_{m,n}$, csak a $\sigma_{m,n}$ esetén a lineáris kombinációban használt együttthatók négyzeteit kell alkalmazni. Ezek után a (14)-es egyenlet segítségével kapjuk a csúcspozíció hibáját.

Meg kell jegyezni, hogy az eddig számolt hiba ($\sigma_{\text{csúcspoz}}$) csak a statisztikus hiba, és bár úgy tűnhet, hogy nagyon kis hibát lehet elérni a fotonszám növelésével, ez csak látszólagos, ugyanis az illeszkedési hiba, és a mérés egyéb körülményeiből adódó hibák állandó értékűek ($\sigma_{\text{egyéb}}$). A tényleges hibába a csúcspozíció hibáján kívül az egyéb hibák is hozzájárulnak.

$$\sigma_T = \sqrt{\sigma_{cs}^2 + \sigma_{egyéb}^2} \quad (15)$$

1. 5. 3. A statisztikus hiba abszorpciós spektroszkópia esetén

Az abszorpciós spektroszkópia esetén mint tudjuk az abszorbancia

$$A = \lg \frac{I}{I_0} \quad (16)$$

Általában nem ismerjük, hogy I és I_0 milyen elosztást követ. Ezért az abszorpciós spektrumok esetén empirikusan határozzuk meg a hibát.

2. Célkitűzések

A célunk egy nagynyomású infravörös spektroszkópai mérésekhez belső kalibránsként alkalmazható anyag találása, mely helyettesítheti a már használatos bárium szulfátot. Az anyagnak a következő fontos elvárásoknak kell megfelelnie:

- rendelkeznie kell egy olyan (infravörösben aktív) vibrációs sávval, amelyik a nyomás hatására eltolódik.
- Előny viszont, ha kevés infravörös abszorpciós sávja van, azaz egyszerű molekulaszervezettel rendelkezik.
- ne legyen vízzoldékony, ne lépjen kémiai reakcióba a vizsgálandó mintákkal és nem fedjen át a spektruma sem a kísérlet szempontjából érdekes tartományokkal.

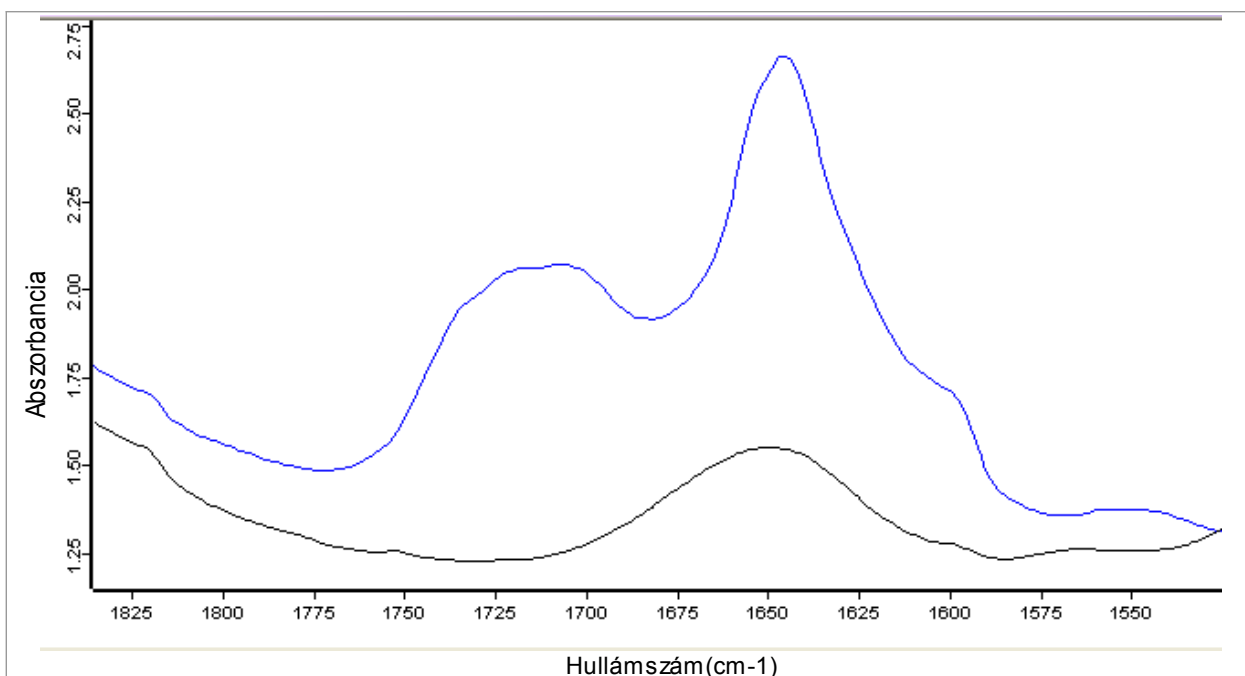
A dolgozat célja egy ilyen anyag spektroszkópai jellemzése, kalibrálása a nyomás és a hőmérséklet tekintetében, valamint az új kalibráns kalibrációs görbéjének meghatározása és a vele elérhető pontosság megadása.

3. Az eredmények bemutatása

Az ebben a fejezetben bemutatandó infravörös spektrumokat a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében készítettem egy BRUKER VERTEX 80V FTIR spektrométerrel. A spektrumok felbontása 2 cm. A jel/zaj arányt mérésenként 256 spektrum átlagolásával javítottam.

3.1 Miért merült fel egy új nyomás kalibráns bevezetésének lehetősége?

Ahogy bevezető részben is említettem, akkor merült fel a polietilén nyomásmeghatározásra alkalmazásának igénye, amikor kiderült, hogy az eddig használatos bárium szulfát nem minden esetben használható a méréseknél. Pontosabban fogalmazva, a kísérlet során kiderült, hogy a poliglutaminsav HEPES pD3-as(a pD érték a pH értékhez hasonló, a legfőbb különbség, hogy a hidrogén helyett az oldószer deutériumot tartalmaz, a használata azért szükséges, mert a fehérjék spektrumával átfed a víz spektruma.) pufferben feloldott oldatához bárium szulfátot adva a spektrumról eltűnt a poliglutaminsav jele. A bárium szulfát nélkül mérve a poliglutaminsav spektruma láthatóvá vált. Ez meglepő volt számomra mivel PD7-es értéknél nem történt semmi hasonló. Ezt a mérést csak azért említem meg, mert ennek a mérésnek az eredeti célkitűzése vagyis a poliglutaminsav szerkezetének nyomás hatására történő változásának nyomon követése a polietilénfóliával elvégezhetővé válik. A 6.ábrán látható a két esetben a poliglutaminsav, a kék színű spektrumon látható a vizsgálandó spektrum ebben az esetben a polietilénfólia van még a gyémántcellába helyezve. A fekete spektrum az előbb említett bárium szulfát hozzáadása után mért spektrum ott csak egy minimális víz látszik a poliglutaminsavnak megfelelő helyen (A minimális víz a nehézvízben lejátszódó D-H kicserélődésből származik, az ilyen méréseknél mindig jelen szokott lenni, de ideális esetben nem látszik a spektrum ezen részén, mert a fehérjétől származó jel elnyomja.). Ennek a mérésnek a további részleteit nem ismertetem, mert az nem tartozik szorosan jelen dolgozatom témájához.

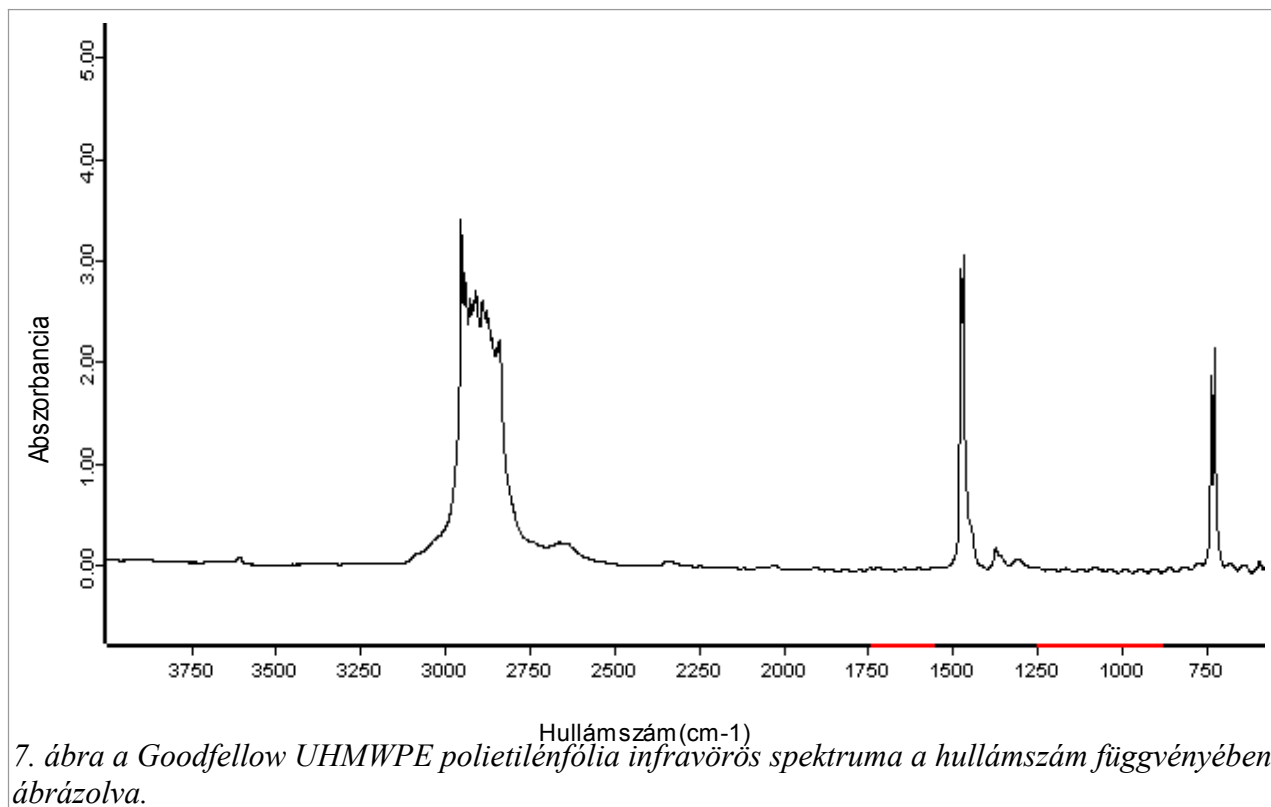


6. ábra A poliglutaminsav HEPES PD3-as pufferoldatban feloldott infravörös spektrumának egy részlete látható. A kék színű spektrum a poliglutaminsav polietilénfóliával mért spektrumát, a fekete a poliglutaminsav bárium szulfáttal mért spektrumát mutatja.

A fenti eset is mutatja, hogy a polietilén nem pusztán egy lehetséges alternatíva az eddig használt bárium szulfát helyett, hanem bizonyos esetekben nélkülözhetetlen lehet a használata a nyomás változásának nyomon követésére.

A polietilénből, mint anyagfajtából számtalan különféle típus létezik. Én ezek közül 3 fét vizsgáltam meg, a Goodfellow cég 0,075mm vastag UHMWPE fóliáját, a 0,015mm vastag LDPE fóliáját és az Alufix által gyártott 0,0125 mm vastag LDPE fóliát. Látni fogjuk, hogy lényeges különbségek lehetnek közöttük a nagy nyomás hatására történő viselkedésben.

3.2 A polietilén infravörös spektruma



A polietilén spektrumában 3 tartományon vannak olyan abszorpciós sávok, melyek a nyomás hatására eltolódhatnak. A fehérjék szempontjából fontos 1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1} -es intervallumon nincs abszorpció, így ebből a szempontból jó választás. A polietilénnek 4 számunkra érdekes nyomásérzékeny csúcsa lehet, a 720 cm^{-1} 731 cm^{-1} 1463 cm^{-1} és 1473 cm^{-1} -nél található csúcsok. A spektrumon láthatóak még a CH_2 szimmetrikus és antiszimmetrikus nyújtási módusaiból származó sávok a 2800 cm^{-1} -től 3000 cm^{-1} -ig terjedő intervallumon. Emiatt más molekulák CH_2 rezgéseinek tanulmányozása a polietilén mellett nem lehetséges. (A spektrumon látszik egy kis hullámszám az alapvonal mentén. Ez a fóliáról való visszaverődések miatt van.) Az ábrán pirossal megjelöltem két olyan tartományt mely a biológiai minták tanulmányozása szempontjából fontos. Látszik, hogy a spektrumon az 750 cm^{-1} és 1460 cm^{-1} közötti tartományon nincsenek sávok így a polietilén nem fed át a nukleinsavak szulfátrezgéseivel. Ez egy külön előny a BaSO_4 -al szemben, hogy a polietilénnel a nukleinsavak is vizsgálhatók. A másik tartományon az amid I (6.ábra) és amid II csoportrezgések tanulmányozhatóak (fehérjemolekulákhoz kapcsolódó rezgések).

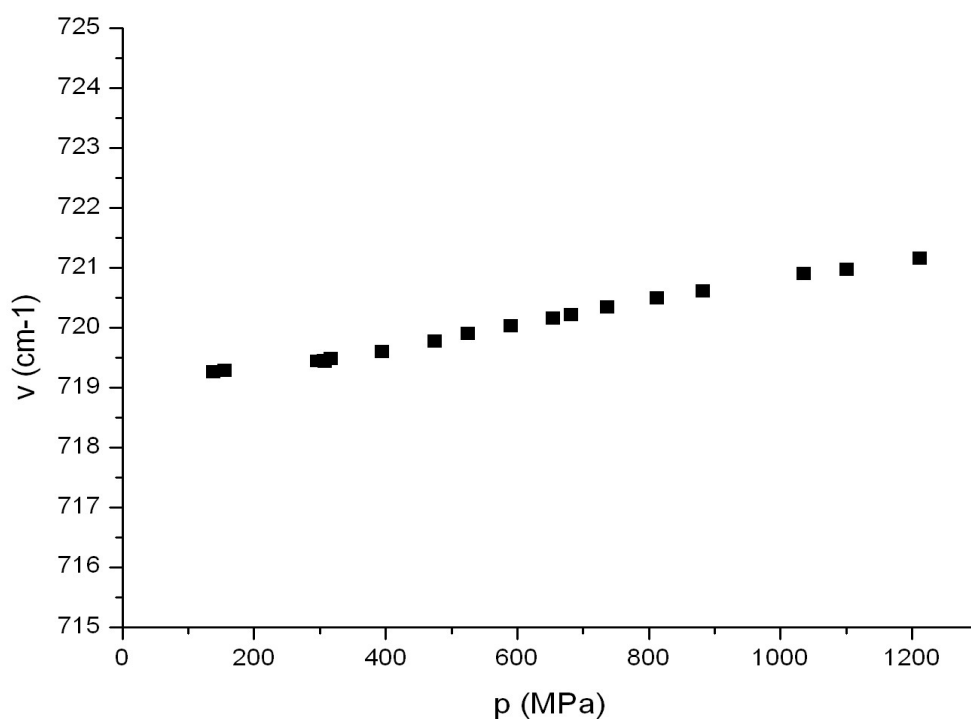
Mérésekkel ellenőrizni akartam, hogy van-e valamilyen irányfüggése a polietilénfóliának. Ezért 8 különböző helyzetben is megmértem a fólia spektrumát. A spektrométer fényútjába, a bejövő sugárzásra közel merőleges irányba, egy külön kis fémkeretre ragasztva a fólia egy darabját. Az ismételt mérésekből kiderült, hogy a csúcspozíciójának meghatározása két tizedes jegyig pontos ($0,01\text{ cm}^{-1}$) A mért adatokat táblázatba foglaltam. A spektrumokat $27,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on mértem.

	720 cm^{-1} -es csúcs	731 cm^{-1} -es csúcs	1463 cm^{-1} -as csúcs	1473 cm^{-1} -as csúcs
Mérés1	719,5470	730,3899	1462,6018	1472,77580
Mérés2	719,5499	730,3868	1462,5982	1472,77799
Mérés3	719,5482	730,3906	1462,5964	1472,77386
Mérés4	719,5501	730,3926	1462,6021	1472,77692
Mérés5	719,5474	730,3951	1462,6034	1472,77680
Mérés6	719,5482	730,3945	1462,5996	1472,78137
Mérés7	719,5509	730,3949	1462,5988	1472,77214
Mérés8	719,5484	730,3938	1462,5985	1472,77634
átlag	719,5487	730,3923	1462,5998	1472,7764
szórás	0,0014	0,0029	0,0024	0,0027

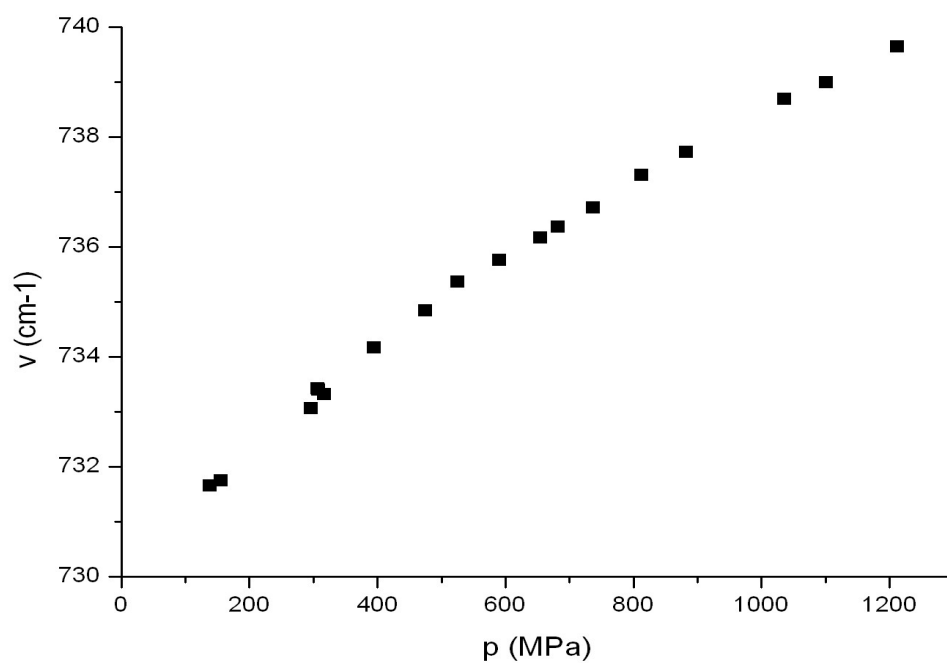
1. táblázat Az Alufix LPDE fólia vizsgált csúcs pozícióinak mért értékei a fólia különféle helyzetekben mért pozícióiból.

3.3 A polietilén csúcsainak viselkedése nyomás függvényében

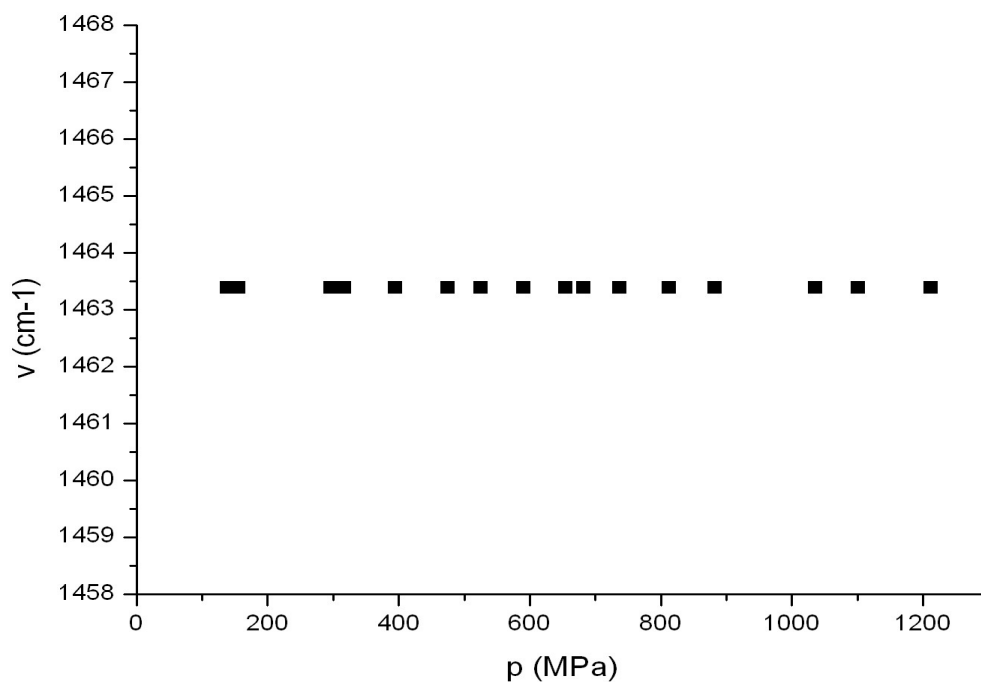
Megmértem, hogy a 720 cm^{-1} - 731 cm^{-1} - 1463 cm^{-1} - és 1473 cm^{-1} -nél található csúcsok csúcspozíciója miképpen tolódik el a nyomás függvényében. A csúcsok pozícióinak a nyomás hatására történő eltolódásai a 8-11. ábrákon láthatóak. Az összehasonlíthatóság kedvéért az ábrákon a függőleges tengely beosztását egységesen 10 cm^{-1} -nek választottam. A 4 vizsgált csúcs közül 3 érzékeny a nyomásváltozásra, az 1463 cm^{-1} -nél található csúcs pozíciója nem változik jelentősen, így nem alkalmas a nyomás meghatározására. Az 1473 cm^{-1} -nél található csúcs pozícióját meghatározni csak a vákuum alatt mért spektrumokból lehet pontosan. A nem levákuumozott mintatér esetén a mért spektrumban megjelennek a vízgőz vonalai, amik zajossá teszik a spektrum egy olyan tartományát ahol az említett 1473 cm^{-1} -nél lévő csúcs is található. Ez azért lényeges a szempontunkból, mivel a gyémántcella alacsonyabb nyomáson (körülbelül $100\text{--}150\text{ MPa}$ -ig) nem zár tökéletesen és a vákuumozás során a benne található minta kiszökhet. A nagynyomású mérés esetén a mérés elején a nyomást a 2. ábrán látható réz csavarral óvatosan növelve (körülbelül 20 MPa -os ugrások a tekerések során) szokás a nyomást arra az értékre felvinni, ahol már a vákuumozás hatására a minta nem távozik a cella belsejéből. A vákuumozás azért lényeges, mert így a spektrum jel/zaj aránya jelentősen javul, megszabadulunk a zavaró vízgőz vonalaktól. (12.ábra) A 720 cm^{-1} -nél lévő csúcs a nyomás hatására jól láthatóan eltolódik, viszont a változás $1,4\text{ GPa}$ nyomásváltozás hatására csupán $1,7\text{ cm}^{-1}$, míg az eltolódás mértéke ugyanilyen nyomásváltozás esetén a 731 cm^{-1} -nél található csúcs -nál 9 cm^{-1} . A mérés során a csúcspozíció meghatározásának pontossága, mint látni fogjuk $0,01\text{ cm}^{-1}$. Ekkora eltolódás a 731 -es csúcsnál $1,3\text{ MPa}$ a 720 -as csúcsnál pedig 14 MPa nyomásváltozásnak felel meg, ezért a 731 -es csúcs eltolódásának nyomon követése pontosabb nyomásmeghatározást tesz lehetővé. Az ábrákon az LDPE típusú fólia csúcsainak változása látható, az UHMWPE típusú csúcsai is hasonlóan tolódnak el a nyomás függvényében, a lényeges különbség a függvények menetében lesz, emiatt nem szabad összekeverni a különböző típusú fóliákat, ha nyomás meghatározásra alkalmazzuk őket.



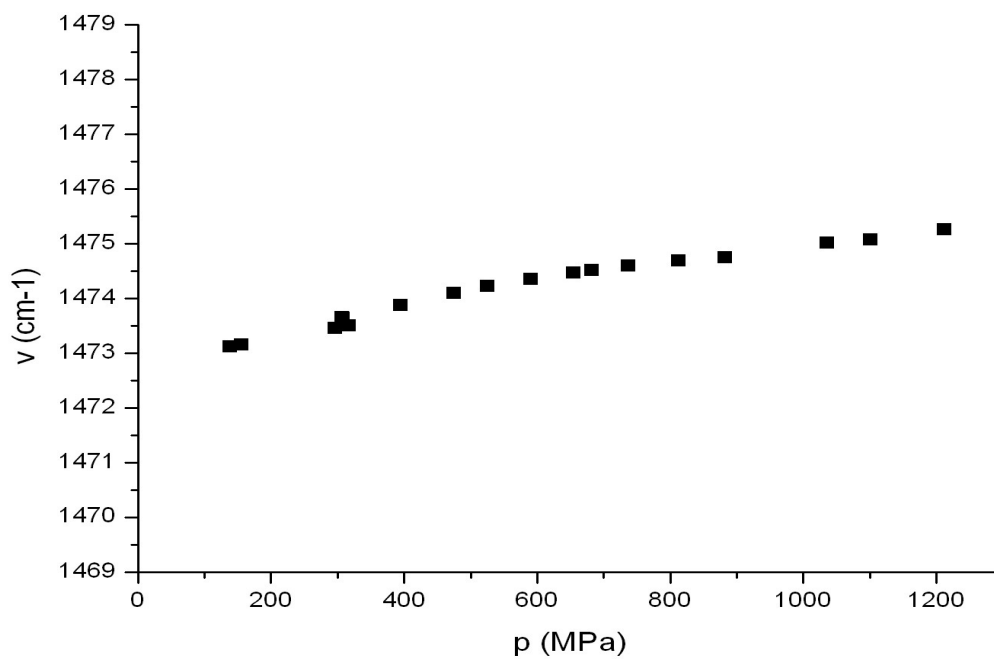
8. ábra A polietilén 720 cm^{-1} -nél található csúcs csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás hatására.



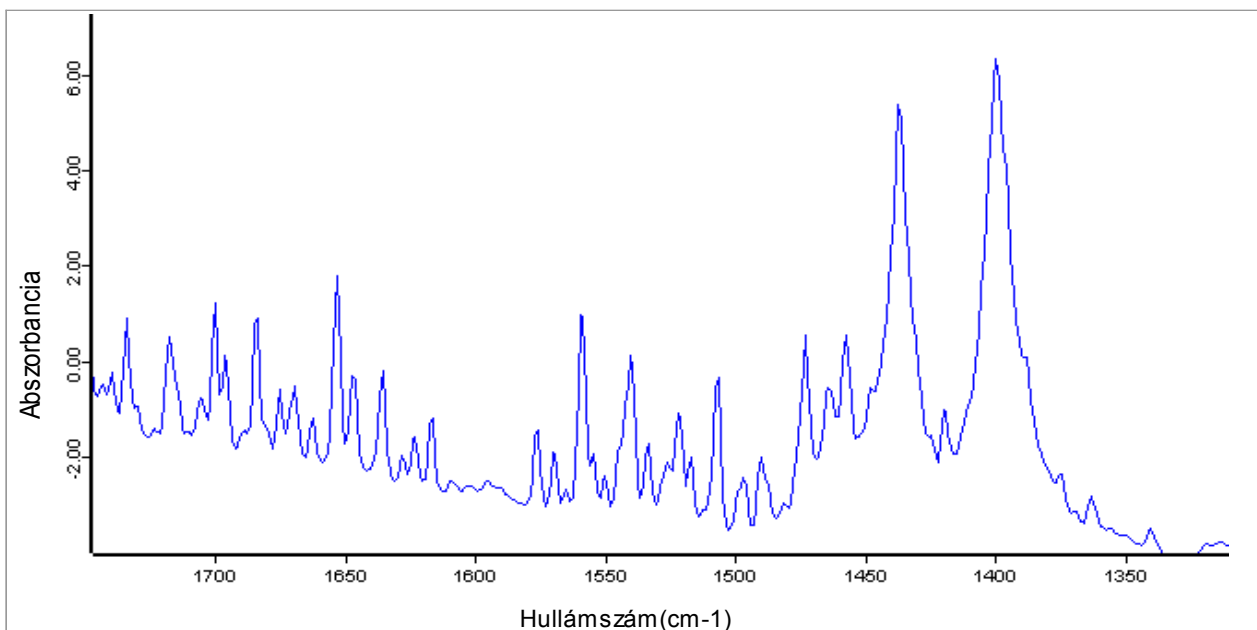
9. ábra A polietilén 731 cm^{-1} -nél található csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás hatására.



10. ábra A polietilén 1463 cm^{-1} -nél található csúcs csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás hatására. Az ábrán látható, hogy a csúcspozíció a nyomás hatására nem változik.



11. ábra A polietilén 1473 cm^{-1} -nél található csúcs csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás hatására.



12. ábra Az LDPE polietilén infravörös spektrumának egy olyan része látható, melyen a vízgőz vonalak is látszódnak. A polietilénhez tartozó sávok nehezen különíthetők el a vízgőz vonalaktól.

3.4 A 731cm^{-1} -nél található csúcs különböző típusú fóliák esetén

Megvizsgáltam, hogy az előzőekben bemutatott csúcsok közül a nyomás meghatározásra legjobban alkalmazható 731cm^{-1} -nél található csúcs pozíciója hogyan tolódik el a bárium szulfáttal mért nyomás függvényében. A nyomás meghatározására a BaSO_4 983cm^{-1} -nél található csúcsát használják az infravörös spektroszkópia méréseknél [9]. A nyomást a következő képlettel határozhatjuk meg:

$$p = 0,31 \Delta \nu^2 + 2,097 \Delta \nu \quad (15)$$

Ahol, $\Delta \nu = \nu_T - \nu_{ref}$ a ν_T hőmérséklettel korrigált és ν_{ref} a referencia hullámhossz különbsége.

A hőmérséklet korrekciót az alábbi képlettel számolhatjuk.

$$\nu_T = \nu_m - 0,162 \Delta T \quad (16)$$

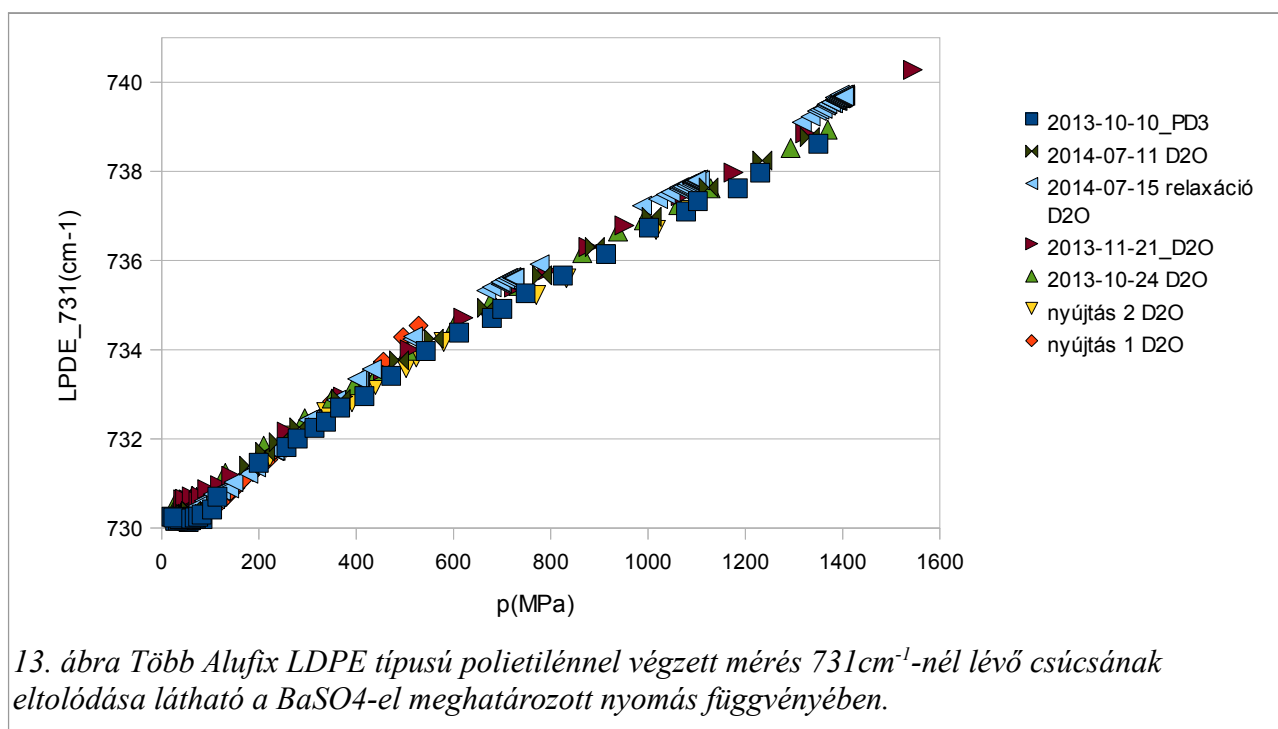
ν_m a mért hullámszám. ΔT a mért minta és a referencia hullámszámhoz tartozó hőmérséklet különbsége.

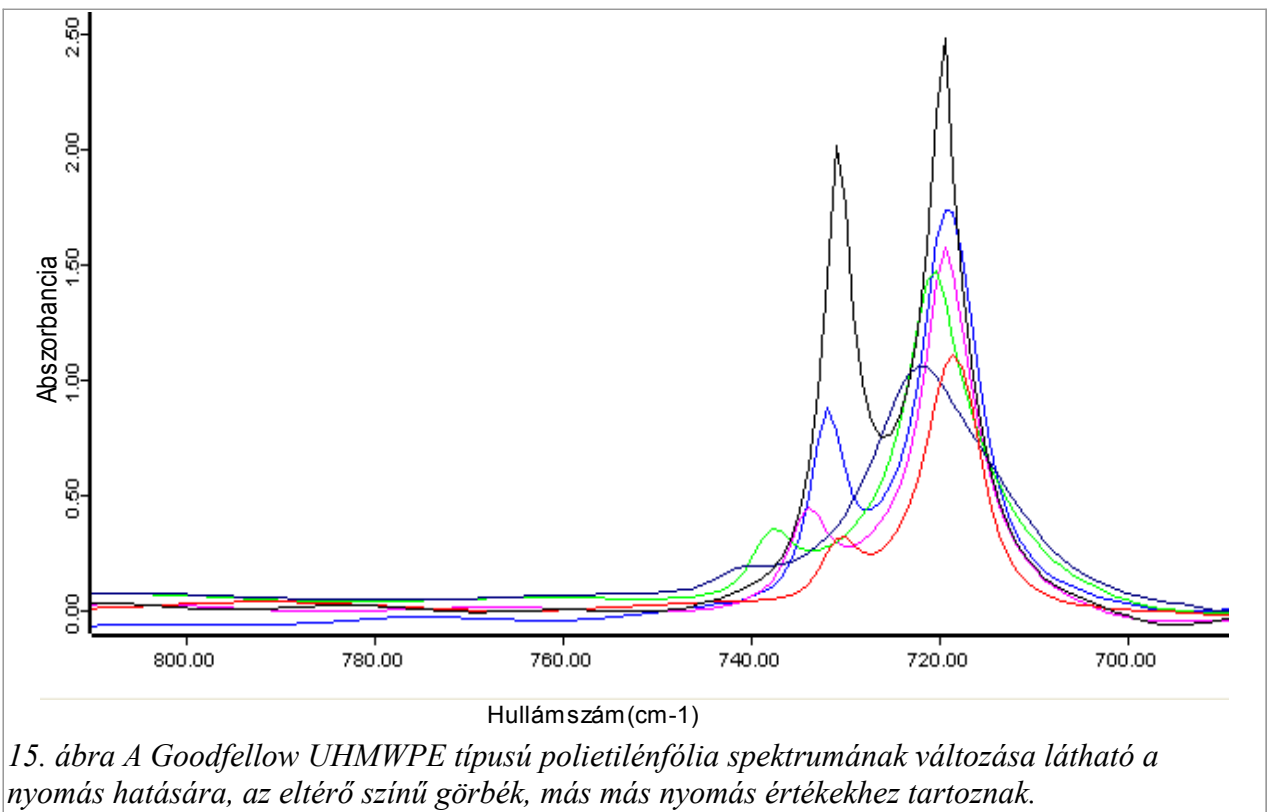
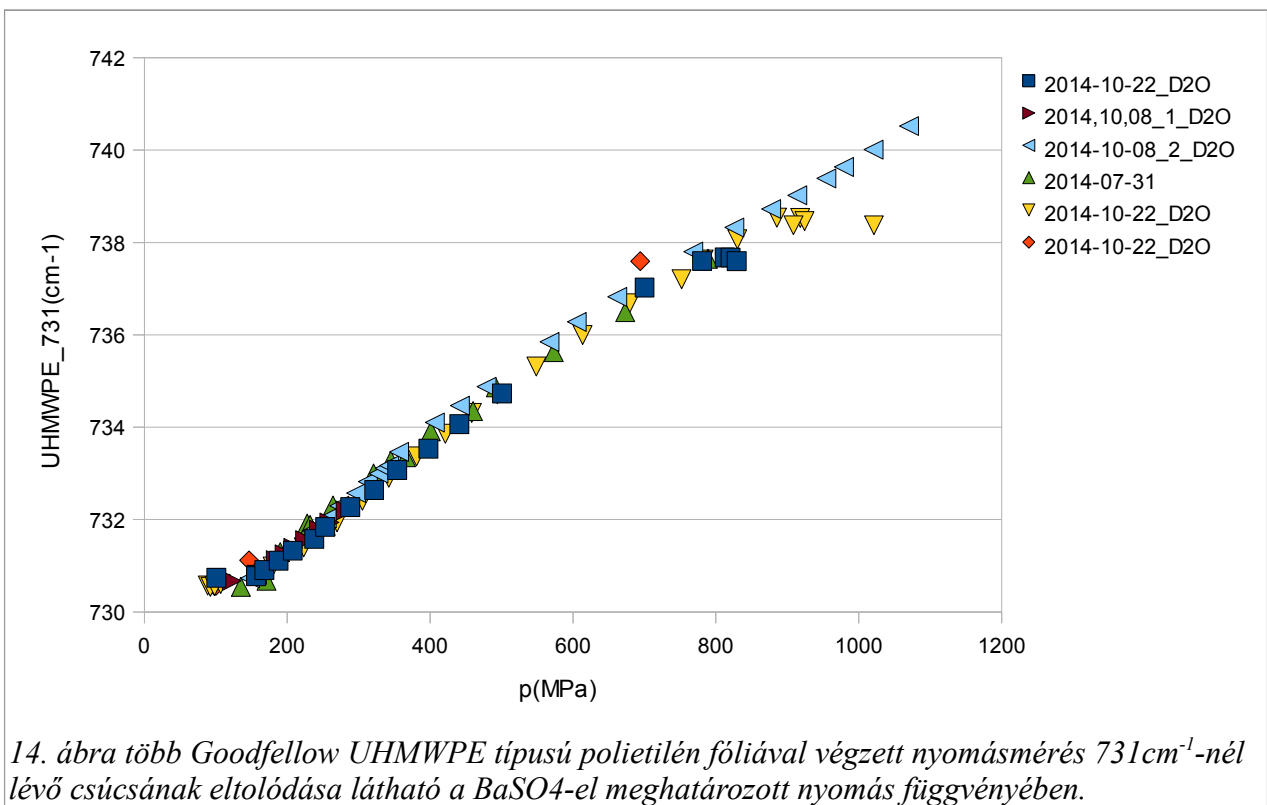
A 13. ábrán az Alufix LDPE típusú fóliával végzett mérések eredményei vannak ábrázolva. A méréseket nehézvízzel vagy pD 3-as puffer oldattal végeztem. A kísérletek során külön megvizsgáltam, hogy kis mértékben nyújtott fóliát téve a gyémántcellába másképp tolódik-e el a csúcs. Azt is ellenőriztem, hogy nagyobb lépésekben változtatva a nyomást (100-200 MPa), majd hosszú ideig mérve történik-e relaxáció. Az ábrát szemlélve látszik, hogy az azonos típusú fóliával végzett kísérletek során a mért eltolódások jó közelítéssel megegyeznek a különböző körülmények között és más-más oldatokkal végzett mérések során. A mért pontok jól illeszkednek egy parabolára.

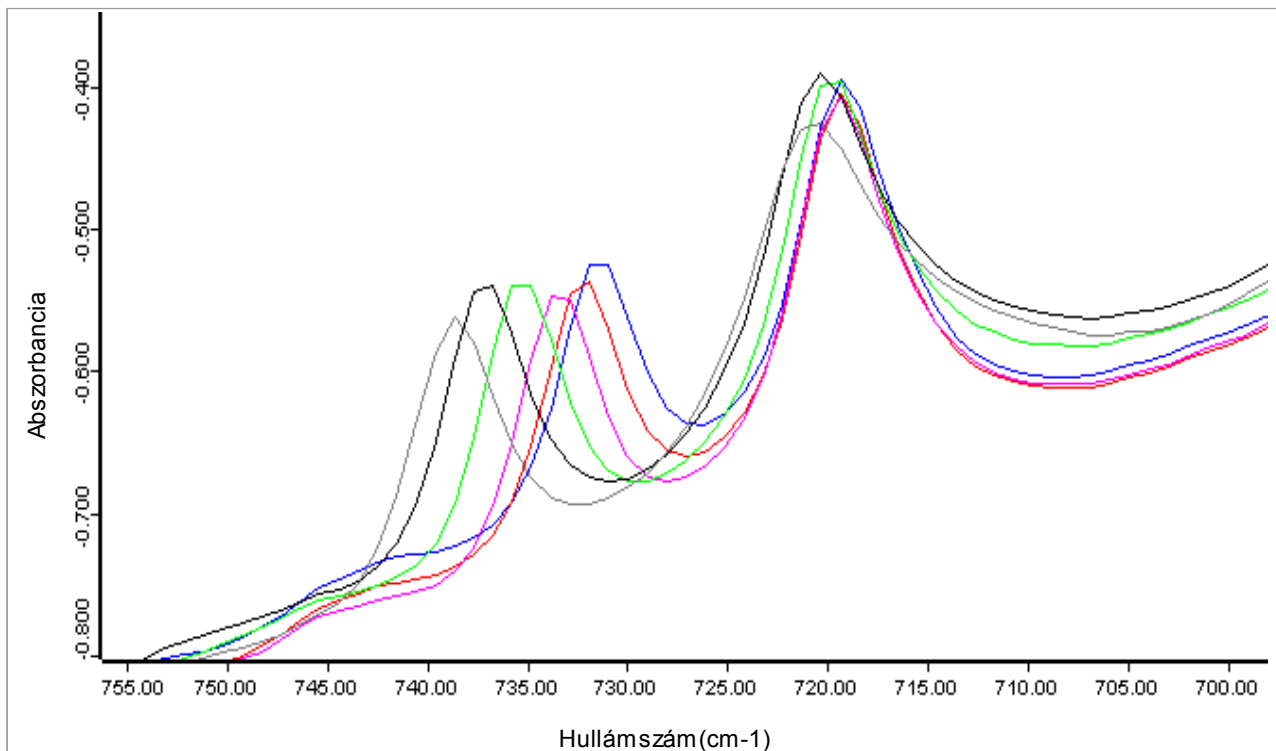
A Goodfellow UHMWPE fóliával végzett mérések során (14.ábra), bár a citromsárga és sötétkék mérési pontok magasabb nyomásnál 1GPa fölött elkanyarodnak. Ennek a fóliának kezdetben nagy intenzitású abszorpciós sávjai a mérés során a nyomást növelve lecsökkennek. A spektrumban a sávok alatti terület nagy mértékben csökkent a mérés során. Ez irreverzibilis változás volt, mivel a nyomást visszacsökkentve a kezdeti értékre a sáv területe nem tért vissza az eredeti állapotba. (A csúcspozíció viszont visszatért.) A spektrum változása a 15. ábrán láthatóak. Az ábrán feketével látszik a mérés kezdetén felvett spektrum, amely a többi fölé magasodik. A mérés folyamán egyre csökkent a csúcs mérete és a pozíciója is tolódott el a magasabb hullámszámok felé. A legmagasabb nyomáson mért még a mérés szempontjából értékelhető spektrum a világoszöld színű, utána a csúcs egész kilaposodott. A nyomást csökkentve az eredeti értékére a kék spektrumot kaptam, amelyen jól kivehető, hogy az abszorpciós sáv mérete nem állt vissza a kezdeti méretre a pozíciója viszont visszatért. (A kezdeti pozíció $731,67\text{cm}^{-1}$ volt a visszatért $731,65\text{cm}^{-1}$) Az LDPE fóliákkal végzett mérések során ilyen változásokat nem tapasztaltam.

A 16. ábrán az LPDE fólia spektrumának változása látható a nyomás hatására, ott jól látszik, hogy a csúcs pozíciója tolódik el, viszont a görbe alatti terület közel állandó. A sávok abszorbanciája a mérés során elhanyagolható mértékben változik. (A mért spektrumok közül nem az összes szerepel az ábrákon, csak néhány jellegzetes spektrumot tüntettem fel.)

A Goodfellow UHMWPE fólia esetén az infravörös sávok abszorbanciájának változása nem kívánatos effektus, mivel a csúcs 1 GPa fölött el is tűnik, így pozíció híján nem lehet vele nyomást mérni. Ezért végül az LDPE fólia mellett döntöttem, mely úgy tűnik, hogy 1,5 GPa nyomásig mindenképpen alkalmas a nyomás meghatározására. (A biológiai oldatokat vizsgálva, e fölött a nyomás fölött már a vizes oldatok a kísérletek során beállított $20\text{-}50^{\circ}\text{C}$ fokos hőmérsékleti tartományon megfagynak.)



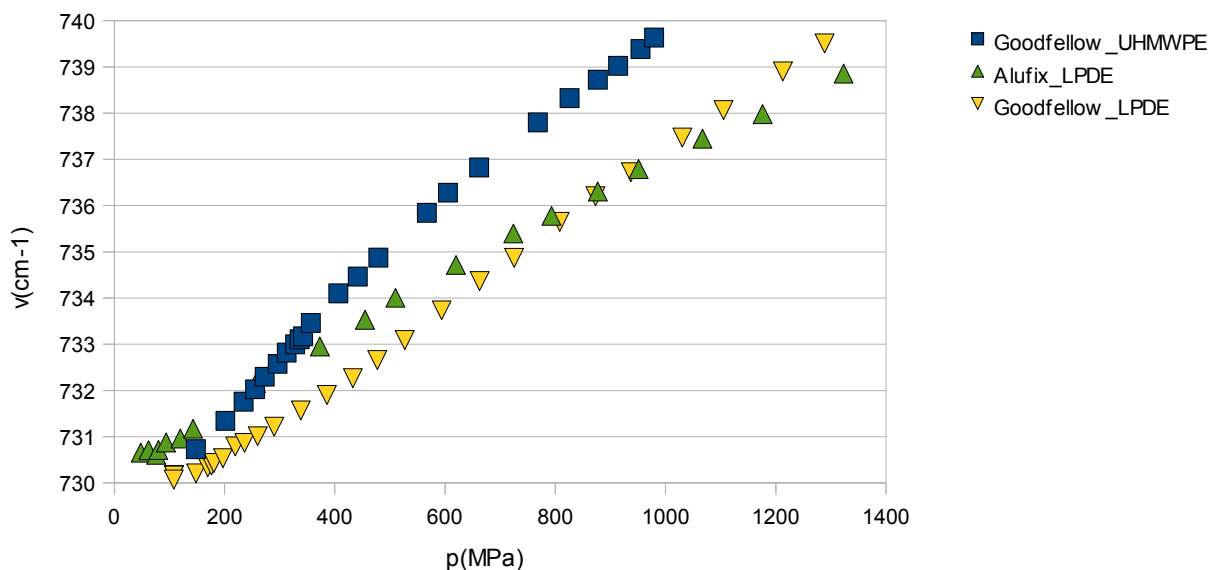




16. ábra Az LDPE típusú polietilénfólia spektrumának változása látható a nyomás hatására, az eltérő színű görbék, más más nyomás értékekhez tartoznak.

A 17. ábra a három különböző típusú általam vizsgált polietilénfólia 731 cm^{-1} -nél található csúcspozíciójának eltolódását szemlélteti. Itt látszik a különbség, amit korábban említettem a különböző típusú és gyártmányú polietilénszármazékok között. Az UHMWPE fólia csúcs pozíciója sokkal meredekebben növekszik mint a többi és 1 GPa fölött, ennél a típusnál ez a csúcs már nem alkalmas a nyomás meghatározására, mert mint az előzőekben láttuk a csúcs eltűnik, a spektrumból (15. ábra)

Az LDPE típusú fóliák között is található eltérés, a citromsárga és zöld görbe metszi egymást. Látható, hogy bár a polietilénnek a csúcsai a nyomás hatására eltolódnak, ennek mértéke típustól függően eltérő lehet, ezért minden típushoz külön kell kalibrációs mérést végezni, ha belső kalibránsként szeretnénk őket használni. Az eddigiek alapján elmondható, hogy a csúcsok közül a 731 cm^{-1} -nél található csúcs a legalkalmasabb, mert az legérzékenyebb a nyomásváltozásra. A megvizsgált típusok közül az LDPE tűnik használhatóbbnak, mivel ott a spektrum vonalainak csak a pozíciója változik. A fóliák vastagsága is számít, az itt megvizsgált 0,075 mm-es UHMWPE fólia spektrumának sávjai már közel vannak a telítéshez. Ennél vastagabb fóliák esetén a spektrum telítésbe megy és akkor nem határozhatóak meg a csúcskoordináták. (Túl vékony fólia esetén nincs elég jel.) Az ideális fóliavastagság 0,01 mm-0,07 mm.



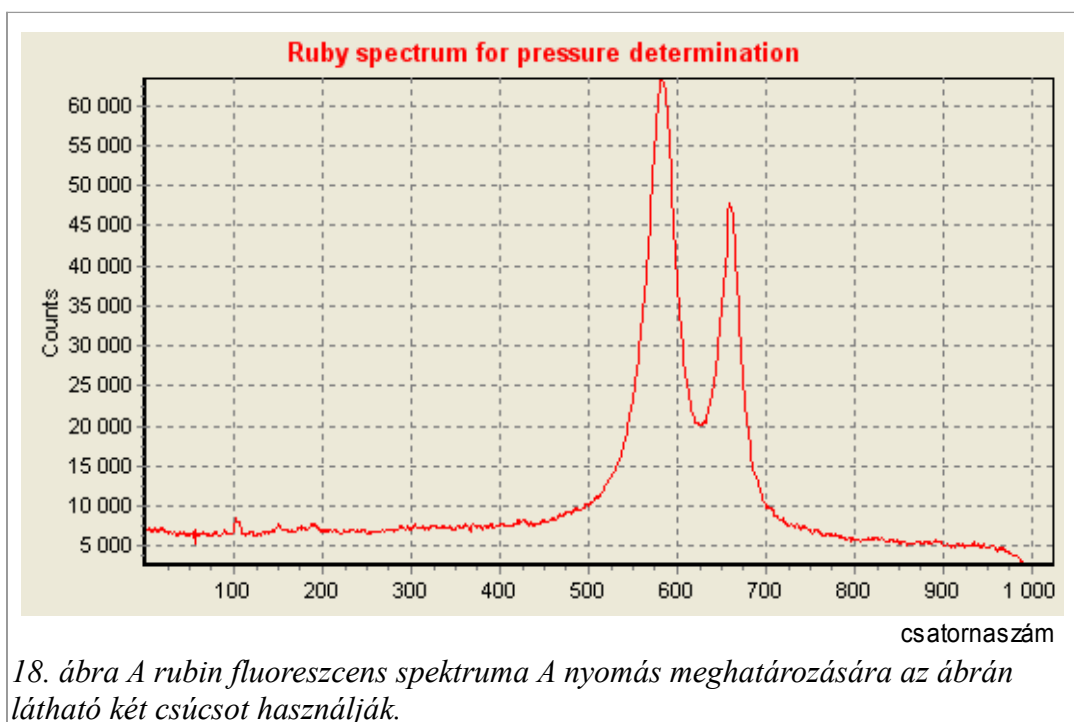
17. ábra A vizsgált 3 különböző típusú polietilénfólia 731 cm^{-1} -nél található csúcspozíciójának eltolódása látható a BaSO_4 -el meghatározott nyomás függvényében.

3.5 Az Alufix LDPE polietilén fólia nyomáskalibrációja

Az eddigi eredményeket figyelembe véve az Alufix LDPE típusú polietilénfólia 731 cm^{-1} -nél található csúcsa tűnik a legalkalmasabbnak arra, hogy egy a nagynyomású infravörös spektroszkópiai méréseknél jól használható belső kalibránst kapjunk.

A nyomáskalibráció elvégzéséhez kétféle mérést végeztem. Az egyik méréshez a legelső belső nyomás kalibránsok egyikét a rubint alkalmaztam. A másik mérés során a nyomást a BaSO_4 segítségével határoztam meg. A két módszerrel hasonló eredményt kaptam. Az infravörös spektroszkópiai mérés a BaSO_4 alkalmazásával pontosabbnak bizonyult.

A rubint a fluoreszcens spektroszkópiai mérések során használják belső kalibránsnak, ezért annak érdekében, hogy a mérést elvégezhessük össze kellett kapcsolni a két különböző spektroszkópiai mérést. A nagy nyomás előállítására továbbra is a nagynyomású gyémántcellát használtam. A cellába apró rubin kristály darabkákat tettem a fóliára. A minta előkészítést úgy végeztem el, hogy optikai mikroszkóp alatt egy tű segítségével tettem a rubin szilánkokat a cellába. (A BaSO_4 por is hasonló módon kerül a cellába. Ez egy viszonylag sok ügyességet is kitartás igénylő folyamat.) Miután a rubint elhelyeztem a gyémántcellában D_2O -t cseppentettem a cellára. A fluoreszcens méréseket egy külön erre a célra összeállított berendezéssel mértem. A fluoreszcens mérést kombináltuk az infravörös spektroszkópos méréssel. A vizsgált mintát, ami az FTIR spektrométerben elhelyezett gyémántcellában volt, egy optikai kábelon keresztül világítottam meg zöld HeNe (543,5 nm) lézer fénnel. Az emittált fény is ezen a kábelon keresztül jött vissza és egy monokromátoron (Jobin Yvon THR 1000) keresztül jutott a CCD kamerába (ANDOR 1024*128 pixel). A hullámhossz kalibrációjához a neon vonalát használtuk, amit a HeNe lézer emittált. A spektrumból a hőmérséklet ismeretében egy a Delphi környezetben külön erre a célra fejlesztett programmal meghatároztam a nyomást. A program a nyomás hibáját az 1.5.2-ben leírtak alapján számolja.



18. ábra A rubin fluoreszcens spektruma A nyomás meghatározására az ábrán látható két csúcsot használják.

A 18. ábrán látható spektrumból a program kiszámítja a rubin R_1 -es csúcsának (6993 nm) hullámhosszát.

$$\lambda = \lambda_0 + a \cdot CH_{number} \quad (17)$$

Ahol $a = -0,01852$ nm, λ_0 a neon spektrumvonala alapján meghatározott hullámhossz, CH_{number} a csatornaszám.

A nyomást a csúcspozíció eltolódásából számíthatjuk ki. Tudjuk, hogy a rubin R_1 -es csúcs $0,768 \text{ cm}^{-1}$ -el tolódik el 1 kbar nyomásnövekedés hatására és $0,14 \text{ cm}^{-1}$ -el 1 K hőmérséklet változás hatására. Abban az esetben ha $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ pontossággal mérjük a hőmérsékletet, akkor az ebből adódó standard eltérés a nyomásnál 10 MPa.[4].

A rubinnal végzett mérés több szempontból is kihívást jelentett. A rubin nagyon érzékeny a hőmérséklet változásra. A hőmérsékletet a gyémántcellába helyezett termopár használatával mértem. A leolvasott hőmérséklet változás a mérések során nem haladta meg a $0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ fokot. A hőmérsékletet egy mikroprocesszorral vezérelt fűtő berendezéssel állítottam be $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra, ami a gyémántcella környezetét tartotta állandó hőmérsékleten. Az infravörös mérés során, amikor a polietilén spektrumát mértem akkor a nagyobb pontosság miatt le kellett vákuumozni a spektrométert. A rubin fluoreszcens spektrumának méréséhez ki kellett emelni a cellát az infravörös spektrométer mintatartójából, ez okozta hőmérséklet ingadozás jelentős részét.

Egy másik hibaforrást a túl nagy rubinszilánkok okozhatnak. Ezek érintkezhetnek a gyémántok felületével és bizonyos nyomás elérése után összetörtek, ekkor a nyomás ugrott egy keveset. A magasabb nyomásokon, 600MPa fölött már lecsökkent a rubinból jövő jel intenzitása, így az azonos pontosság érdekében hosszabb ideig kellett mintavételeznem, ami megint csak pontatlanságot okozhatott. (1 GPa fölött már nagyon leromlott a leromlott a jel erőssége.) Ez látszik is a kapott eredményeken 600 MPa fölött a mért nyomásértékek már jobban szórnak, mint alacsony nyomáson. A mérési pontok átlagos hibája (20-30) MPa között volt, magasabb nyomáson (40-50) MPa.

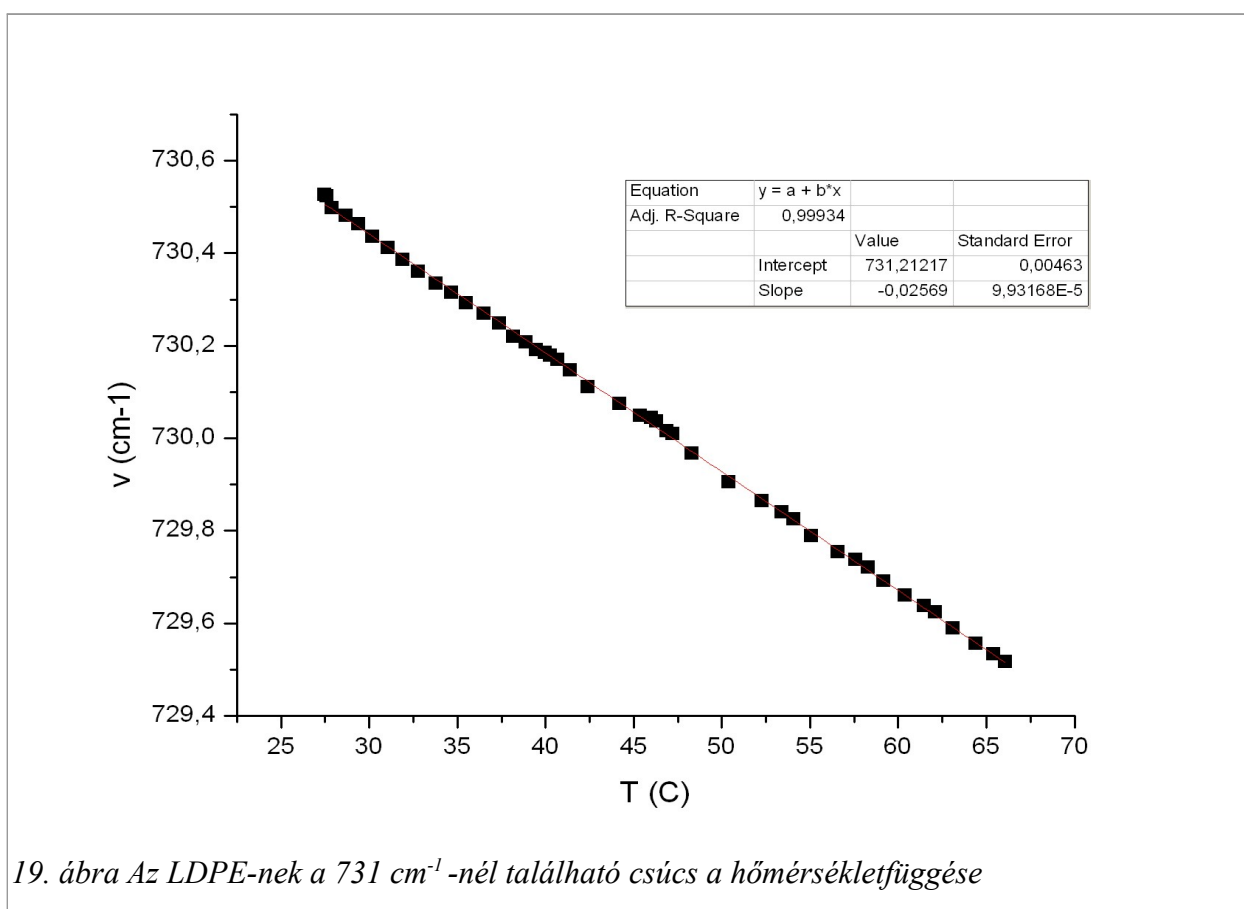
A rubinnal végzett fluoreszcens spektroszkópai mérések kisebb pontossága miatt a nyomáskalibrációhoz a BaSO_4 -ból meghatározott nyomásértékeket fogom használni.

A nyomást a polietilén csúcspozíciójának eltolódásából fogom meghatározni. (Így a csúcsmeghatározás pontatlanságából származó esetleg fellépő szisztematikus hiba nem fog számítani.) Az eltolódások kiszámításához kell egy referencia érték amihez képest az eltolódásokat számítani fogom. A referenciának a polietilén normál légköri nyomáson mért csúcspozícióját fogom használni. A mért referencia csúcspozícióra $730,392 \text{ cm}^{-1} \pm 0,003 \text{ cm}^{-1}$ -t kaptam. (1.táblázat)

Mivel a kalibrációra használni kívánt infravörös vonal a hőmérséklet hatására is eltolódott kissé, ezért a pontos kalibrációhoz szükség volt a polietilén csúcspozíciójának hőmérsékletfüggésére is. A hőmérséklet növekedésének hatására a csúcspozíció az alacsonyabb hullámszámok irányába tolódik el. (19.ábra) A mért adatpontokra egyenest illesztettem. Az illesztés során a r^2 értéke 0,99934 lett, vagyis a mért pontok jól illeszkednek egy egyenesre. Az illesztett egyenes egyenlete $y=a+bx$. Az illesztés során kapott tengelymetszet és meredekség:

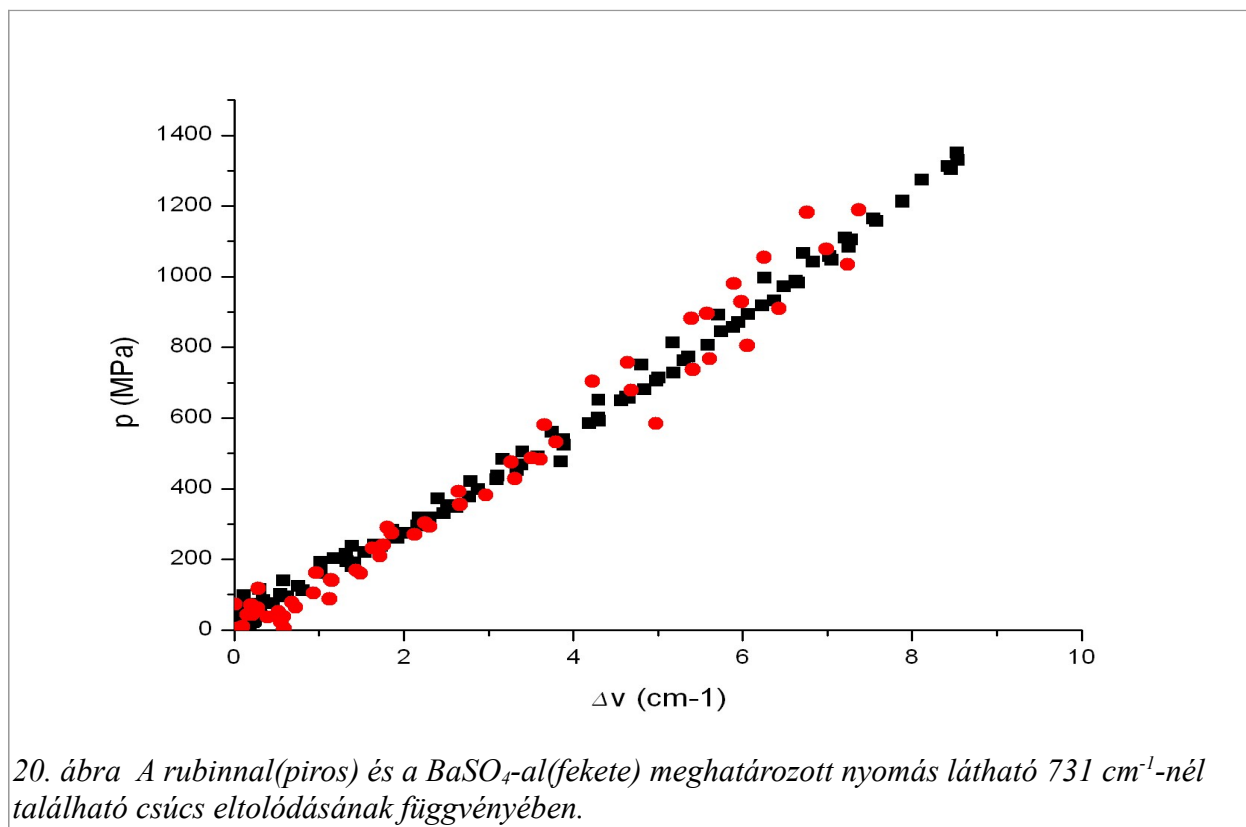
$$a=731,212 \pm 0,005 \text{ cm}^{-1}$$

$$b=-0,02569 \pm 9,9\text{E-}5 \text{ cm}^{-1}/\text{C}$$



19. ábra Az LDPE-nek a 731 cm^{-1} -nél található csúcs a hőmérsékletfüggése

A 20. ábrán a rubinos fluoreszcens spektroszkópiai mérések és a BaSO_4 -al végzett infravörös spektroszkópiai mérések eredménye látható. Az 730 cm^{-1} -nél található csúcs pozíciójának eltolódásának függvényében ábrázoltam a mért nyomásértékeket. Pirossal jelöltem a rubinos mérés adatpontjait feketével a BaSO_4 mérés adatpontjait. A rubinnal mért nyomások és a BaSO_4 -al mért nyomások hasonló eredményre vezetnek, de a rubinos mérés már az ábra alapján is pontatlanabbnak tűnik. A magasabb nyomásértékeknél, mért adatpontok jobban szórnak. Ezért a nyomaskalibrációs görbe meghatározásához a BaSO_4 -os mérések adatait használtam.



A kalibráció pontosságának vizsgálatához az összes eddigi Alufix LDPE fólia 731 cm⁻¹ -es csúcskoordináta eltolódás mérések során mért adatpontjai közül kiválasztottam véletlenszerűen az adatok negyedét, a maradék 75%-al elvégeztem a kalibrációs görbe illesztését, majd megnéztem, hogy a véletlenszerűen kiválasztott adatpontokkal az illesztési paraméterek segítségével kiszámított nyomás mennyiben tér el a BaSO₄-al számított nyomástól. Ha tökéletesen illeszkednének az adatpontok, akkor egy 45 fokos meredekségű egyenest kéne kapnom. A 21. ábrán láthatóak az illesztéshez felhasznált mérési pontok és az illesztett parabola. Az eltolódásokat a 19. ábrán látható hőmérséklet kalibrációs görbe alapján 30 °C-ra számoltam át egységesen. (Általában ilyen hőmérsékleten zajlanak a mérések a laborban.) Az illesztett parabola egyenlete:

$$p = B \Delta \nu + C \Delta \nu^2 \quad (18)$$

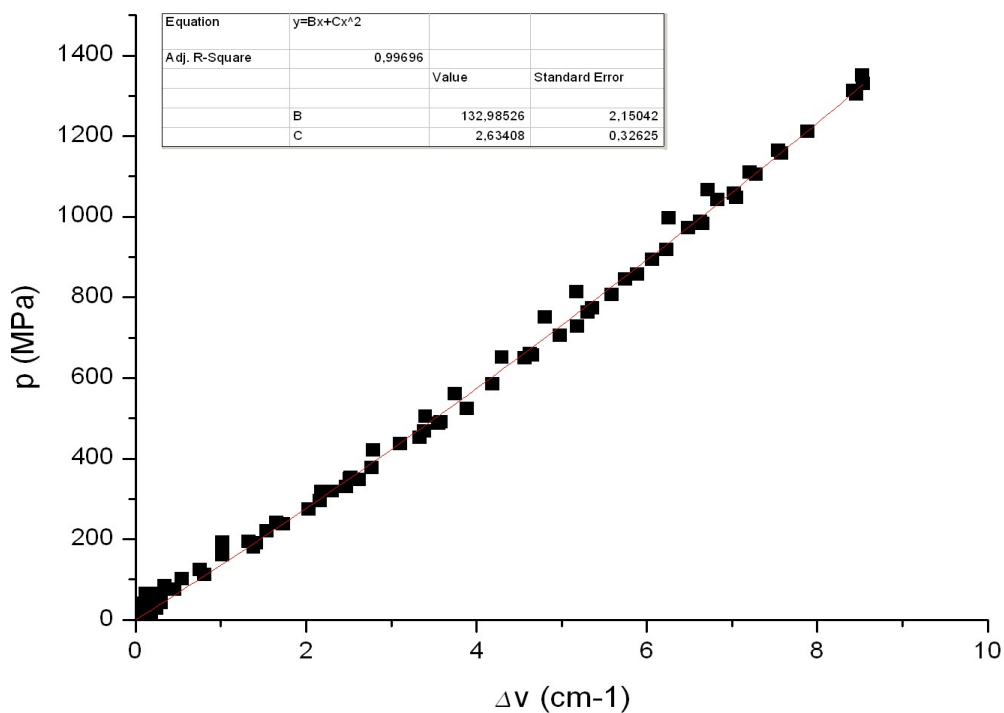
Az illesztett paraméterek:

$$B = 133,0 \text{ MPa} \cdot \text{cm} \pm 2,2 \text{ MPa} \cdot \text{cm} \quad C = 2,79 \text{ MPa} \cdot \text{cm}^2 \pm 0,35 \text{ MPa} \cdot \text{cm}^2$$

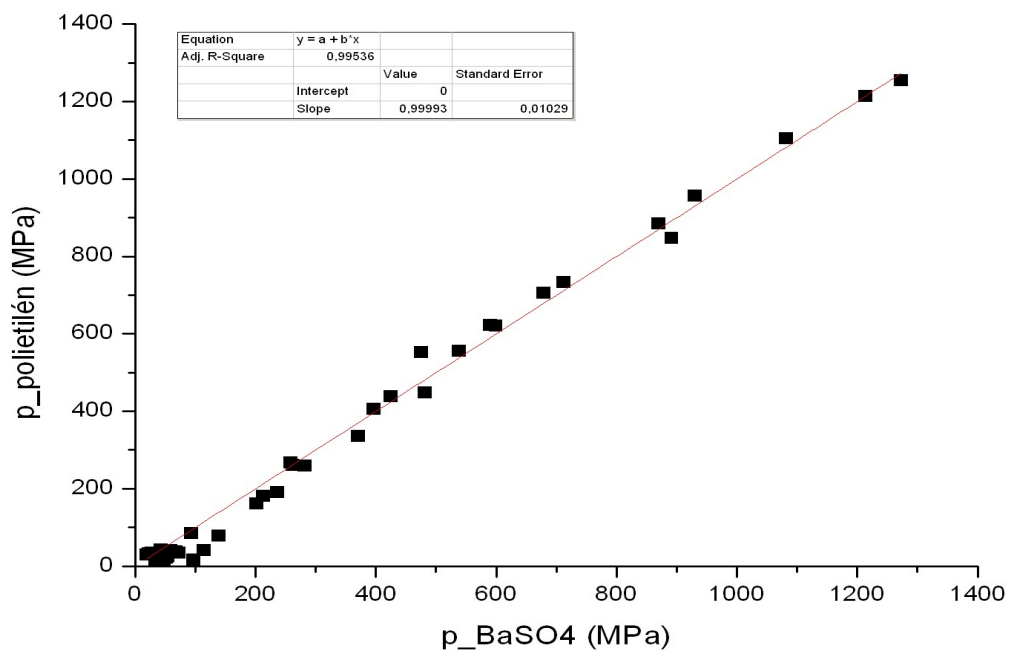
Az illesztésnél $r^2 = 0,997$.

A 22. ábrán a mérésekből véletlenszerűen kiválasztott adatpontokból számolt nyomás van ábrázolva mért bárium szulfáttal számolt nyomások függvényében. Az adatpontokra egyenest illesztettem. Az illesztett egyenes meredeksége $0,99993 \pm 0,01029$. A véletlenszerűen kiválasztott adatpontok jól illeszkednek a kalibrációs görbére. Az illesztésnél $r^2 = 0,995$.

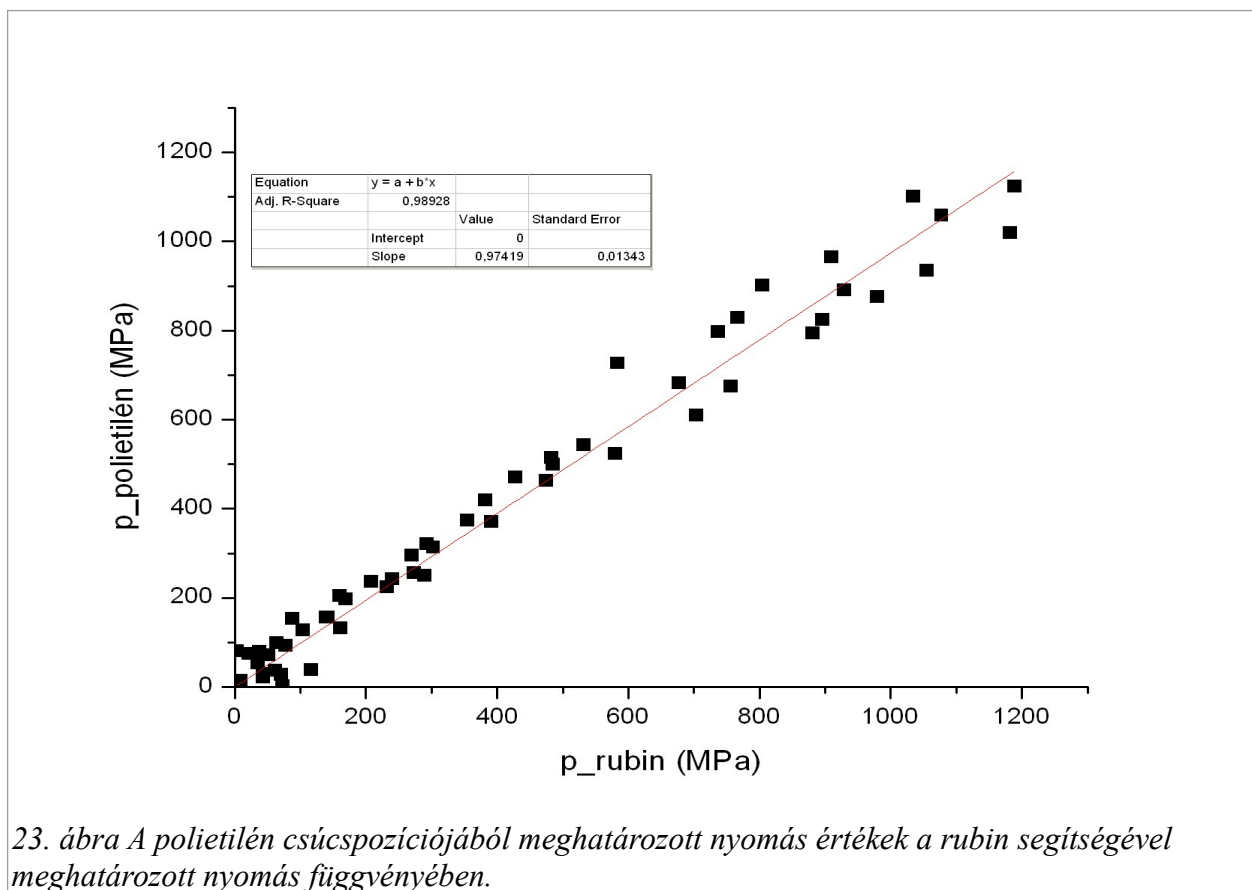
A 23. ábrán a fluoreszcens spektroszkópiai méréssel meghatározott nyomásokat ábrázoltam, a hozzájuk tartozó polietilén koordinátával meghatározott nyomások függvényében. Ebben az esetben is egyenest illesztettem a pontokra. Az illesztett egyenes meredeksége, most $0,974 \pm 0,013$. A pontok ebben az esetben kevésbé illeszkednek a kalibrációs görbére. Az illesztésnél $r^2 = 0,989$.



21. ábra A nyomás meghatározása az Alufix LDPE fólia 731 cm^{-1} -es csúcsának eltolódásából. Az ábrán a mért pontok és az azokra illesztett kalibrációs görbeként használandó parabola látható.

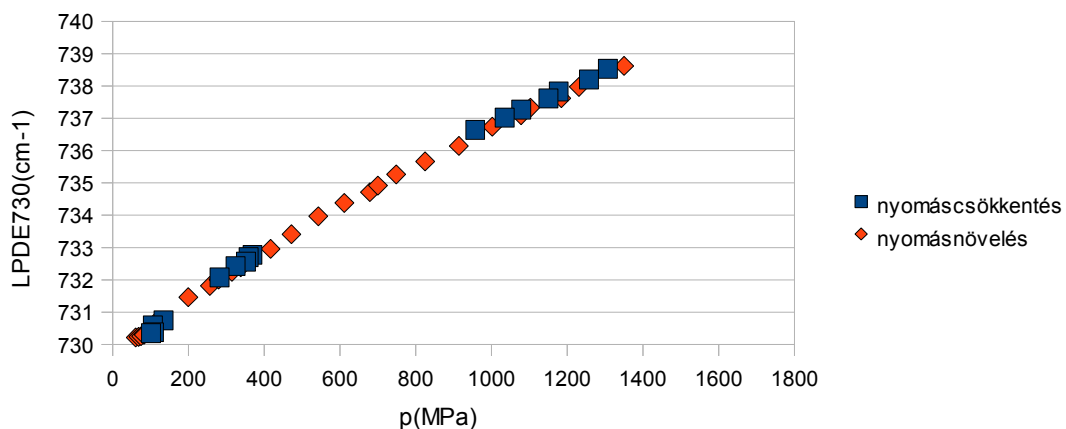


22. ábra A kalibráció pontosságának vizsgálata véletlenszerűen kiválasztott mérési pontokkal. A polietilénből meghatározott nyomás értékek a BaSO_4 -ból számolt nyomás függvényében.

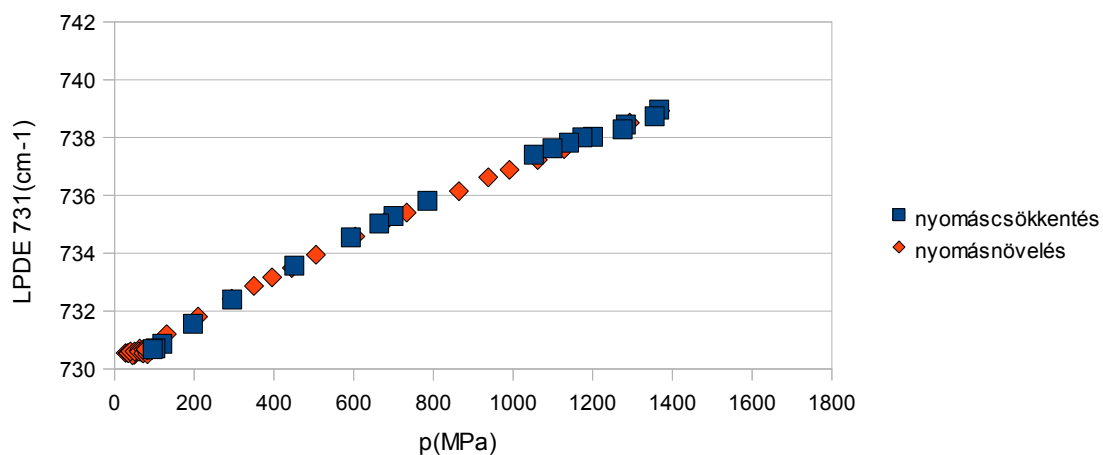


3.6 A kalibrált csúcs eltolódásának vizsgálata a nyomáscsökkentés hatására

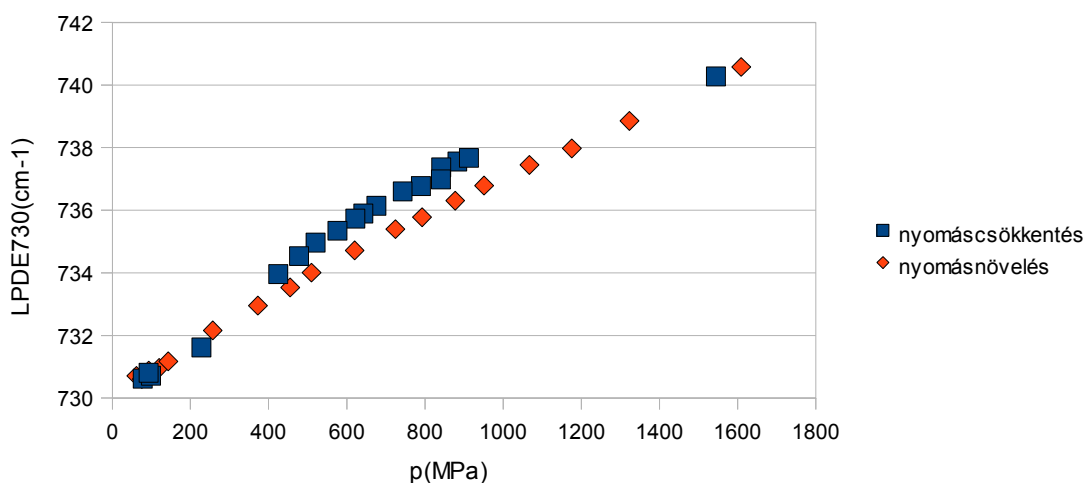
Egy jó nyomásdetektálásra alkalmas anyaggal szemben az is elvárás, hogy ne csak a nyomás növelése során, hanem a visszafele úton, a nyomás csökkentése során is alkalmazható legyen a nyomás kiszámításához. A kísérletek során az is érdekes szokott lenni, hogy az adott anyagban történt szerkezetváltozás a nyomás csökkentésének hatására reverzibilis-e vagy sem. A már meghatározott Alufix LDPE fólia 731 cm^{-1} -nél található csúcsának megmértem a nyomás csökkentés hatására történő eltolódásait is. A mérések alapján úgy tűnik, hogy körülbelül 1,4 GPa nyomásig a csúcspozíció ugyanazon a görbén mozog fel-le. A magasabb nyomások elérése után viszont más görbén mentén tolódik vissza. Az atmoszferikus nyomást elérve minden esetben legfeljebb 0,3 cm^{-1} pontossággal visszajutott a kezdeti pozícióba. A 24. és 25. ábrán látható mérés esetén a nyomást 1,4 GPa-ig növeltem, majd onnan kezdtem csökkenteni. Az ábrán jól látszik, hogy ekkor a csúcs ugyanazon a görbén jut vissza kiindulási helyére. A 26. ábrán látható mérés esetén a nyomást 1,6 GPa-ig növeltem, ekkora nyomás elérésekor a csúcs már egy másik úton tér vissza a kiindulási helyzetbe. Az összes mérés esetén ahol a nyomást nem növeltem 1,4 GPa fölé ott ugyanazon görbe mentén tért vissza a csúcspozíció a kezdeti értékhez. Az eddig elvégzett mérések alapján valahol 1,4 GPa és 1,6 GPa között van az a határ ahonnan még ugyanazon a görbén jutunk vissza kiindulási állapotba, mint amelyiken felfelé mentünk. 1,4 GPa-nál nagyobb nyomás esetén a meghatározott (18) kalibrációs görbe segítségével a nyomás csökkentés során már nem kapnánk a nyomásra pontos eredményt.



24. ábra Az Alufix LDPE polietilén fólia 731 cm^{-1} -nél található csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás növelés és csökkentés hatására



25. ábra Az Alufix LDPE polietilén fólia 731 cm^{-1} -nél található csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás növelés és csökkentés hatására



26. ábra Az Alufix LDPE polietilén fólia 731 cm^{-1} -nél található csúcspozíciójának eltolódása látható a nyomás növelés és csökkentés hatására

3.7 A nyomáskalibráció pontossága

A nyomás hibáját okozhatja a vonalpozíció eltolódás hibája és a hőmérsékletmérés hibája is.

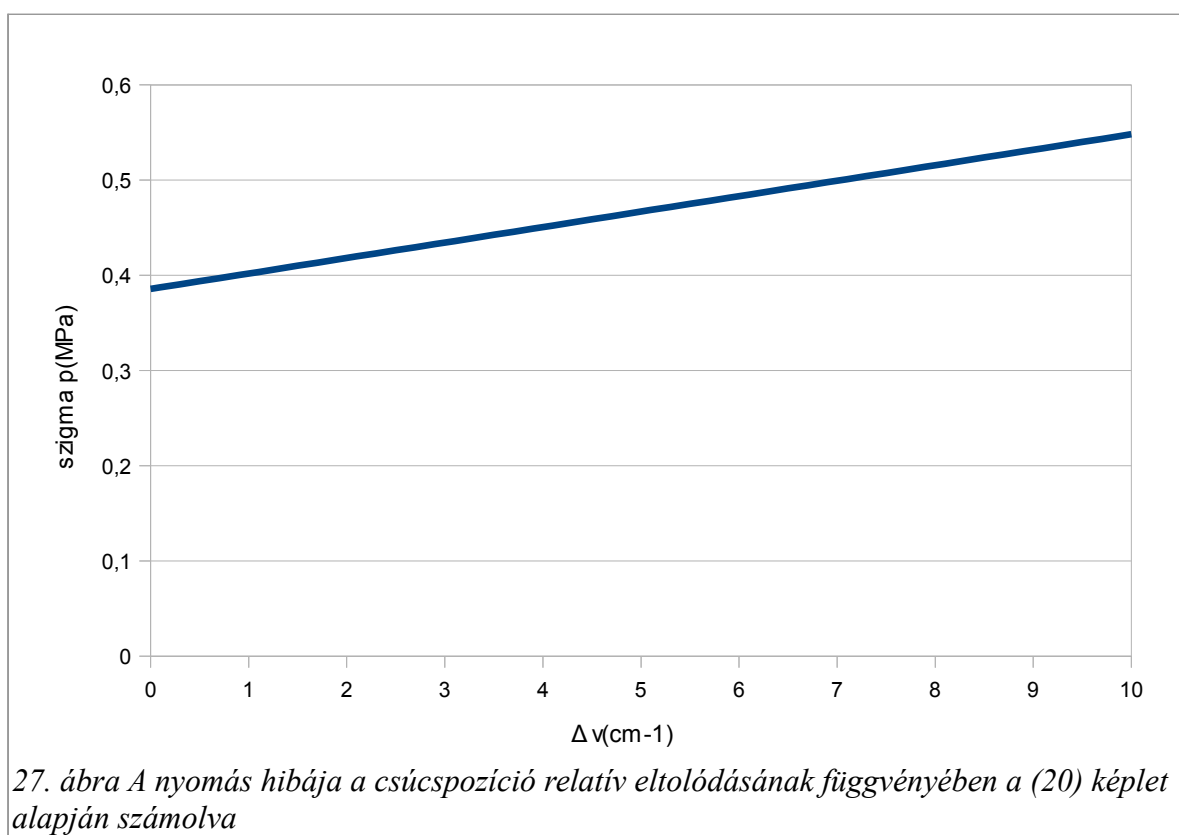
A nyomás függ a csúcsektolódástól ami függ a hőmérséklettől. $p = f(x_{csúcs}(T))$.

$$\sigma_p = \left| \frac{\partial f(x_{csúcs})}{\partial x_{csúcs}} \right| \sigma_{csúcs} \quad (19)$$

Mivel a kalibrációs görbénk másodfokú, ezért a hiba a nyomástól is függeni fog, mert a $\frac{\partial f(x_{csúcs})}{\partial x_{csúcs}}$ nem konstans. $\sigma_{csúcs} = 0,0029 \text{ cm}^{-1}$

$$\sigma_p = |B| \sigma_{cs} + 2 \cdot |C \Delta \nu| \sigma_{cs} \quad (20)$$

A B és C a kalibrációs görbe illesztéséből meghatározott paraméterek.



Kiszámoltam a kalibrációs görbe alapján számolt nyomásértékeknek 22. ábrán látható egyenestől való átlagos eltérésének a szórását is. Ez adja meg a mért nyomás empirikus hibáját. A számolt szórás $19,8 \text{ MPa}$ azaz $\sim 20 \text{ MPa}$. Az elméleti hiba (27 ábra) sokkal kisebb, mint az empirikus, (20 MPa), ami arra utal, hogy nem az adatgyűjtésből adódó statisztikus hiba, hanem a mérési körülmények ingadozása a hiba fő oka. Az így meghatározott hiba nagyságrendileg megegyezik a BaSO_4 -al meghatározott nyomás hibájával, ami $\pm 15 \text{ MPa}$ [9].

3.8 Összefoglalás

A mérések során bebizonyosodott, hogy a különböző polietilénfajták alkalmasak lehetnek nagy nyomású infravörös spektroszkópiai méréseknél belső nyomás-kalibránsnak. A többféle típusú (UHMWPE, LDPE) polietilénfóliáknak a nyomás hatására az azonos nyomásérzékeny infravörös rezgési sávjainak az eltolódása eltérő lehet. A vizsgált polietilénfóliák átlagosan 1 *GPa* nyomásig alkalmasak a nyomásnövelő, majd csökkentő mérések elvégzéséhez, így a gyakorlatban is hasznosak lehetnek a nagynyomású infravörös biológiai kutatások során. A belső nyomás kalibránssal szemben elvárt követelményeknek is megfelelnek. Nem lépnek reakcióba a vizsgálandó mintával, a spektrumuk kevés abszorpciós sávot tartalmaz, azok is szűk területre korlátozódnak és nem fednek át a biológiai minták spektrumának a kutatás szempontjából érdekes részeivel. A polietilénfóliának van egy külön előnye is a többi eddig használatos belső kalibránssal szemben, mégpedig a mérés előtti minta előkészítést lényegesen leegyszerűsíti. Egyszerű behelyezni a cellába. A mérésekhez az ideális fóliavastagság 0,01 mm -0,07 mm között van, ekkor sávok még nem kerülnek telítésbe. (Arra eddig külön nem tértem ki, de a bárium szulfátnál az is külön nehézséget jelent, hogy megfelelő mennyiséget juttassunk a cellába, ne túl keveset, hogy legyen elég jel, de ne túl sokat, nehogy telítésbe menjen a csúcs.) Meghatároztam egy elterjedt LDPE típusú polietilén fólia nyomáskalibrációs görbét (30 °C-on), melyet most már lehet használni nyomásmérésre a gyakorlatban is.

$$p = (133,0 \pm 2,2) \text{ MPa} \cdot \text{cm} \cdot \Delta \nu + (2,79 \pm 0,35) \text{ MPa} \cdot \text{cm}^2 \cdot \Delta \nu^2$$

A nyomás ezzel a módszerrel $\pm 20 \text{ MPa}$ pontossággal adható meg (0-1,4) *GPa* tartományon.

A polietilén nem csak alternatívája a BaSO₄-nak, hanem vele olyan fontos molekulák vizsgálata is lehetséges, mint a nukleinsavak.

4. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Kellermayer Miklós professzornak, az intézet igazgatójának, aki megengedte, hogy a bemutatott méréseket a tanszéken végezzem, valamint témavezetőmnek Dr. Smeller Lászlónak, hogy irányításával betekintést nyerhettem a nagy nyomáson végzett infravörös spektroszkópiai vizsgálatokba, valamint hogy gyakorlati és elméleti tanácsaival segítette munkám elkészítését.

5.Hivatkozások

- [1] **Forman, R. A. Piermarini, G. J. Barnett, J. D. Block, S** (1972) Pressure measurements made by the utilisation of ruby sharp-line luminescence *Science* 176, 284-285.
- [2] **Jayaraman, A. (1986)** Ultrahigh pressures *Rev. Sci Instrum* 57, 1013-1031.
- [3] **Luca Fontana Mario Santoro, Roberto Bini,Diep Q. Vinh, and Sandro Scandolo** (2010) High Pressure Vibrational Properties of Polyethylene THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS 133, 204502
- [4] **O. Grasset** (2001)Calibration of the R Ruby fluorescence lines in the pressure range [0-1GPa] and the temperature range [250-300K] *High Pressure Research*, vol.21.pp 139-157
- [5] **Savitzky, A., Golay, M. J. E (1964)** Smoothing and differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures *Anal. Chem.* 36, 1627-1639.
- [6] **Smeller, L** (1998) How precise are the positions of the computer determined peaks? *Applied Spectroscopy* 52, 1623-1626.
- [7] **Smeller, L** (1999) On the precision of the pressure determination by internal calibrants *Physica B* 265, 268-271.
- [8] **Wong, P. T. T., Moffat, D. J., Baudais, F. L** (1985) Crystalline quartz as an internal pressure for high-pressure infrared spectroscopy *Appl. Spectrosc.* 39, 733-735.
- [9] **Wong, P. T. T., Moffat, D. J** (1989) A new internal pressure calibrant for highpressure infrared spectroscopy of aqueous systems *Appl. Spectrosc.* 43, 1279- 1281.

1. Függelék

Saját diákköri kutatómunkám összefoglalása

A témavezetőmtől azt a feladatot kaptam, hogy végezzem el a polietilén infravörös spektrumának nyomás hatására történő változásának vizsgálatát. Amennyiben alkalmas nyomás kalibránsnak, abban az esetben végezzem el kalibrálását. Ezek után vizsgáljam meg a kísérleteknél való felhasználhatóságát. Ezen a kutatási feladaton egyedül dolgoztam. Természetesen az elvégzendő kísérleteket és a már elvégzett kísérletek eredményeit hétről-hétre átbeszéltem a témavezetőmmel. A dolgozatban szereplő ábrák a 6. ábrától kezdődően, mind a saját mérési eredményeim felhasználásával készültek. A mérésnél használt berendezések használatát, már korábbi a laborban végzett munkáim során elsajátítottam, ezért a dolgozatban tárgyalt méréseket önállóan végezhettem a minta előkészítéstől kezdve az eredmények kiértékeléséig.

A minta előkészítés

A mérések a minta előkészítésével és a cella összeállításával kezdődnek. A minta előkészítése egy nagy körülmények között igénylő folyamat. Egy fénymikroszkóp alatt egy tű segítségével kellett a BaSO₄ port, vagy a rubin szilánkokat a gyémánt felületére juttatni, mindezt úgy hogy ne kerüljön majd telítésbe a mérés során. Ezután a cellába cseppentettem 2 µl oldatot pipettával. (Ez az oldat szokta tartalmazni a vizsgálni kívánt biológiai mintákat.)

A spektroszkópiai mérések

Az infravörös spektrumokat BRUKER VERTEX 80V FTIR-el mértem. A fluoreszcens spektroszkópiai mérésekhez zöld HeNe lézert, monokromátort és egy CCD kamerát a spektrum felvételéhez. Ezek az eszközök a laborban a rendelkezésemre álltak. A mérések úgy zajlottak, hogy a spektrumfelvétel után a cellát kivettem a spektrométerből és a 2. ábrán látható csavarral változtattam a nyomást, majd megint megmértem a spektrumot.

Elvégeztem az Alufix LDPE, a Good Fellow LDPE és UHMWPE fóliák infravörös spektrumának nagy nyomású vizsgálatát. Kiválasztottam a nyomáskalibrációhoz legmegfelelőbb fóliát a vizsgáltak közül.(Alufix LDPE). Kétféle módszerrel, infravörös spektroszkópia és fluoreszcens spektroszkópia végeztem nyomáskalibrációs méréseket. A pontosabb módszerrel elvégeztem a kalibrációt. Ezenkívül többféle hőmérsékleten (26-40)^oC között, különféle oldatokkal vizsgáltam a fóliai viselkedését a nyomás hatására. Meghatároztam azt a tartományt, ahol a fólia kalibrációhoz használt infravörös sávjának eltolódása még reverzibilis.

A mérések kiértékelése

Az adatok kiértékelését számítógépes programokkal végeztem. A polietilén infravörös spektrumainak kiértékeléséhez az OPUS nevű programot használtam. Ezzel lehet vezérelni a spektrométert is. A programban a korábban csúskiértékeléshez használt makrókat megváltoztattam, hogy a polietilén csúskoordinátáit is kiszámítsa. (A program a Savitzky Golay módszert használja.) A fluoreszcens spektrumok kiértékeléséhez egy a laborunkban használatos, korábban ezekhez a mérésekhez írt programot használtam. Megvizsgáltam, hogy a mért adatpontok milyen görbére illeszkednek. A nyomásméréseknél mért adatpontok egy parabolára illeszkednek a legjobban. A hőmérséklet mérési pontok pedig egy egyenesre. Az illesztésekhez az Origin Pro 8 programot használtam. A hibát empirikus módon határoztam meg a dolgozatban leírtak szerint.

A kutató munkám eredményeképpen lehetővé vált a polietilén használata a nagynyomású infravörös spektroszkópiai méréseknél a nyomás meghatározásához a 0-1,4 GPa tartományon. A polietilén egy ígéretes új nyomás kalibráns számos nagy nyomású infravörös spektroszkópiai mérés elvégzéséhez.