

# PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku  
„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”  
Biofizyka molekularna

## KRYSTALOGRAFIA RENTGENOWSKA WYZNACZANIE STRUKTUR MAŁYCH CZĄSTECZEK (ćw. 37)



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



## Spis treści

1. Podstawy krystalografii rentgenowskiej.....	3
1.1. Dyfrakcja promieniowania na kryształach.....	3
1.2. Problem fazowy.....	5
1.3. Rozwiązanie problemu fazowego.....	5
1.3.1. „Zgadnięcie” faz.....	6
1.3.2. Funkcja Pattersona.....	6
1.3.3. Metody bezpośrednie.....	7
1.4. Udokładnianie i walidacja struktury.....	7
2. Budowa kryształów.....	7
3. Budowa dyfraktometru.....	9
3.1. Źródło.....	9
3.2. Detektor.....	10
3.3. Goniometr.....	10
4. Zebranie danych dyfrakcyjnych.....	11
5. Rozwiązanie struktury.....	11
6. Bibliografia.....	11
7. Literatura uzupełniająca.....	12
8. Zagadnienia do kolokwium wstępnego.....	12
9. Wykonanie ćwiczenia.....	12

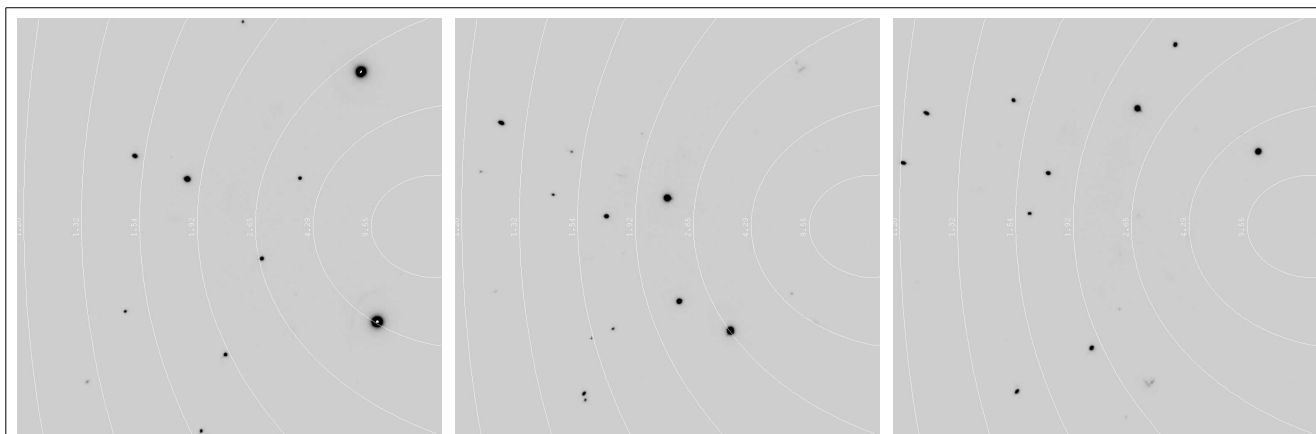
## 1. Podstawy krystalografii rentgenowskiej

Badanie obiektów przy pomocy promieniowania elektromagnetycznego, wymaga zastosowania fal o długościach porównywalnych z rozmiarem obserwowanego obiektu. Rozmiary atomów i długości wiązań między nimi mieszczą się w przedziale około 1 - 3,5 Å. 1Å wynosi średnica atomu wodoru, 2-4 – 3,5Å długości mają wiązania wodorowe, typowe długości wiązania C-C w związkach organicznych mieszczą się w przedziale 1,3-1,5Å. Badanie obiektów takich rozmiarów wymaga zastosowanie promieniowania rentgenowskiego.

Rezultatem eksperymentu krystalograficznego nie jest jednak obraz atomów, lecz mapa gęstości elektronowej w cząsteczce. Dzieje się tak dlatego, że promieniowanie elektromagnetyczne oddziałuje z materią poprzez pole elektromagnetyczne. Intensywność rozproszonego promieniowania jest proporcjonalna do stosunku ładunku do masy, zatem elektrony, które są kilka tysięcy razy lżejsze od protonów i jąder atomowych oddziałują z promieniowaniem elektromagnetycznym dużo silniej. Ponieważ prędkość elektronów jest wielokrotnie większa od szybkości zmian pola elektrycznego obserwuje się nie pojedyncze elektrony, lecz uśredniony w czasie rozkład elektronów w atomie. Ponieważ elektrony są skupione wokół jąder atomowych i wiązań gęstość elektronowa dość dobrze odwzorowuje kształt cząsteczki.

Rozpraszanie promieniowania przez pojedynczą cząsteczkę jest bardzo słabe, zatem trudne do wykrycia i zmierzenia ponad poziomem szumów, pochodzących od rozpraszania przez cząsteczki wody i powietrza. W kryształach duża liczba cząsteczek jest uporządkowana w przestrzeni, więc rozproszone przez poszczególne cząsteczki promieniowanie jest zgodne w fazie, zatem zachodzi konstruktywna interferencja, i intensywność refleksów dodaje się tworząc falę o mierzalnej intensywności. Kryształ działa jak wzmacniacz.

Oczywiście jeżeli w pewnych kierunkach dojdzie do wzmocnienia intensywności promieniowania odbitego na skutek interferencji, to w innych musi dojść do wygaszenia, dlatego obraz dyfrakcji kryształu jest nieciągły i składa się z pojedynczych kropek.



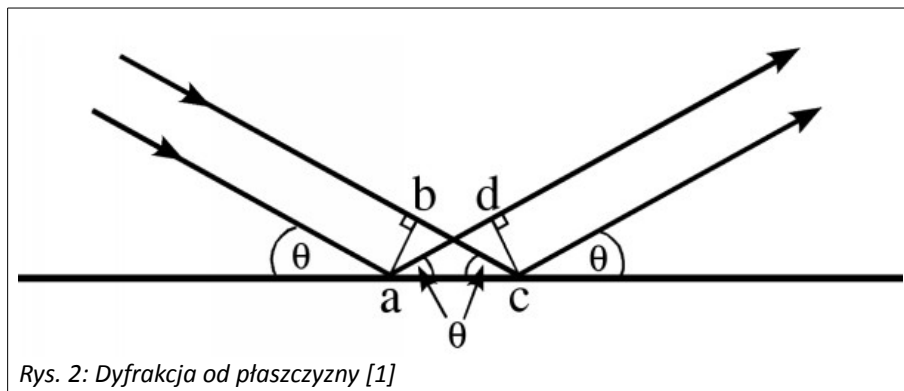
Rys. 1: Obraz dyfrakcyjny kryształu sacharozy

### 1.1. Dyfrakcja promieniowania na kryształach

Gdy fala elektromagnetyczna rozprasa się na elektronach cząsteczek tworzących kryształ fale ugięte na poszczególnych elektronach interferują ze sobą. W zależności od wzajemnego położenia elektronów w przestrzeni i kąta padania fali efektem interferencji może być wzmocnienie fali, wygaszenie fali, lub coś pomiędzy. Co się stanie zależy od całkowitej drogi, jaką fala przebywa od źródła do detektora. Jeżeli różnica długości dróg dla dwóch fal rozproszonych na dwóch różnych elektronach jest wielokrotnością długości fali, wtedy fale rozproszone będą zgodne w fazie i na skutek interferencji nastąpi wzmocnienie fali, jeżeli różnica dróg będzie wielokrotnością fali plus pół długości fali, wtedy nastąpi wygaszenie fali. Warunek na konstruktywną interferencję można łatwo wyprowadzić, wyobrażając sobie, że fale objają się od płaszczyzny przechodzącej przez atomy, tę

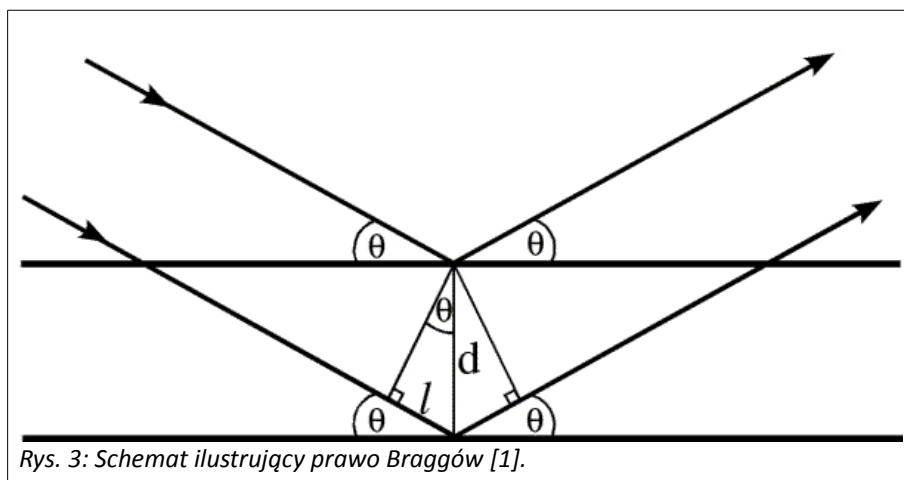
płaszczyznę nazywa się płaszczyzną Bragga, można o niej myśleć, jak o lustrze od którego odbija się promieniowanie.

Kiedy równoległa wiązka promieniowania odbija się od lustra kąt padania jest równy kątowi odbicia, to samo dotyczy płaszczyzn Bragga, a jeśli padająca wiązka jest w fazie, to wiązka odbita też jest w fazie, niezależnie od miejsca, w którym odbiły się poszczególne fale. Schemat przedstawiony na rys. 2 Wyjaśnia dlaczego.



Padająca wiązka jest w fazie, to znaczy, że w punktach a i b obie padające fale mają tę samą fazę. Odcinki bc i ad są sobie równe, ponieważ trójkąty abc i acd są przystające. Zatem promienie odbite w punktach a i c przebywają tę samą drogę, więc wiązka odbita od płaszczyzny jest zgodna w fazie.

Jeżeli fale odbite od jednej płaszczyzny muszą mieć identyczne drogi, żeby być w fazie, to fale odbite od różnych płaszczyzn, muszą mieć różne drogi, a różnica dróg musi być równa wielokrotności długości fali. Prawo Braggów mówi, w jakich odległościach od siebie muszą znajdować się płaszczyzny rozpraszania, aby rozpraszona wiązka była w fazie.



Różnica długości dróg fal odbitych od różnych płaszczyzn wynosi  $2L$  (rys. 3) i zależy od kąta padania,  $L = d \sin \theta$ , zatem prawo Braggów przyjmuje postać:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

Z prawa Braggów wynika, że wraz ze wzrostem kąta rozpraszania, odległość między płaszczyznami Bragga, czyli  $d$ , musi maleć, żeby różnica dróg optycznych była równa długości fali. To oznacza, że im większy jest kąt rozpraszania tym mniejsze są rozmiary detali, które możemy „zobaczyć” przy pomocy pomiarów dyfrakcyjnych.

Ta odwrotna proporcjonalność powoduje, że dane dyfrakcyjne analizuje się zwykle w tak zwanej przestrzeni odwrotnej (*reciprocal space*). Im dalej od siebie są obiekty w przestrzeni odwrotnej, tym bliżej siebie są one w przestrzeni rzeczywistej, pod tym większym kątem rejestruje się refleksy od tych obiektów i tym czulszy na drobne szczegóły jest obraz dyfrakcyjny.

Jak wspomniano wcześniej, kryształ działa jak wzmacniacz promieniowania rozproszonego, dzięki zjawisku interferencji. Żeby doszło do konstruktywnej interferencji promieniowanie rozproszone na poszczególnych komórkach elementarnych

kryształu musi być zgodne w fazie, zatem płaszczyzny Bragga muszą przebiegać przez te same punkty, we wszystkich komórkach elementarnych kryształu.

Jeżeli obiekty znajdujące się na płaszczyźnie Bragga rozpraszają w fazie, to obiekty znajdujące się między tymi płaszczyznami będą rozpraszać nie w fazie, a przesunięcie fazowe będzie proporcjonalne do odległości obiektu od płaszczyzny. Zatem pojedynczy eksperyment dyfrakcyjny pozwala wyznaczyć względne odległości obiektów od płaszczyzn Bragga. Jeżeli wszystkie obiekty będą znajdowały się na płaszczyznach Bragga, na obrazie dyfrakcyjnym pojawi się jedna plamka. Jeśli połowa obiektów będzie się znajdowała na płaszczyznach Bragga, a druga połowa, na płaszczyznach równoległych, dokładnie w połowie odległości między płaszczyznami Bragga, to te dwa zbiory obiektów, nie będą rozpraszały w fazie, a przesunięcie fazowe od drugiego zbioru obiektów, wyniesie dokładnie pół długości fali, zatem nastąpi destruktywna interferencja. Na obrazie dyfrakcyjnym nic się nie zmieni. Jeżeli druga połowa obiektów będzie się znajdowała w innej odległości niż  $d/2$ , przesunięcie fazowe rozproszonego promieniowania będzie gdzieś pomiędzy 0 a  $\lambda/2$ , zatem fala rozproszona wniesie swój przyczynek do interferencji, na obrazie dyfrakcyjnym zmieni się intensywność plamki.

Obraz dyfrakcyjny jest związany z obiektem, na którym promieniowanie się rozproszyło poprzez transformację Fouriera. Zatem, traktując gęstość elektronową jako funkcję matematyczną, obraz dyfrakcyjny jest transformacją Fouriera gęstości elektronowej. Większość funkcji matematycznych, ma swoje funkcje odwrotne np sinus i arcus sinus, transformata Fouriera nie jest wyjątkiem. To oznacza, że gęstość elektronowa jest odwrotną transformacją Fouriera obrazów dyfrakcyjnych. Zatem wystarczy tylko policzyć?<sup>1</sup>

Niestety nie tak prosto. Żeby policzyć gęstość elektronową trzeba znać amplitudę i **fazę** fal rozproszonych na tej gęstości elektronowej. Ale to co jest mierzone podczas eksperymentu, to liczba fotonów padających w każdy punkt ekranu. Liczba fotonów wyznacza natężenie danego refleksu, a natężenie jest proporcjonalne do amplitudy padającej fali, ale nie istnieje, żadna bezpośrednia metoda eksperymentalna pozwalająca wyznaczyć fazy padających fal. Jest to tak zwany **problem fazowy**<sup>2</sup>.

## 1.2. Problem fazowy

Żeby zrozumieć, dlaczego fazy „znikają” w czasie eksperymentu dyfrakcyjnego, nie wystarczy falowy obraz światła. Dyfrakcja, to również rozpraszanie fotonów, czyli zderzenia fotonu z elektronem. W mechanice kwantowej, prawdopodobieństwo, że foton zostanie „odbity” w określonym kierunku jest dane kwadratem amplitudy rozproszonych fal.

$$\Psi(x, t) = A \cdot e^{2\pi i(vt - x/\lambda)} \quad \text{- funkcja falowa fotonu}$$

$$P_{a < x < b} = \int_a^b \Psi(x, t) \cdot \Psi^*(x, t) dx = \int_a^b |\Psi(x, t)|^2 dx \quad \text{- prawdopodobieństwo, że foton znajduje się w obszarze } x \in (a, b)$$

$$|\Psi(x, t)|^2 = A \cdot e^{2\pi i(vt - x/\lambda)} \cdot A \cdot e^{-2\pi i(vt - x/\lambda)} = A^2$$

Dlatego na obrazie dyfrakcyjnym można zmierzyć tylko intensywność refleksu.

Skoro faz nie można zmierzyć bezpośrednio, trzeba je wydobyć z danych i pomiarów pośrednich.

## 1.3. Rozwiązanie problemu fazowego

Problem fazowy można rozwiązać na trzy sposoby: przez zgadnięcie faz, interpretację mapy Pattersona lub bezpośrednio. Wszystkie te metody pozwalają otrzymać tylko przybliżone rozwiązanie.

- 1 Żeby zobaczyć jak działa odwrotna transformacja Fouriera i co można „wydobyć” z obrazów dyfrakcyjnych można zajrzeć na stronę Kevina Cowtana: *The Interactive Structure Factor Tutorial* <http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/sfapplet/sfintro.html>
- 2 Dlaczego fazy są takie ważne można zrozumieć zaglądając na inną stronę Kevina Cowtana: *Kevin Cowtan's Book of Fourier* <http://www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/fourier/fourier.html>

### 1.3.1. „Zgadnięcie” faz

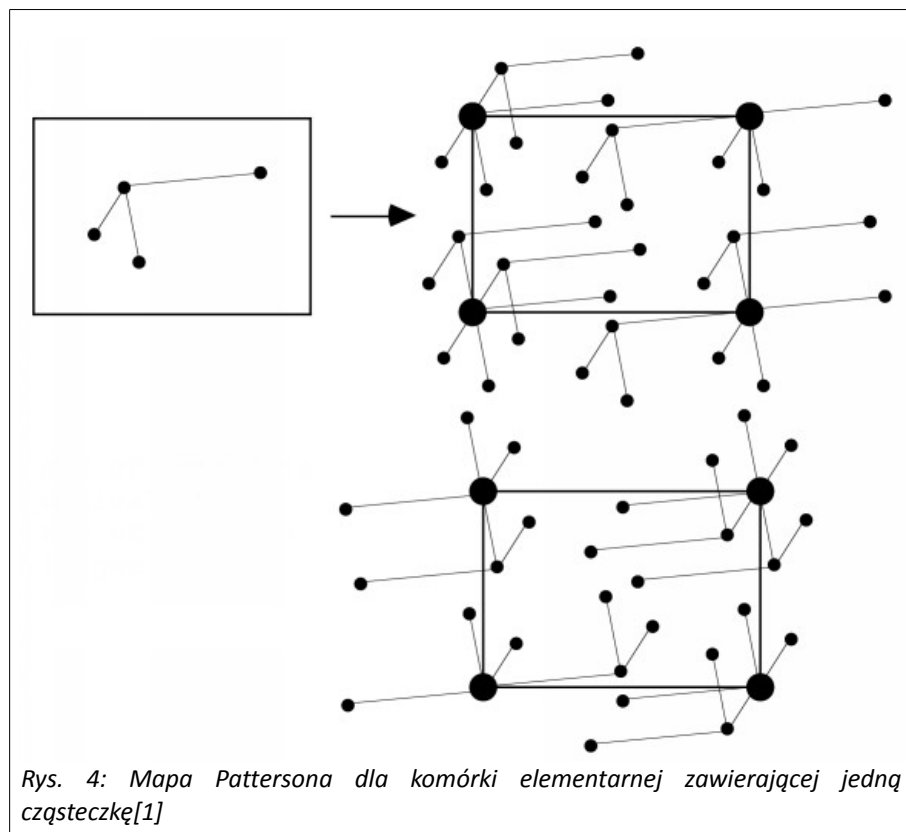
Metoda „przez zgadnięcie” jest historycznie najstarsza. Dla stosunkowo małych cząsteczek początkowe fazy można oszacować, czy też nałożyć na nie pewne ograniczenia, opierając się na znajomości rozmiarów komórki elementarnej, zawartości komórki elementarnej, wiedzy na temat typowych długości wiązań i kątów między nimi, ewentualnych dodatkowych, niewynikających ze struktury kryształu symetriach badanej cząsteczki. Na podstawie oszacowanych wartości faz oblicza się wzór dyfrakcji i porównuje z uzyskanym doświadczalnie. Następnie poprawia fazy, tak aby poprawić zgodność z wynikami doświadczenia.

### 1.3.2. Funkcja Pattersona

Funkcja Pattersona jest odwrotną transformatą Fouriera zmierzonych intensywności refleksów.

Obrazem funkcji Pattersona jest mapa Pattersona, jest ona podobna do mapy gęstości elektronowej, ale jej maksima nie znajdują w tych położeniach co atomy, lecz w położeniach odpowiadających względnym odległościom między atomami. Jeśli w komórce znajduje się atom w pozycji  $\vec{x}_1$  i drugi atom w pozycji  $\vec{x}_2$  to na mapie Pattersona będą znajdowały się dwa piki w pozycji  $\vec{x}_1 - \vec{x}_2$  i w pozycji  $\vec{x}_2 - \vec{x}_1$ . Wysokość pików na mapie Pattersona jest proporcjonalna do iloczynu wysokości pików na mapie elektronowej. Jeżeli w komórce elementarnej znajduje się N atomów, to powinno się w niej znajdować N pików gęstości elektronowej. Na mapie Pattersona każdy z tych N atomów jest połączony wektorem z każdym z N atomów, co daje  $N^2$  wektorów. Przy czym N spośród tych wektorów będzie łączyło poszczególne atomy z nimi samymi, co wygeneruje duży pik w pozycji 0. Pozostałe  $N^2 - N$  pików będzie rozłożonych wokół niego.

Rysunek 4 pokazuje mapę Pattersona dla komórki elementarnej zawierającej jedną cząsteczkę. Mapa Pattersona jest sumą obrazów cząsteczki, każdy kolejny obraz zawiera cząsteczkę przesuniętą w taki sposób, że kolejne atomy cząsteczki znajdują się w początku układu współrzędnych. Ponieważ dla każdego wektora  $\vec{x}_1 - \vec{x}_2$  istnieje wektor przeciwnie skierowany  $\vec{x}_2 - \vec{x}_1$  na tej samej mapie Pattersona znajdują się również obrócone obrazy cząsteczki, jako pokazano na dolnym panelu Rys. 4



Dla odpowiednio małych cząstek, jest możliwe wyznaczenie oryginalnych położenia atomów, które dały wkład do pików

widocznych na mapie Pattersona, operacja ta jest dekonwolucją funkcji Pattersona. Dla rosnącej liczby atomów badanej cząsteczki dekonwolucja szybko staje się niemożliwa.

Jeżeli w komórce elementarnej znajduje się  $N$  atomów, i rozdzielczość danych jest odpowiednio duża, to na mapie gęstości elektronowej będzie  $N$  pików, ale na mapie Pattersona będzie  $N^2$  wektorów.  $N$  spośród nich, złoży się na duży pik w pozycji zero, ale nadal pozostaje  $N^2 - N$  wektorów do przypisania do poszczególnych atomów. Jeżeli cząsteczka składa się z 10 atomów, na mapie Pattersona będzie 90 pików poza centralnym w pozycji zero.

### 1.3.3. Metody bezpośrednie

Metody bezpośrednie opierają się na obecności w strukturze atomu ciężkiego, tzn. atomy o dużej liczbie elektronów. Można wykorzystać naturalną obecność ciężkiego atomu w strukturze, można też stworzyć izomorficzną pochodną badanego związku np. podstawić atom chloru atomem bromu.

Jeśli struktura zawiera niewielką liczbą atomów ciężkich w porównaniu z lekkimi, funkcja Pattersona staje się łatwiejsza do rozwiązywania, a przynajmniej łatwiej w niej znaleźć położenie ciężkich atomów.

Gdy znane są położenia atomów ciężkich można rozwinąć gęstość elektronową w szereg Fouriera, gdyż fazy czynników strukturalnych są w znacznym stopniu uwarunkowane wkładami ciężkich atomów do faz i w pierwszym przybliżeniu, mogą być z nimi utożsamiane.

### 1.4. Udokładnianie i walidacja struktury

Po rozwiązaniu struktury jedną z powyższych metod, otrzymuje się model przybliżony, niedopracowany w szczegółach.

Jakość dopasowania struktury do danych dyfrakcyjnych sprawdza się obliczając wskaźniki rozbieżności  $R$  definiowane jako średnia różnica między amplitudami struktury obliczonymi dla modelu  $F^{calc}$  a wyznaczonymi doświadczalnie na podstawie zindeksowanych refleksów  $F^{exp}$ :

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left( |F_{hkl}^{exp}| + |F_{hkl}^{calc}| \right)}{\sum_{hkl} |F_{hkl}^{exp}|}$$

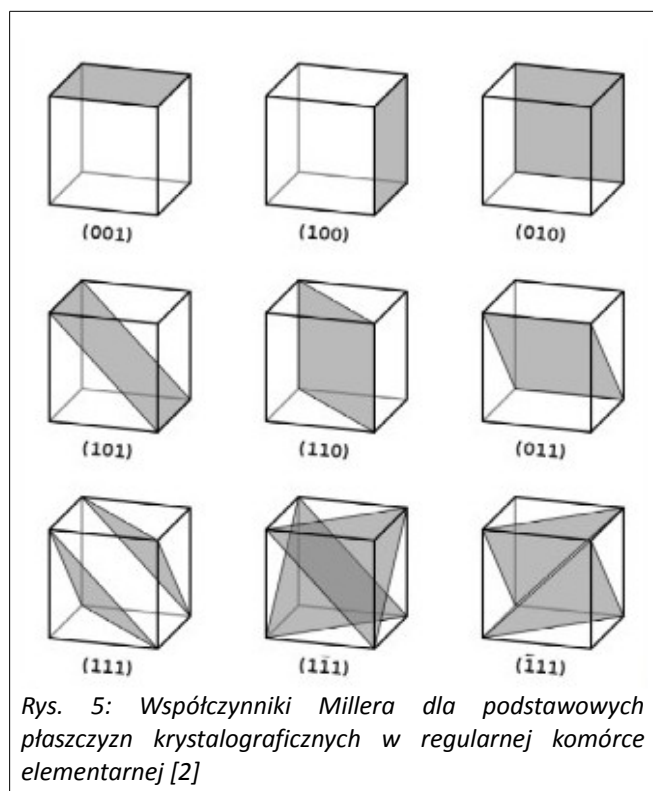
Im mniejsza wartość  $R$  tym lepsze dopasowanie modelu do danych dyfrakcyjnych.

Udokładnianie struktury polega na minimalizacji wartości  $R$ , wykorzystywane są dwie grupy algorytmów: oparte na szeregu Fouriera i na metodzie najmniejszych kwadratów.

## 2. Budowa kryształów

W idealnym kryształach cząsteczki ułożone są regularnie w przestrzeni tworząc trójwymiarową sieć. **Komórka elementarna** (*Unit cell*) to podstawowy element strukturalny powtarzający się w przestrzeni i tworzący sieć przestrzenną. Komórka elementarna jest równoległociąnem charakteryzowanym przez długości krawędzi:  $a$ ,  $b$ ,  $c$  i kąty między krawędziami:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Krawędzie komórek tworzą trójwymiarowe sieci zwane sieciami przestrzennymi. Długości i kierunki krawędzi komórki elementarnej definiują wektory  $\vec{a}$ ,  $\vec{b}$ ,  $\vec{c}$ , sieć rzeczywista jest rozpięta na tych trzech wektorach. Położenie dowolnego punktu w przestrzeni może być opisane wektorem translacji:  $\vec{r}' = \vec{r} + n\vec{a} + m\vec{b} + l\vec{c}$ , Punkty o współrzędnych  $(na, mb, lc)$  nazywa się węzłami sieci (gdzie  $n, m, l$  są dowolnymi liczbami całkowitymi).

Zespoły równoległych płaszczyzn Bragga opisujemy współczynnikami Millera:  $h, k, l$ . Wartości współczynników Millera wyznaczają punkty przecięcia z osiami układu współrzędnych tej z rodziny płaszczyzn, która przechodząc przez węzły sieci jest jednocześnie najbliżej środka układu odniesienia (rys. 5).



Sieć krystaliczna w przestrzeni odwrotnej jest również definiowana przez krawędzie komórki elementarnej:  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$  i kąty między tymi krawędziami:  $\alpha^*$ ,  $\beta^*$ ,  $\gamma^*$ . Taktując  $a$ ,  $b$ ,  $c$  i  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$  jako wektory, zależności między wektorami sieci rzeczywistej i odwrotnej są następujące:

$$\vec{a}^* \cdot \vec{a} = \vec{b}^* \cdot \vec{b} = \vec{c}^* \cdot \vec{c} = 1$$

$$\vec{a}^* \cdot \vec{b} = \vec{a}^* \cdot \vec{c} = \vec{b}^* \cdot \vec{c} = 0$$

Co oznacza, że  $a^*$  jest prostopadłe do  $b$  i do  $c$  a jego długość wynosi  $1/a$ .

Punkt, który w przestrzeni rzeczywistej opisany wektorem  $\vec{r}' = n\vec{a} + m\vec{b} + l\vec{c}$ , jest opisany wektorem  $\vec{H} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$  w przestrzeni odwrotnej.

Symetria sieci rzeczywistej jest zachowana w sieci odwrotnej, zachowana jest nie tylko geometria, ale także intensywności rozproszonych refleksów.

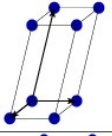
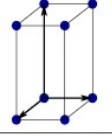
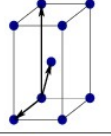
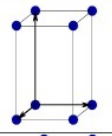
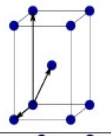
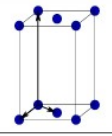
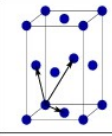
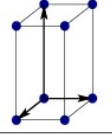
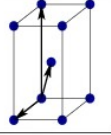
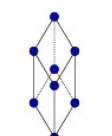
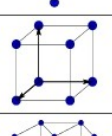
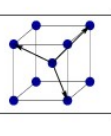
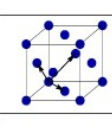
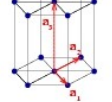
Komórkę elementarną charakteryzuje sześć parametrów sieci: okresy identyczności sieci  $a, b, c$  (osie) oraz kąty  $\alpha, \beta, \gamma$ . W zależności od kształtu komórki elementarnej wyróżniamy siedem układów krystalograficznych (Rys. 6)

- ≈ regularny (*cubic*)
- ≈ tetragonalny (*teragonal*)
- ≈ rombowy (*orthorombic*)
- ≈ heksagonalny (*hexagonal*)
- ≈ trygonalny (*trigonal*)
- ≈ jednoskośny (*monoclinic*)
- ≈ trójskośny (*triclinic*)

Sieci prymitywne, złożone z prymitywnych komórek (*primitive*, P) mają węzły tylko w wierzchołkach komórek. Sieci nieprymitywne mogą mieć węzły również na wszystkich ścianach (*face-centered*, F), dwóch przeciwległych ścianach (*side-centered*, C) lub pośrodku komórki (*body-centered*, I).

Siedem układów krystalograficznych wraz z czterema rodzajami komórek elementarnych tworzy czternaście sieci punktowych, sieci Bravais (Rys. 6)



Bravais lattice	Parameters	Simple (P)	Volume centered (I)	Base centered (C)	Face centered (F)
Triclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} \neq \alpha_{23} \neq \alpha_{31}$				
Monoclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$ $\alpha_{12} \neq 90^\circ$				
Orthorhombic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Tetragonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Trigonal	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} < 120^\circ$				
Cubic	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Hexagonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = 120^\circ$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				

Rys. 6: Sieci Bravais

W kryształach molekularnych komórki elementarne są zwykle dość duże i zawierają często więcej niż jedną cząsteczkę, co oznacza, że w kryształach jest obiekt mniejszy od komórki elementarnej, który powielany zgodnie z operacjami symetrii tworzy kryształ. Najmniejszą częścią kryształu, która powtarza się w przestrzeni jest tzw. motyw.

### 3. Budowa dyfraktometru

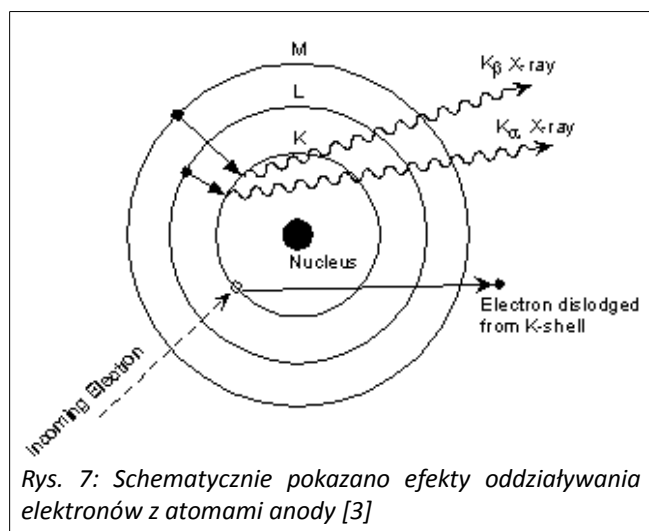
Do badań dyfrakcyjnych używa się różnego typu urządzeń, zaczynając od tzw. Kieszonkowych dyfraktometrów, a kończąc na wiązkach wytwarzanych w synchrotronach. Kluczowe elementy dyfraktometrów to źródło promieniowania rentgenowskiego, detektor przy pomocy którego rejestruje się obrazy dyfrakcyjne, goniometr, który pozwala na dowolne ustawienie kryształu względem wiązki promieniowania, oraz system kriogeniczny zapewniający utrzymanie kryształu we właściwej temperaturze. Każde z tych urządzeń wykonywane jest na wiele sposobów, rozwiązania zaprezentowane poniżej są wykorzystane są w dyfraktometrze SuperNova firmy Oxford Diffraction znajdującym się w Zakładzie Biofizyki.

#### 3.1. Źródło

Źródłem promieniowania rentgenowskiego jest lampa z nieruchomą miedzianą anodą i mikrorogniskowaniem wiązki.

Lampa rentgenowska, to próżniowa bańka w której umieszczone są katoda i anoda. Elektrony wrywane są z żarzącej się katody i przyśpieszane w polu elektrycznym. Napięcie przykładane między katodą i anodą jest rzędu kilkudziesięciu do ok 150kV. Wysokoenergetyczne elektrony uderzają w anodę, wybijając elektrony z wewnętrznych powłok. Elektrony wracając na swoje powłoki emitują kilka charakterystycznych długości fal, do badań białek wykorzystuje się przejście  $K\alpha$ , o długości fali 1,5418Å (Rys. 7). Do badania dyfrakcji małych cząsteczek częściej wykorzystuje się źródło molibdenowe o długości fali 0.7107 Å.

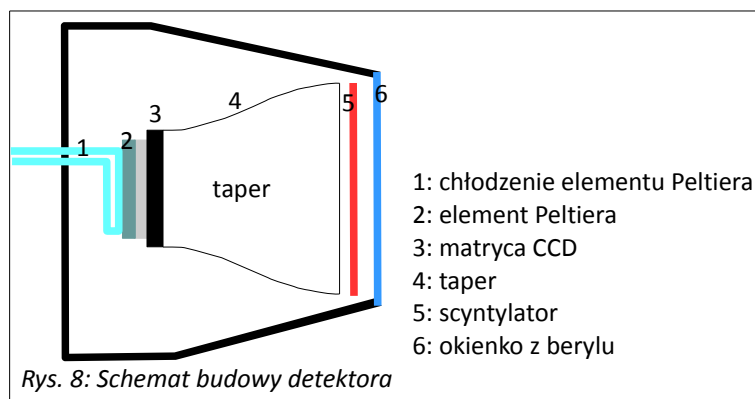
Zaledwie ok 1% energii absorbowanej przez anodę jest oddawana jako promieniowanie, reszta jest oddawana na sposób ciepła, a schłodzenie anody w próżni nie jest sprawą trywialną. Stosowane są dwa rozwiązania: wirująca anoda lub mikroogniskowanie wiązki elektronów. W przypadku wirującej anody elektrony padają na coraz to inne miejsce anody, co ogranicza jej przegrzewanie się, w przypadku mikroogniskowania wiązkę elektronów starannie się kolimuje, dzięki czemu trafia ona w obszar anody o średnicy kilkudziesięciu mikrometrów, co pozwala obniżyć jej natężenie i w ten sposób ograniczyć przegrzewanie się anody. Dodatkową zaletą mikroogniskowania jest lepsza kolimacja wiązki promieniowania rentgenowskiego wychodzącego z anody, oraz obniżenie poboru mocy i wydłużenie czasu życia lampy rentgenowskiej. Promieniowanie następnie przechodzi przez układ optyczny, który dodatkowo kolimuje wiązkę, dając wiązkę o średnicy kilkudziesięciu – kilkuset mikrometrów.



### 3.2. Detektor

Do detekcji promieniowania wykorzystywany jest licznik scyntylicyjny w połączeniu z kamerą CCD.

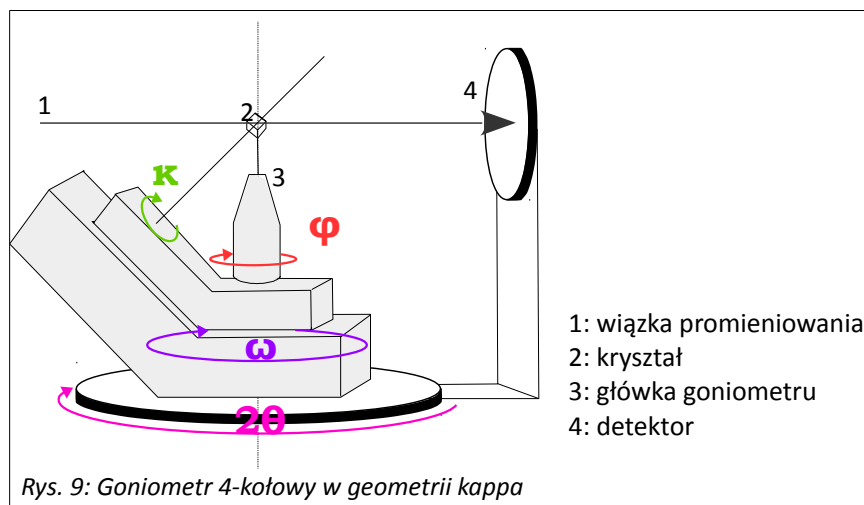
Scyntylator to substancja, która po zaabsorbowaniu kwantu promieniowania jonizującego emituje kwant promieniowania w zakresie widzialnym. Za scyntylatorem znajduje się taper, czyli element optyczny, przy pomocy którego przeskalowuje się obraz z detektora (którego średnica wynosi 135mm), na macierz kamery CCD, która ma mniejszy rozmiar. Aby ograniczyć szum matryca CCD schłodzona jest do  $-40^{\circ}\text{C}$  za pomocą elementu Peltiera. Całość również umieszczona jest w próżni. Przed scyntylatorem znajduje się okienko z berylu, który jest dobrze przezroczysty dla promieniowania rentgenowskiego.



### 3.3. Goniometr

Kryształ białka montuje się na goniometrze. Goniometr zapewnia możliwość zebrania refleksów rozproszonych we wszystkich kierunkach, ponieważ łącznie z detektorem, ma możliwość obrotu wokół czterech osi, jest to tak zwany 4-kołowy

goniometr w geometrii kappa (Rys. 9). Goniometr wyposażony jest w precyzyjne silniki krokowe, które pozwalają na precyzyjne ustawienia kryształu ok  $10\mu\text{m}$ .



Rys. 9: Goniometr 4-kołowy w geometrii kappa

Kryształ podczas pomiaru znajduje się w strumieniu gazowego azotu o temperaturze 100K.

#### 4. Zebranie danych dyfrakcyjnych

Zebranie kompletnych danych dyfrakcyjnych może polegać na zebraniu refleksów z całej sfery, ale w większości przypadków jest to niepotrzebne. Ze względu na symetrię wewnętrzną kryształu obraz dyfrakcyjny będzie się powtarzał co  $180^\circ$ ,  $90^\circ$  lub  $60^\circ$ , zatem zbieranie danych z pełnej sfery jest niepotrzebny wysiłkiem.

Dla zaprojektowania rozsądnego eksperymentu dyfrakcyjnego konieczna jest znajomość symetrii wewnątrz kryształu. Eksperyment wstępny, polega na zebraniu kilka obrazów, najczęściej dwóch z kryształem obróconym o  $90^\circ$ , to pozwala wyznaczyć symetrię kryształu, wstępnie wyznaczyć grupę przestrzenną, oszacować rozmiary komórki elementarnej. Na podstawie tych informacji planuje się eksperyment w taki sposób aby zebrać „komplet” danych pomiarowych. Np dla kryształu o sześciokrotnej osi symetrii wystarczyłoby zebrać obrazy dyfrakcyjne dla sześćdziesięciostopniowego wycinka koła. Zwykle jednak zbiera się więcej ponieważ po pierwsze nie da się ustawić kryształu w wiązce tak by zacząć „od brzegu” komórki elementarnej, zatem musimy dodać „margines” lub „zapas” najlepiej  $+30^\circ$  w obie strony, czyli już mamy  $120^\circ$ , po drugie dobrze jest zebrać pewien „nadmiar” danych bo to poprawia późniejszą statystykę wyników.

Zebranie dyfraktogramów jest ostatnim eksperymentalnym elementem rozwiązywania struktury, wszystkie kolejne etapy to obliczenia komputerowe.

#### 5. Rozwiązanie struktury

Do rozwiązania struktury zostanie wykorzystany program AutoChem i Olex2.

#### 6. Bibliografia

- [1] University of Cambridge, Cambridge Institute for Medical Research (CIMR), Protein Crystallography Course, <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/course.html>
- [2] Yuan Ming Huang, Solid State Physics: Miller indices, <http://www.lcst-cn.org/Solid%20State%20Physics/Ch16.html>
- [3] Stephen A. Nelson, X-Ray Crystallography, <http://www.tulane.edu/~sanelson/eens211/x-ray.htm>
- [4] Maurice Van Meerssche, Janine Feneau-Dupont: Krystalografia i chemia strukturalna, PWN, Warszawa 1984.
- [5] C. Giacovazzo: Fundamentals of crystallography, Oxford : Oxford Univ. Press, 2002.

## 7. Literatura uzupełniająca

- C. Giacovazzo: Fundamentals of crystallography, Oxford : Oxford Univ. Press, 2002.

## 8. Zagadnienia do kolokwium wstępnego

- Oddziaływanie światła z materią – dyfrakcja i interferencja
- Budowa kryształów, symetrie kryształów.
- Co widać na obrazach dyfrakcyjnych?
- Problem faz i metody rozwiązania problemu faz.
- Udokładnianie i walidacja struktury.

## 9. Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest rozwiązanie struktury małej cząsteczki, np. sacharozy.

Kryształy zostaną uzyskane wcześniej. Podczas ćwiczenia po wizualnej inspekcji zostaną wybrane najlepsze kryształy, zabrane dane dyfrakcyjne i rozwiązana struktura przy pomocy programów Autochem i Olex2.



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY

