

# **ROZPTYLOVÉ a EMISNÍ metody**

- Rayleighův rozptyl**
- kvazielastický rozptyl**
- Ramanův rozptyl**
  
- fluorescence**
- fosforescence**

# **ROZPTYLOVÉ a EMISNÍ metody**

## **- TEORETICKÉ ZÁKLADY rozptylových jevů**

- ↳ pozorování rozptylu na heterogenitách
- ↳ závislost intenzity rozptylu na vlnové délce
- ↳ energie dopadajícího a rozptýleného fotonu
  - ↳ změna energie rozptylujícího objektu
    - ↳ kvazielastický rozptyl
      - ↳ velikost makromolekul, koloidních částic
    - ↳ Ramanův rozptyl
      - ↳ struktura molekul, krystalů, supramolekul

# **Ramanova spektroskopie**

***Každá čára Ramanova spektra  
je svými vlastnostmi závislá  
na počtu a hmotě společně kmitajících atomů  
molekuly,  
na jejich prostorovém uspořádání a  
na vnitřně molekulovém silovém poli.***

***Je zřejmé,  
že Ramanových spekter lze použít analyticky,  
zvláště při řešení některých, chemicky těžko  
dokazovatelných rozdílů konstitučních.***

***Prof. Dr. Arnošt Okáč  
Výklad k základním operacím v chemické analýze  
JČMF 1948***

# Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

## Podstata Ramanova jevu

### ROZPTYL ZÁŘENÍ

- rozptýlený foton má odlišnou energii oproti dopadajícímu

zářivý dvoufotonový přechod

mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly,

jejichž energie jsou  $E_1$  a  $E_2$ ,

vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření

o frekvenci  $\nu_0 > |E_2 - E_1| / h$ ,

provázený vyzářením rozptýleného fotonu

o energii  $h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1)$ ,

kde  $h\nu_{\text{vib}} = E_2 - E_1$

# Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

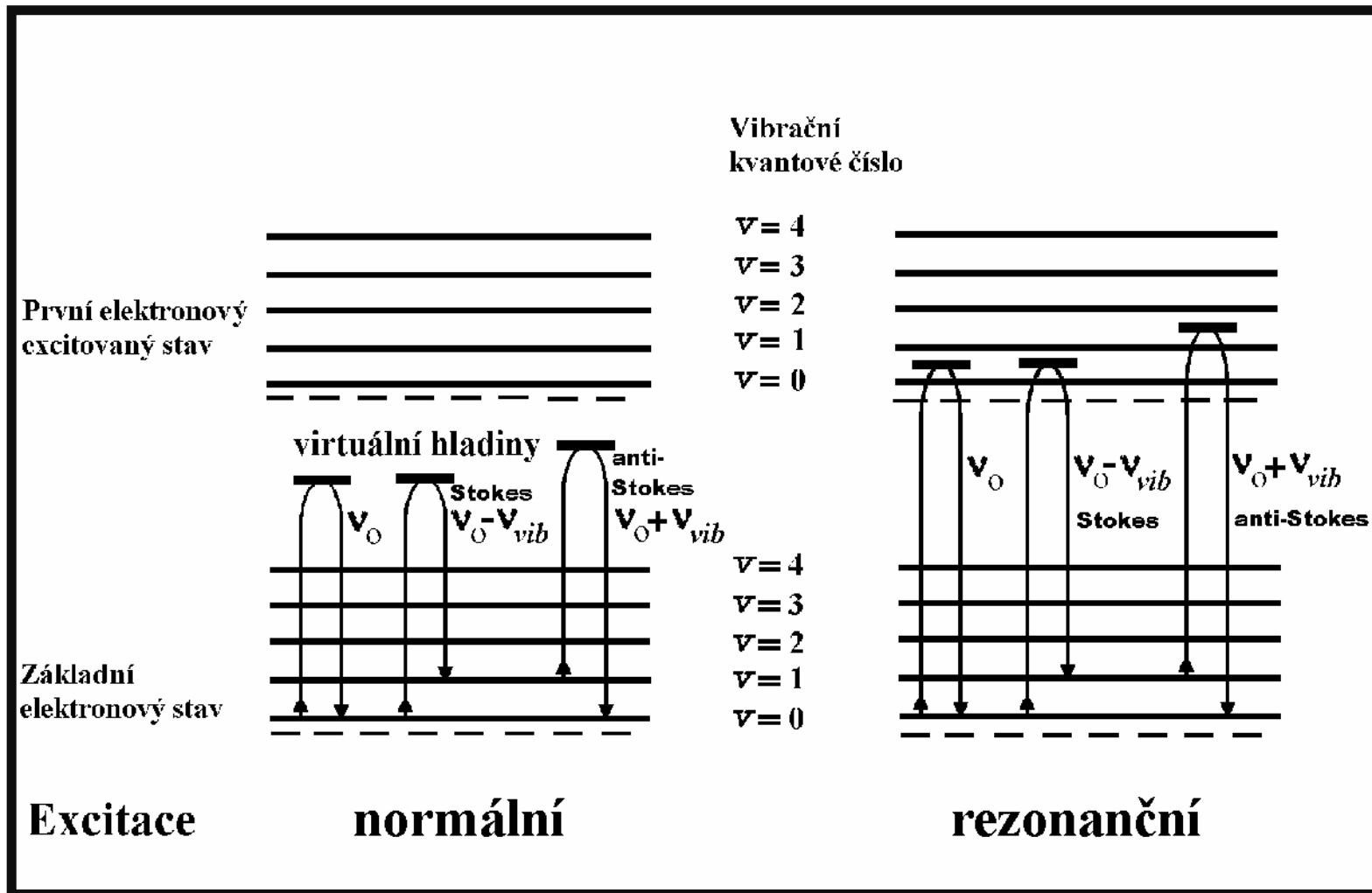


Schéma dvoufotonových přechodů

Ramanův a Rayleighův rozptyl při excitaci normální a rezonanční

# **Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie**

## **Základní výběrové pravidlo Ramanova rozptylu**

**změna polarizovatelnosti během vibračního pohybu**

$$\frac{\partial \alpha}{\partial q} \neq 0$$

# Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

Vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na  
tom, zda je studujeme infračervenou  
nebo Ramanovou spektroskopií,  
  
avšak intenzity spektrálních linií  
budou pro obě spektroskopické techniky  
zřetelně odlišné.

# Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

V Ramanově spektru je intenzita pásů  
úměrná

druhé mocnině změny polarizovatelnosti

během vibračního pohybu

$$(\delta\alpha/\delta q)^2,$$

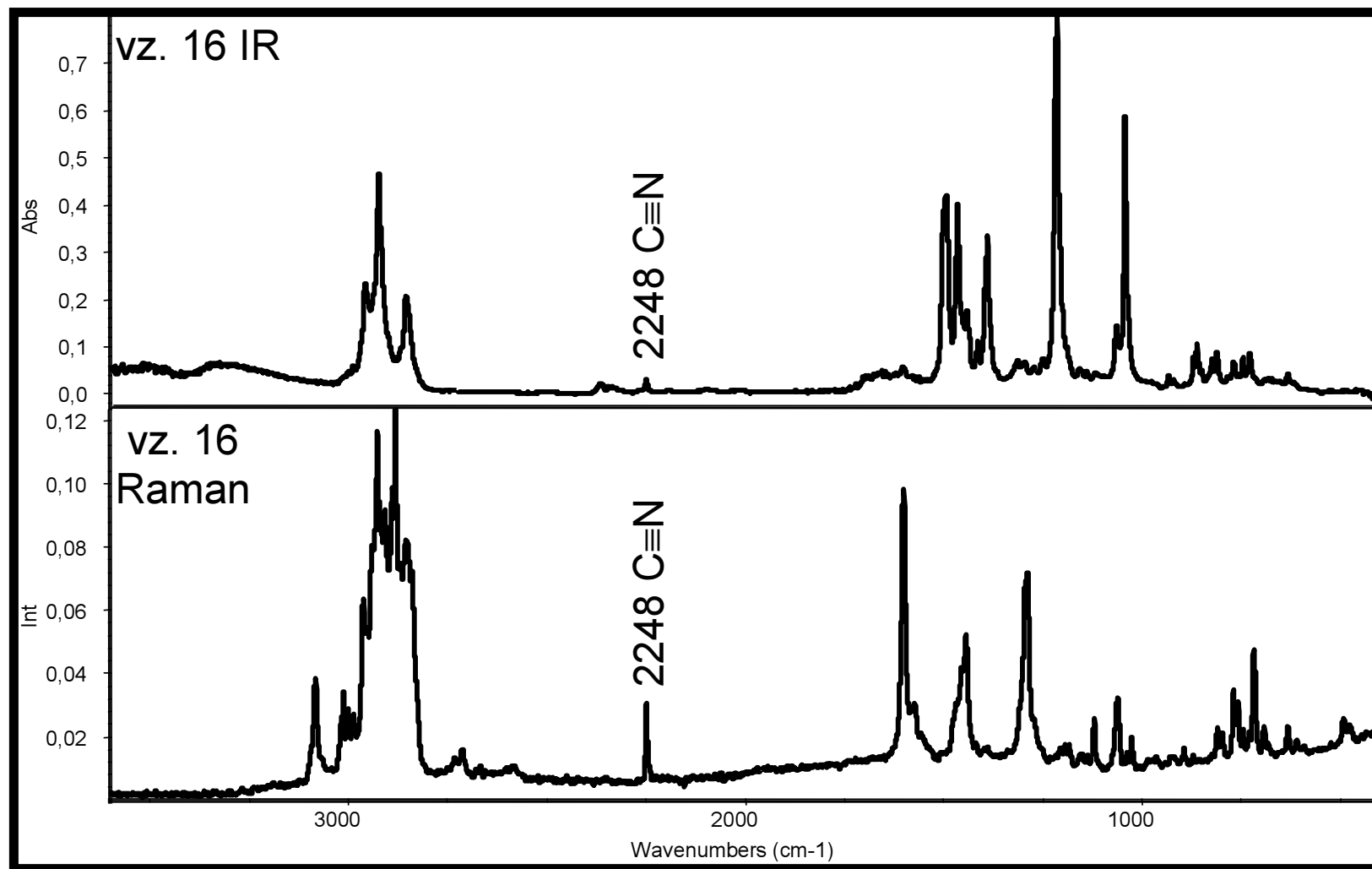
zatímco v infračerveném spektru

je úměrná

druhé mocnině změny dipólového momentu.



# Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

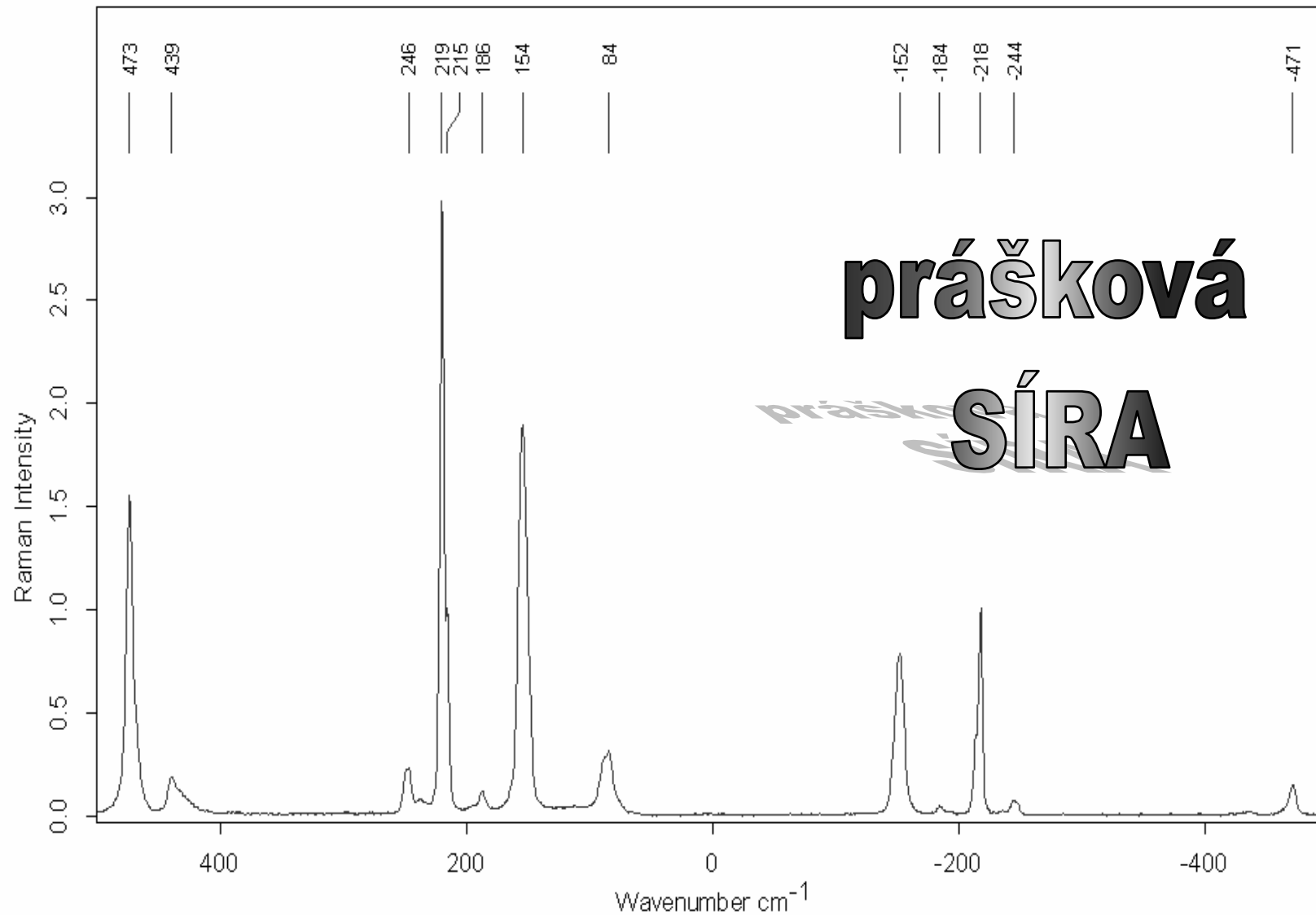


# Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

**Vztah intenzity pásů**  
**- možnost měření teploty vzorku**

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left( \frac{\nu_0 + \nu_{\text{vib}}}{\nu_0 - \nu_{\text{vib}}} \right)^4 e^{-\frac{h \nu_{\text{vib}}}{k T}}$$

# Principy Ramanovy spektroskopie



# Experimentální výhody

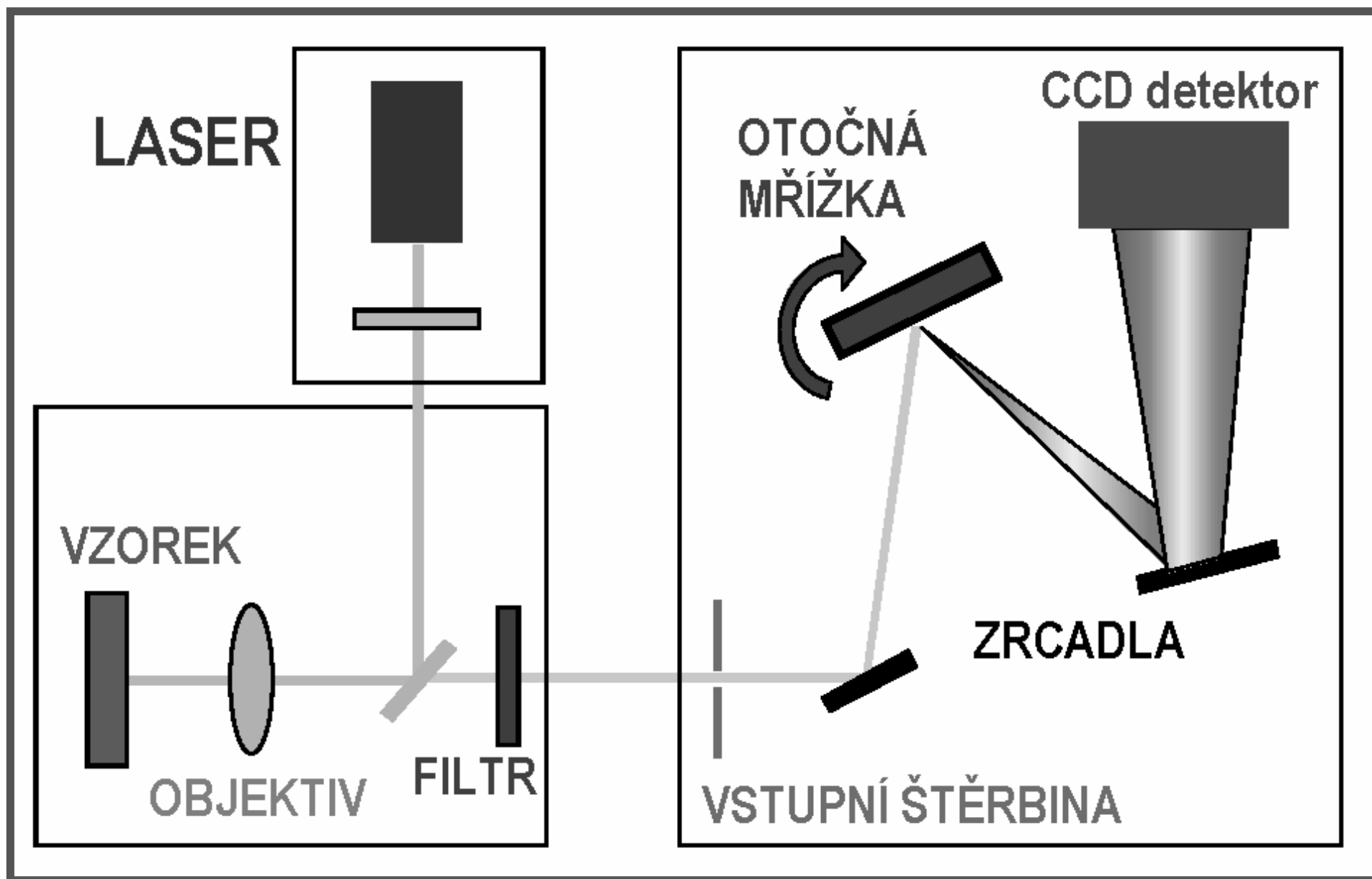
- **možnost měření ve vodném prostředí**
  - ↳ nízká intenzita Ramanova rozptylu pro vodu
  - ↳ používané optické materiály nejsou citlivé na vlhkost
- **možnost měření ve skleněných nádobách**
  - ↳ měření v uzavřených ampulích - např. pod vakuem
- **snadné využití skelné vláknové optiky**
- **minimální požadavky na úpravu pevných vzorků**
- **intenzivní pásy -C=C-, -N=N-, -S-S- a dalších symetrických vibrací**

# Instrumentace

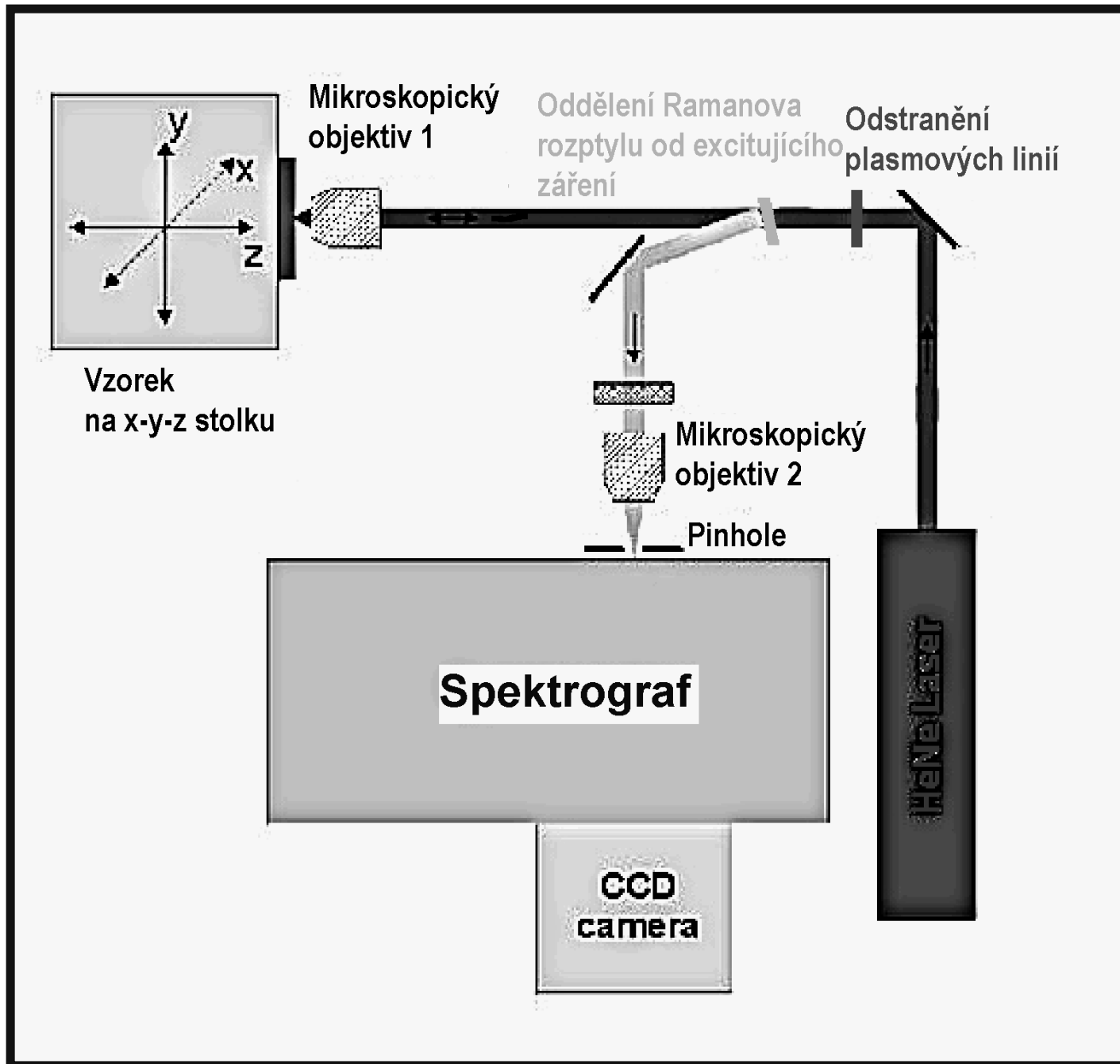
## Lasery pro excitaci Ramanova jevu

<u>TYP laseru</u>	<u>vlnová délka [nm]</u>
He-Ne	632,8
Ar <sup>+</sup>	514,5
Ar <sup>+</sup>	488,0
Ar <sup>+</sup>	457,9
Kr <sup>+</sup>	568,2
Kr <sup>+</sup>	647,1
Kr <sup>+</sup>	676,4
Kr <sup>+</sup>	752,6
Nd-YAG	1064
Nd-YAG - 2f	532
diodové	780, 785 - NIR
barvivové	360 - 750 - UV, vis

# Schéma Ramanova disperzního přístroje



# Schéma Ramanova mikroskopu



# Externí sondy připojené pomocí vláknové optiky



**Křemenná vlákna**

**Fokusační zrcadla**

**Vysoce světelné  
objektivy**

**z kvalitního optického  
skla**

**Mobilní přístroje**



# Principy FT Ramanovy spektroskopie

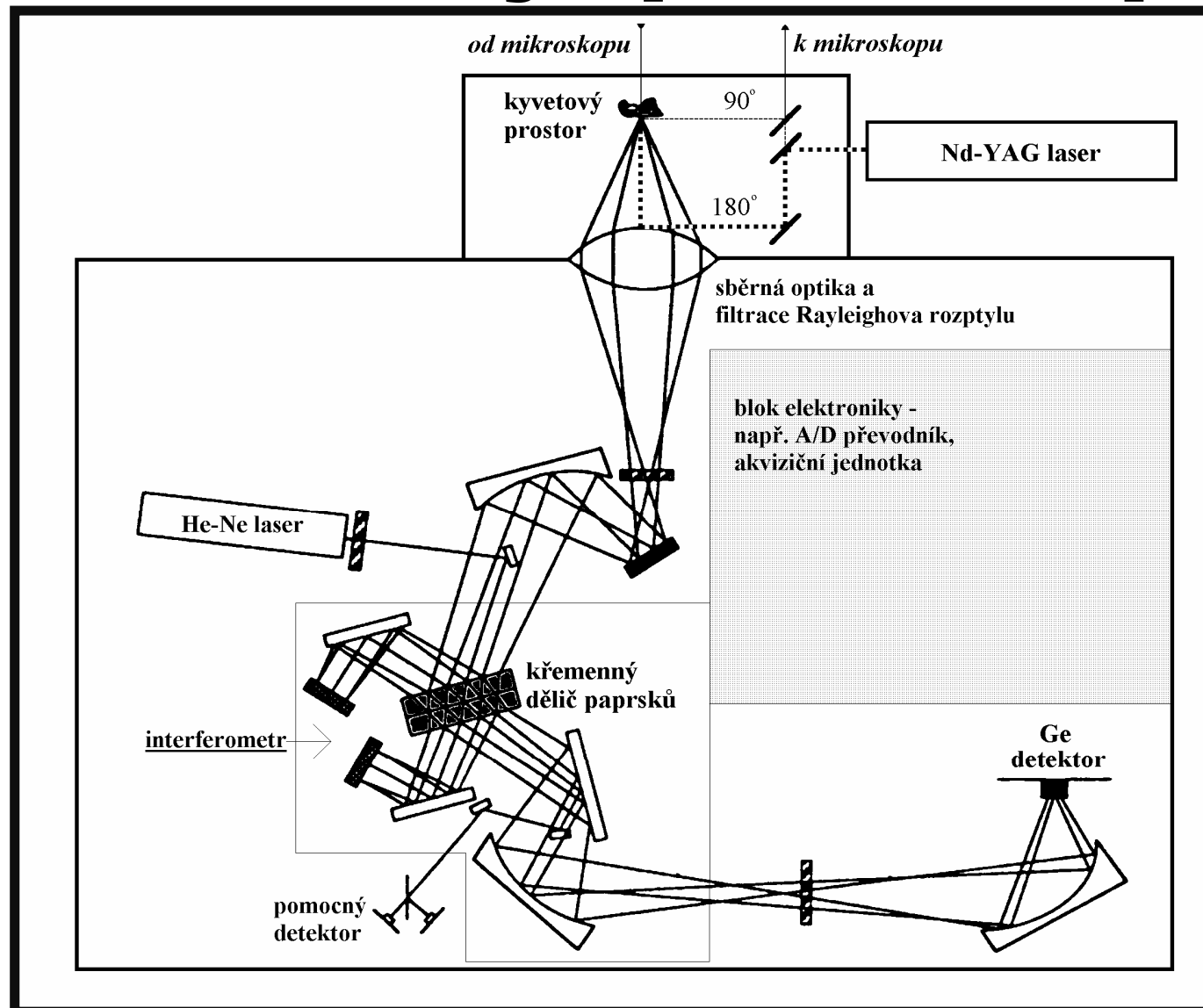


Schéma FT Ramanova spektrometru s NIR excitací

# Instrumentace

## Materiály pro dělič paprsků

<u>Propustný materiál</u>	<u>Polopropustný povlak</u>	<u>rozsah použití</u> [cm <sup>-1</sup> ]
křemen	Si (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	23 000 – 4 000
CaF <sub>2</sub>	Si (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	10 000 – 1 000
KBr	Ge	4 700 – 350
CsI	Ge	4 000 – 200

# Speciální techniky

- **rezonanční - RR**
- **povrchem zesílený - SERS**
- **rezonanční povrchem zesílený - SERRS**
- **fotoakustický - PARS**
- **hyperRaman**
- **koherentní anti-Stokes - CARS**
- **koherentní Stokes - CSRS**

# Studované materiály

## VZORKY

- **anorganické - *korozní vrstvy***
  - povrchy pevných disků, křemík
  - *amorfní uhlík, diamanty*
- **organické - *supramolekulární systémy***
  - systémy na nosičích
- **polymery - *fotolabilní materiály***
- **biologické - *in vitro, in vivo***
- **geologické - *minerály, horniny***
- **archeologické - od paleolitu po novověk**

# Studované materiály

<b>GEMMORAMAN</b>	<b>- 1980</b>	<b>drahokamy</b>
<b>FRESCORAMAN</b>	<b>- 1980</b>	<b>anorg. barviva</b>
<b>ICONORAMAN</b>	<b>- 1985</b>	<b>org. barviva</b>
<b>PETRORAMAN</b>	<b>- 1995</b>	<b>kameny</b>
<b>RESINORAMAN</b>	<b>- 1995</b>	<b>amorf. org. m.</b>
<b>TISSUERAMAN</b>	<b>- 1997</b>	<b>tkáně</b>
<b>CERAMORAMAN</b>	<b>- 1998</b>	<b>keramika</b>
<b>METALLORAMAN</b>	<b>- 1999</b>	<b>koroze kovů</b>
<b>VITRORAMAN</b>	<b>- 1999</b>	<b>skelný stav</b>
<b>CLIMATORAMAN</b>	<b>- 1999</b>	<b>vlivy klimatu na m.</b>

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

Ramanova spektrometrie -

**ANALÝZA MATERIÁLŮ - polovodiče**

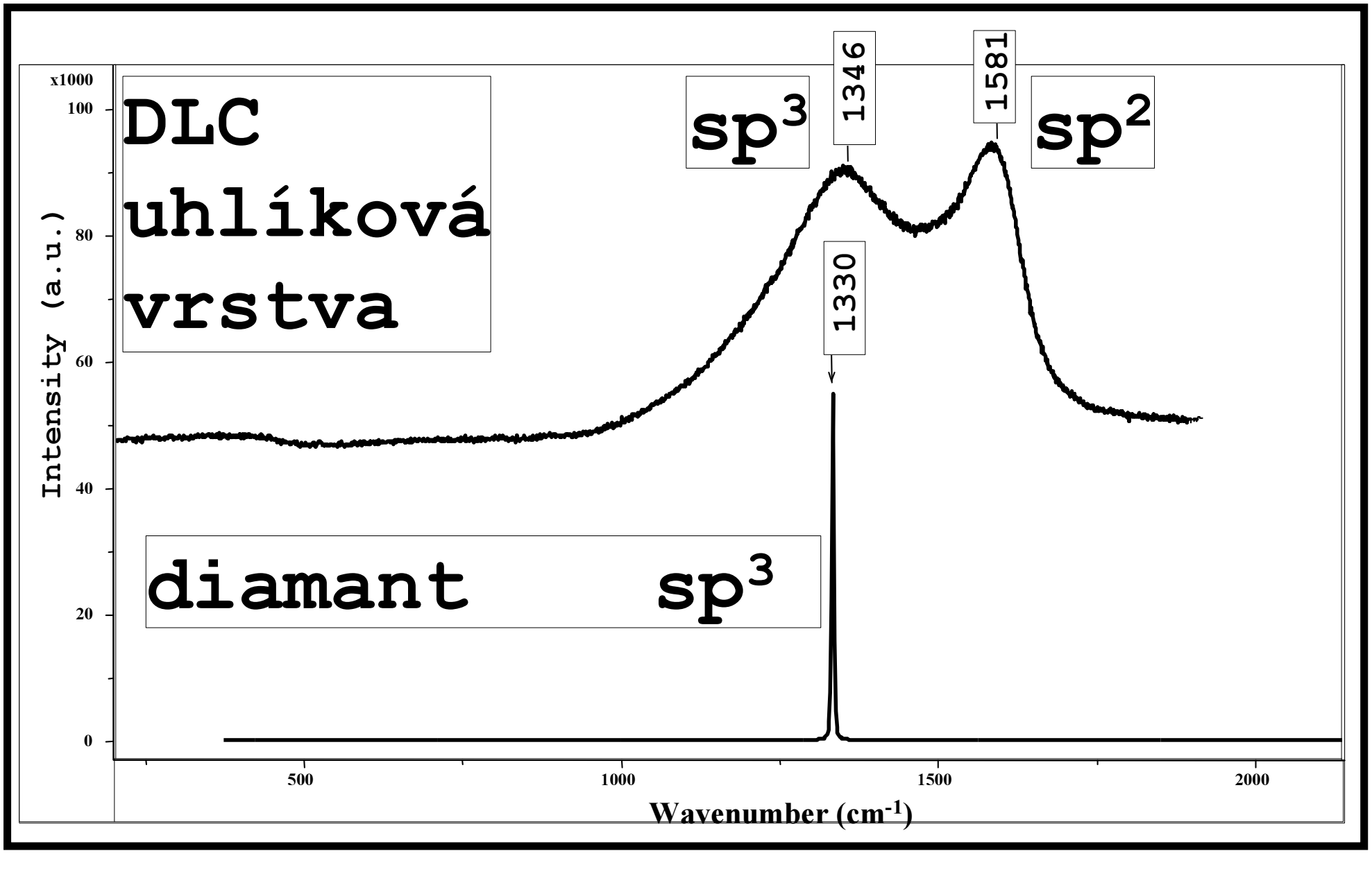
**- kontrola povrchu pevných disků, Seagate 1992**

**- magnetických hlav**

**- uhlíkové materiály**



# Analýza uhlíkatých materiálů



# **Kvantitativní spektrometrie**

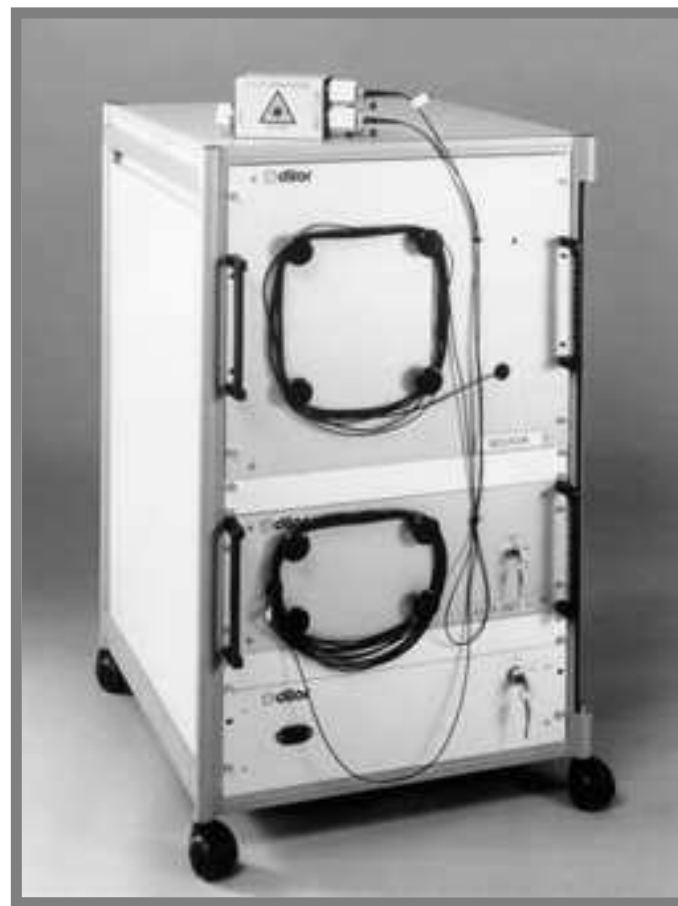
## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

Ramanova spektrometrie -

**ANALÝZA ropných produktů -**

**stanovení oktanového čísla**

**analýza automobilových olejů**





# **Kvantitativní spektrometrie**

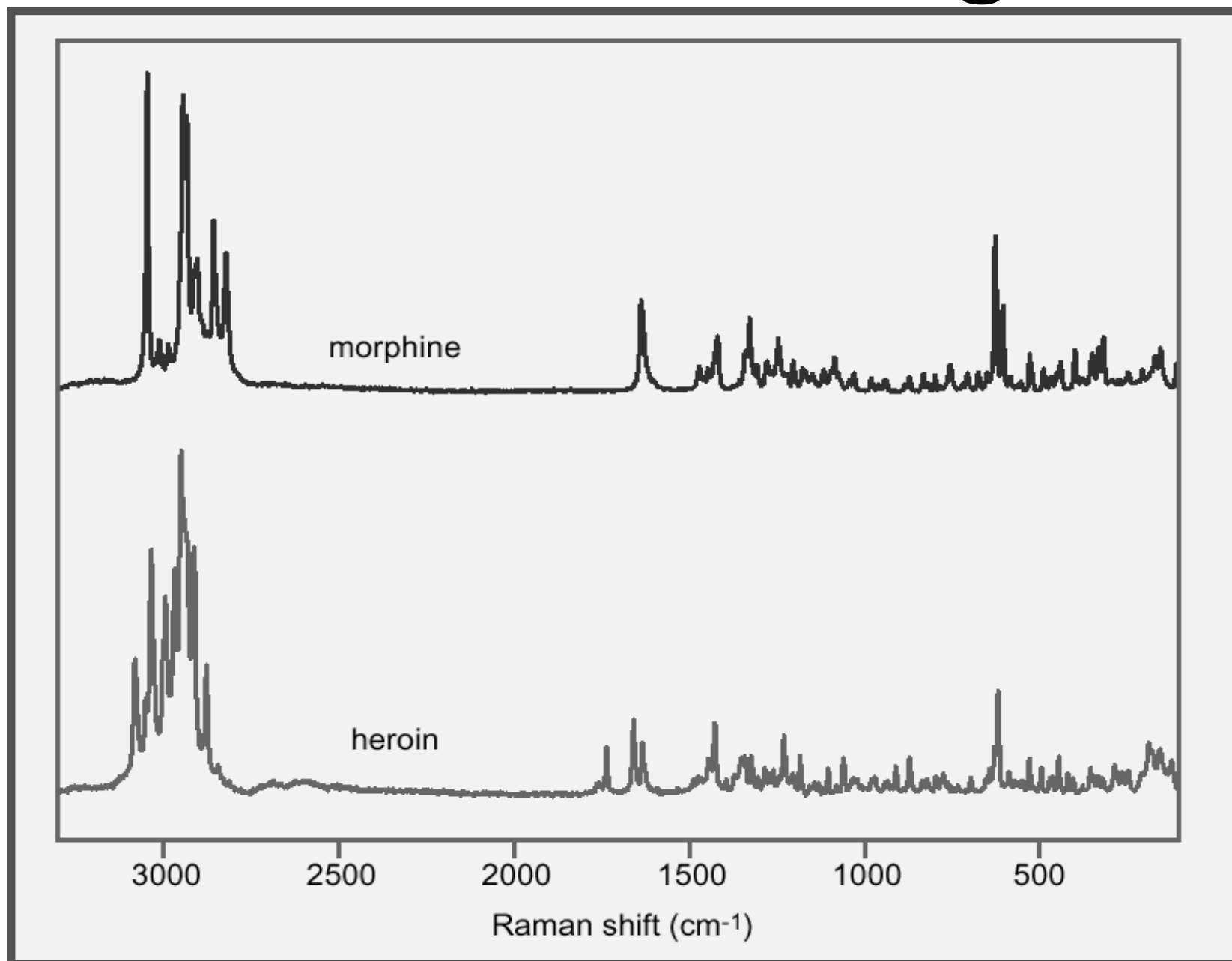
## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

**FT Ramanova spektrometrie -**

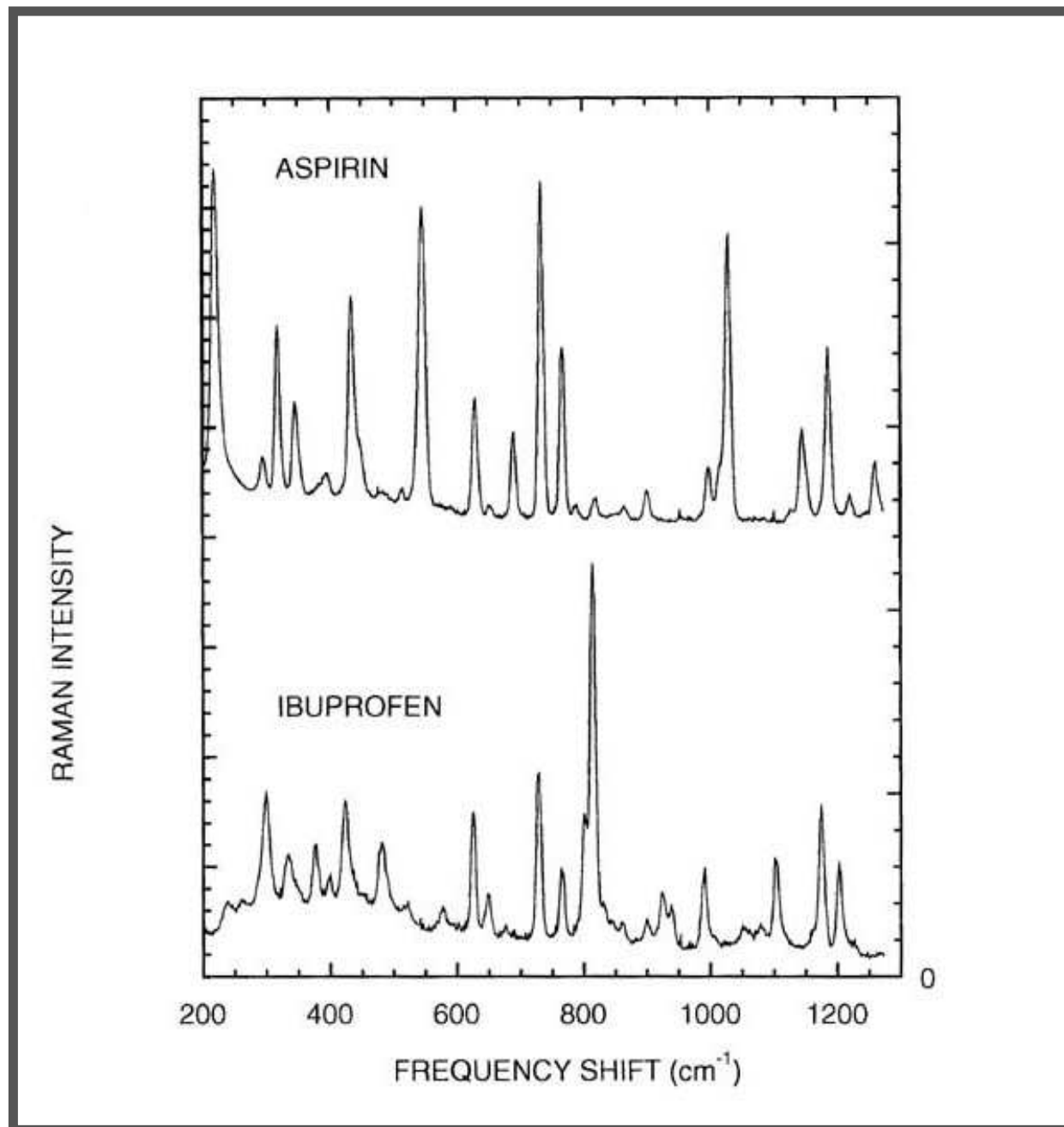
**ANALÝZA ropných produktů - stanovení  
oktanového čísla**

- analýza automobilových olejů**
- stanovení obsahu alkoholu**
- kontrola biotechnologií**
- analýza ve farmaceutickém  
průmyslu**

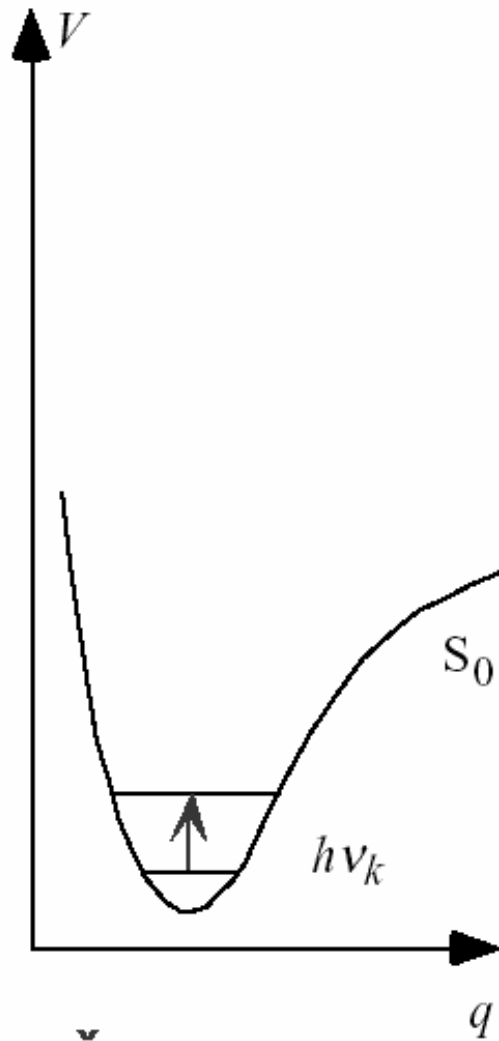
# Identifikace drog



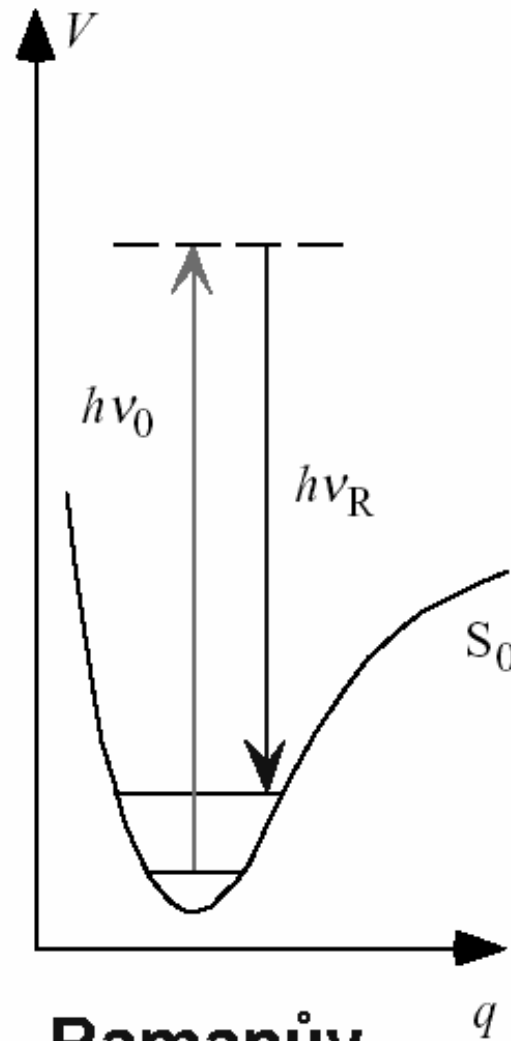
# Identifikace léčiv



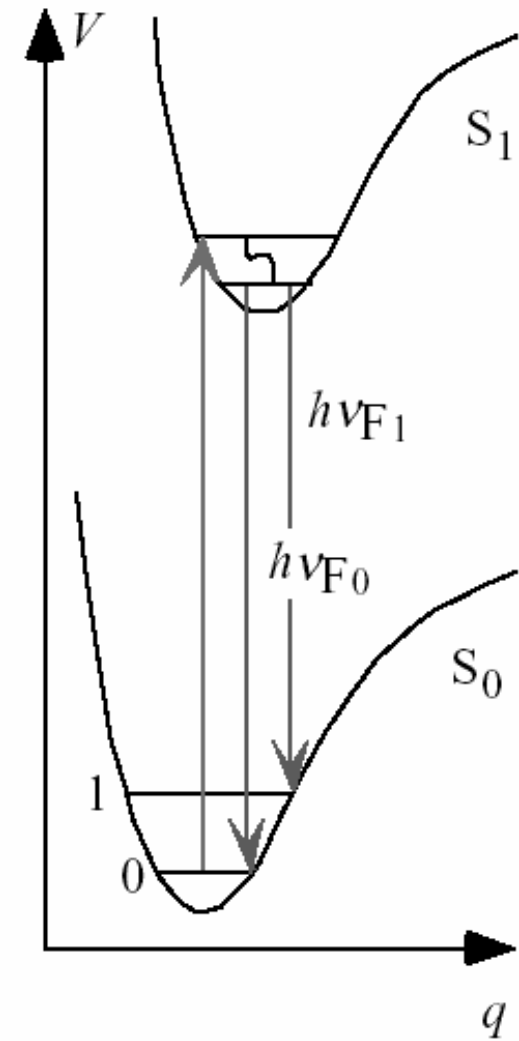
# Fluorescence



IČ absorpce

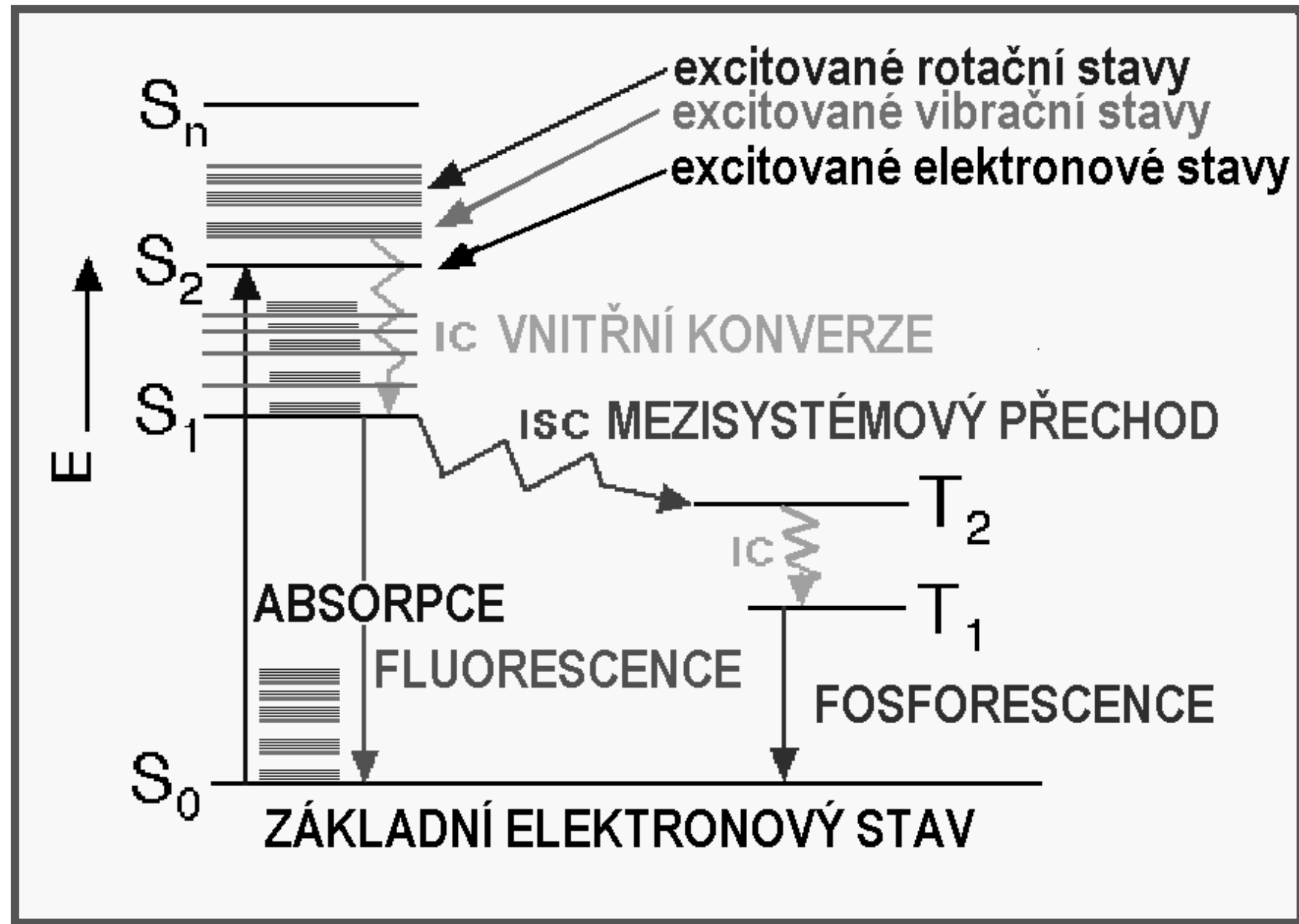


Ramanův rozptyl



Fluorescence

# Fluorescence a fosforescence



# **Fluorescence a fosforescence**

- **FLUORESCENCE**

- **luminiscence s krátkým dosvitem**

- **spinově dovolený přechod - bez změny orientace elektronového spinu**

- **FOSFORESCENCE**

- **luminiscence s dlouhým dosvitem**

- **spinově zakázaný přechod - změna orientace elektronového spinu**
  - **možný díky spin-orbitální interakci**

# Fluorescence a fosforescence

- **DOBA ŽIVOTA EXCITOVANÉHO STAVU**
  - kinetika „zániku“ excitovaného stavu
- **INTENZITA fluorescence a fosforescence**
  - **KVANTOVÝ VÝTĚŽEK**

$$\varphi = N_F / N_{\text{ABS}}$$

- počet vyzářených fotonů vůči počtu absorbovaných
- **VLIV NEZÁŘIVÝCH PROCESŮ** - intra- a inter-molekulárních

# Fluorescence a fosforescence

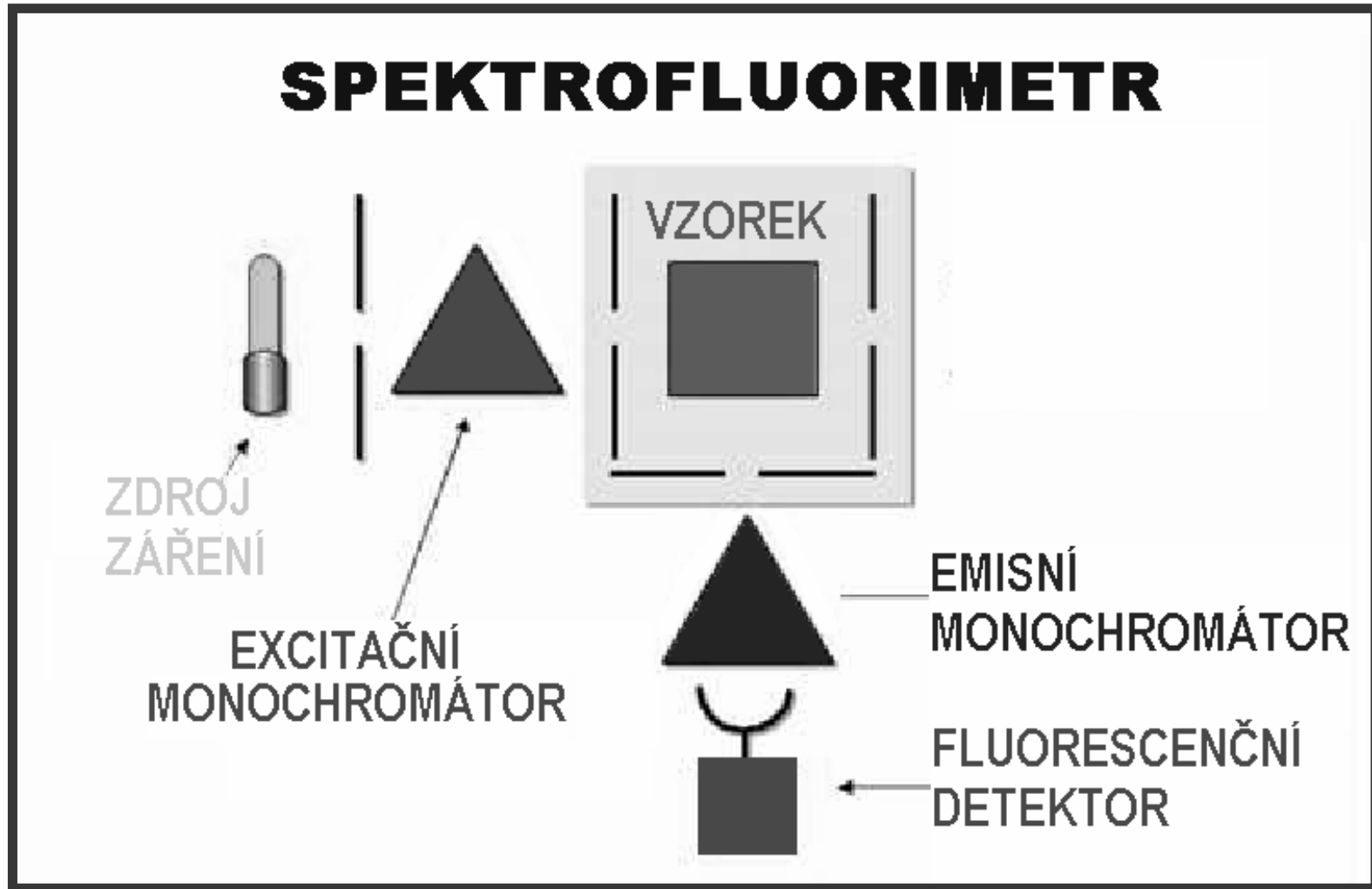
- **STRUKTURA MOLEKULY**
  - dvojn  vazby - aromáty, konjugované C=C
  - heteroatomy - C=O, dus kat  heterocykly
  - VLIV SUBSTITUENTŮ - -OH, -NO, -NO<sub>2</sub> ...
  - RIGIDITA struktury  $\pi$ -elektronového systému
  - CHELÁTY
- **MEZIMOLEKULOVÉ INTERAKCE**
  - p edev m zhášení luminiscence
  - vliv pH, teploty, viskozity, polarita rozpouštědla



# Fluorescence a fosforescence

- **MĚŘENÍ STACIONÁRNÍCH SPEKTER**

– spektrofluorimetr



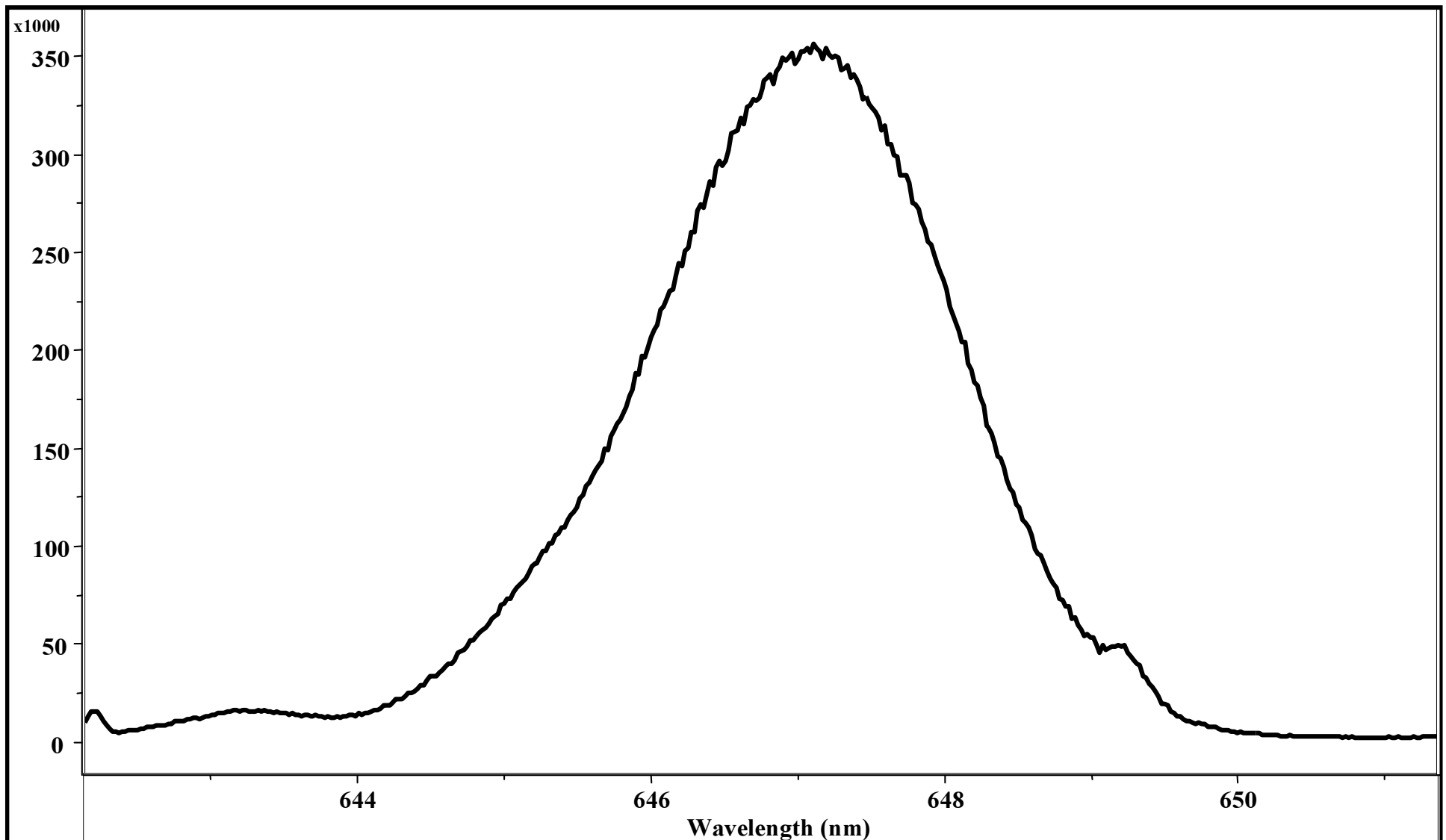
# MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- VIS a UV oblast - fluorescence a fosforescence



# MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

- VIS a UV oblast - fluorescence a fosforescence



# **Fluorescence a fosforescence**

## **• MĚŘENÍ STACIONÁRNÍCH SPEKTER**

### **– spektrofluorimetr**

- zdroj záření - xenonová výbojka**
  - nízkotlaká rtuťová výbojka**
- křemenné kyvety**
- mřížkové monochromátory**
- detektor - fotonásobič**

### **– excitační a emisní spektra**

- excitační - změna vlnové délky excitujícího záření**  
**konstantní  $\lambda$  emisního toku**
- emisní - fixovaná  $\lambda$  excitujícího záření**  
**proměnná  $\lambda$  emisního toku**

# **Fluorescence a fosforescence**

- **STACIONÁRNÍ SPEKTRA**

- knihovny spekter

- charakteristická spektra polyaromatických uhlovodíků
    - charakteristická spektra fluorescenčních indikátorů

- **ČASOVĚ ROZLIŠENÁ SPEKTRA**

- měření doby života excitovaných stavů

- snazší u fosforescence
    - obtížnější u fluorescence - studium přenosu energie

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

### **MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie**

- VIDITELNÁ a UV oblast - fluorescence a fosforescence**
  - stacionární spektra
  - pásové spektrum - malý počet širokých pásů
  - kvantový výtěžek fluorescence
  - samoabsorpce
  - zhášení rozpouštědlem či „zhášedly“

### **STANOVENÍ NÍZKÝCH OBSAHŮ PŘEDEVŠÍM ORGANICKÝCH LÁTEK**

$$\Phi_F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-\epsilon b c})$$

# **Kvantitativní spektrometrie**

- **specifické aspekty jednotlivých metod**

## **MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie**

- **VIDITELNÁ a UV oblast** - fluorescence a fosforescence
  - stacionární spektra

## **PŘÍMÉ METODY - stanovení PAH**

- **stanovení hemoproteinů**
- **stanovení vitamínů**
- **stanovení steroidů**

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **- specifické aspekty jednotlivých metod**

### **MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie**

- VIDITELNÁ a UV oblast - fluorescence a fosforescence**
  - stacionární spektra**

### **NEPŘÍMÉ METODY - tvorba chelátů - např. s morinem**

- stanovení hliníku**
- stanovení aniontů na principu  
zhášení fluorescence**
- stanovení na základě reakce  
provázené vznikem fluoreskujícího produktu**



# **Kvantitativní spektrometrie**

## **Klíčový požadavek**

- vyjádřit **VZTAH MEZI KONCENTRACÍ (OBSAHEM) ANALYTU a SPEKTRÁLNÍ VELIČINOU**
  - matematické vyjádření
  - experimentální kalibrace a validace (externí standardy, metoda standardního přídatku)

**SPEKTRÁLNÍ VELIČINA – absorpční metody**

**OPTICKÉ METODY**

- emisní metody
- rozptylové metody
- reflexní metody

# **Metody kalibrace**

## **Důležité pojmy**

- **Metoda kalibrační křivky (external standards)**
  - připravíme sérii kalibračních roztoků stanovovaného analytu, pokrývající zamýšlený koncentrační rozsah
  - snažíme se, aby bylo stejné složení matrice jako u vzorku
  - předpokládáme, že vliv matrice je zanedbatelný
  - (když je rozsah koncentrací analytu omezen, vystačíme třeba i s dvěma standardy - „pod“ a „nad“ vzorky)

# **Metody kalibrace**

## **Důležité pojmy**

- **Metoda standardních přídavků (internal standards)**
  - použitelná v případě, že je nemožné potlačit interference matrice
  - ke změřenému vzorku je přidáno malé množství roztoku standardu a stanovení se opakuje za maximálně možných stejných podmínek
  - metoda je mnohem náročnější na množství práce, vhodná pro ověření vlivu matrice

# Metody kalibrace

## Důležité pojmy

- **Metoda vnitřního standardu**
  - do všech analyzovaných vzorků i kalibračních (validačních) roztoků je přidáno stejné množství vhodné čisté látky odlišné od analytu
  - jako kalibrační křivku vynášíme poměr odezvy analyt/standard proti koncentraci analytu ve standardních roztocích
  - vnitřní standard by měla být látka podobná analytu, jejíž signál však neinterferuje se signálem analytu

# **Kvantitativní spektrometrie**

**ATOMOVÁ EMISNÍ spek.** – emisní metoda

**ATOMOVÁ ABSORPČNÍ spek.** – absorpční metoda

**MOLEKULOVÁ spek.**

**UV, vis** – absorpční metoda, (*reflexní metoda*)

– luminiscence – emisní metoda

**NIR** – absorpce, reflexe

**MIR, FIR** – absorpce, reflexe

**Raman** – rozptyl

**NMR spektrometrie, hmotnostní spektrometrie**

# **Kvantitativní spektrometrie**

**SPEKTRÁLNÍ VELIČINA – pro absorpční metody**

- absorpce fotonů – závisí na množství  
excitovatelného analytu

**DŮLEŽITÉ FAKTORY**

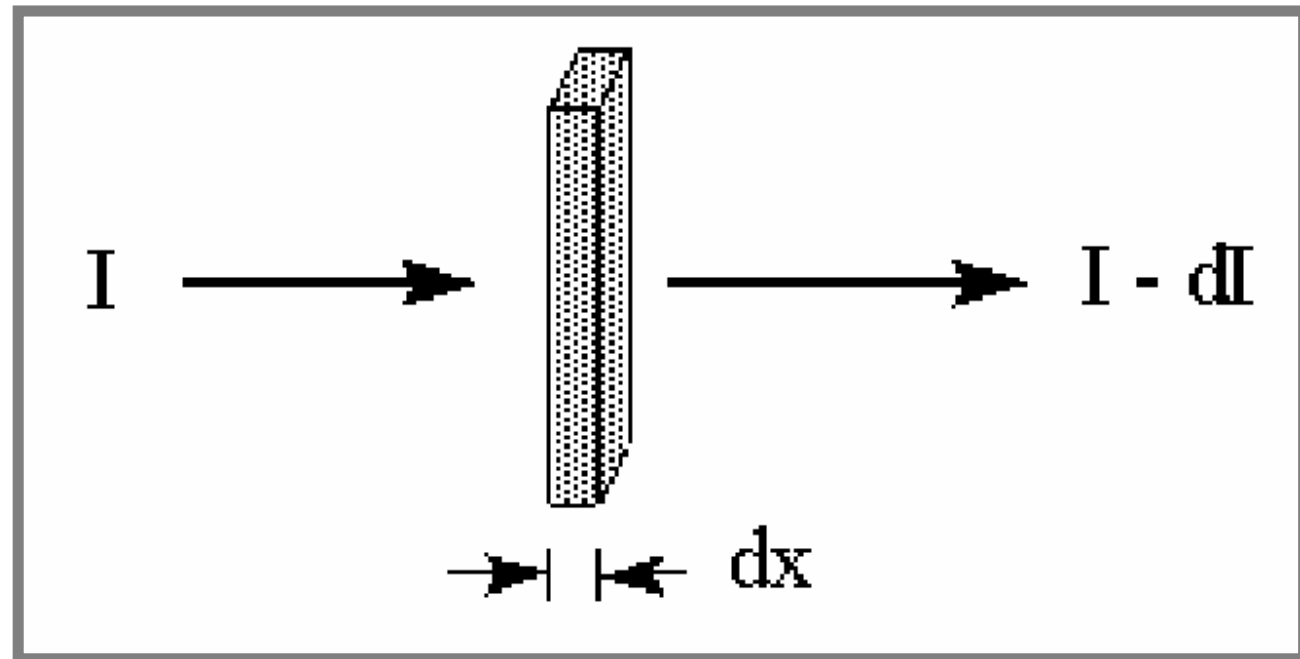
- vstupní tok záření
- tloušťka absorbující vrstvy
- absorpční koeficient
  - napierovský, dekadický
  - molární absorpční koeficient -
    - napierovský, dekadický

# Kvantitativní spektrometrie - vztah k tloušťce vrstvy

Bouguer (1729), Lambert (1760)

$$-dI = k I dx$$

$$-\frac{dI}{I} = k dx$$



$$-\frac{dI}{I} = k dx$$

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = k b$$

# Kvantitativní spektrometrie

## - vztah ke koncentraci

Beer (1852) - vyjádření vztahu pro  $k$

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \left(\frac{k}{2.303}\right)b$$

$$\left(\frac{k}{2.303}\right) = a$$

dekadický absorpční  
koeficient

$$a = \varepsilon c$$

(dekadický) molární  
absorpční koeficient

$$-\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\log T = A$$

$$A = \varepsilon b c$$



# Kvantitativní spektrometrie

SPEKTRÁLNÍ VELIČINA – pro absorpční metody

- ABSORBANCE

DŮLEŽITÉ FAKTORY

- vlnová délka vstupního záření

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} b c$$

- eliminace jiných optických jevů - rozptyl, odraz, lom, fluorescence ...

- eliminace saturačního efektu

- směs analytů

$$(A_{\lambda})_i = (\varepsilon_{\lambda})_i b c_i$$

$$A = \sum_{i=1}^N (A_{\lambda})_i$$

# Kvantitativní spektrometrie

## ABSORPČNÍ METODY

- efekty ovlivňující hodnotu

molárního absorpčního koeficientu

$$\left( \varepsilon_{\lambda} \right)_i$$

## DŮLEŽITÉ FAKTORY

- závislost na vlnové délce vstupního záření
- chemické reakce analytu
- mezimolekulové interakce s rozpouštědlem
- mezimolekulové interakce s jinými analyty
- vliv teploty na stabilitu analytu

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **ABSORPČNÍ METODY**

**- ABSORBANCE - neměříme před a za vzorkem,**

**ale SE VZORKEM a BEZ VZORKU**

**- jednopaprskové a dvoupaprskové uspořádání**

**- pásové spektrum - výška píku**

**- plocha píku**

**- KOREKCE POZADÍ - vlivy matrice, další vlivy**

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **SPEKTRÁLNÍ VELIČINA – emisní metody**

- **emise fotonů – závisí na množství excitovaného analytu**

## **EMITOVANÝ ZÁŘIVÝ TOK úměrný KONCENTRACI analytu**

- *celkové množství analytu ve vzorku*
- *způsob excitace*
- *možnosti nezářivé deexcitace*
- *rušivé emisní procesy*
- *rušivé absorpční procesy (samoabsorpce)*
- *závislost na vlnových délkách*

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **SPEKTRÁLNÍ VELIČINA – reflexní metody**

- počet odražených fotonů úměrný koncentraci
  - závisí na množství ozářeného analytu
    - *celkové množství analytu ve vzorku*
    - *reflektivita vzorku a dalších materiálů*
    - absorpce záření během odrazu
    - *lom dopadajícího záření / totální odraz*

# **Kvantitativní spektrometrie**

**SPEKTRÁLNÍ VELIČINA – rozptylové metody**

- počet rozptýlených fotonů úměrný koncentraci  
(Ramanův rozptyl, nefelometrie)

- zeslabení transmitovaného toku záření  
(turbidimetrie)

- závisí na množství excitovaného (ozářeného) analytu

- *celkové množství analytu ve vzorku*

- *způsob excitace*

- *rušivé emisní procesy - LUMINISCENCE*

# **Kvantitativní spektrometrie**

## **SPEKTRÁLNÍ DATA vs. KONCENTRACE**

- kalibrace, validace, měření neznámých vzorků
- zpracování dat - regresní metody
  
- postupy kalibrace - sada nezávislých roztoků
  - metody standardního přídavku
- zpracování kalibračních dat - *jeden analyt*
  - *více sledovaných analytů*

# **Kvantitativní spektrometrie**

**Zpracování kalibračních dat - *jeden analyt***

**- *více sledovaných analytů***

**- univariátní a multivariační metody**

- zpracování úseků spekter či celých spekter

- analýza složitých směsí



# **Kvantitativní spektrometrie**

- **CLS - classical least squares**
- **ILS - inverse least squares**
- **MLR - multiple linear regression**
- ***(PCA - principal component analysis)***
- **PCR - principal component regression**
- **PLS1 - partial least squares 1**
- **PLS2 - partial least squares 2**

# Regrese CLS

- klasická metoda nejmenších čtverců  
- „K-matrix“
- předpoklad platnosti  
Lambertova - Beerova zákona  
při všech vlnových délkách (frekvencích) -  
absorbance je funkcí koncentrace
- chyby modelu jsou přiřazeny  
chybám v určení absorbancí
- použitelná i pro celá spektra
- všechny komponenty musí být známy a  
zahrnuty do kalibrace

# Regrese ILS

- inverzní metoda nejmenších čtverců
  - „P-matrix“
- předpoklad platnosti inverzního Lambertova - Beerova zákona pro všechny koncentrace - koncentrace je funkcí absorbance
- chyby modelu jsou přiřazeny chybám v určení koncentrací
- použitelná pro omezený počet vlnových délek
- komponenty nezávislé, postačuje znalost jedné složky v kalibračních směsích

# Regrese PLS

- ortogonální transformace dat do systému souřadnic označovaného jako hlavní komponenty - PC  
- redukce počtu potřebných souřadnic

