

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

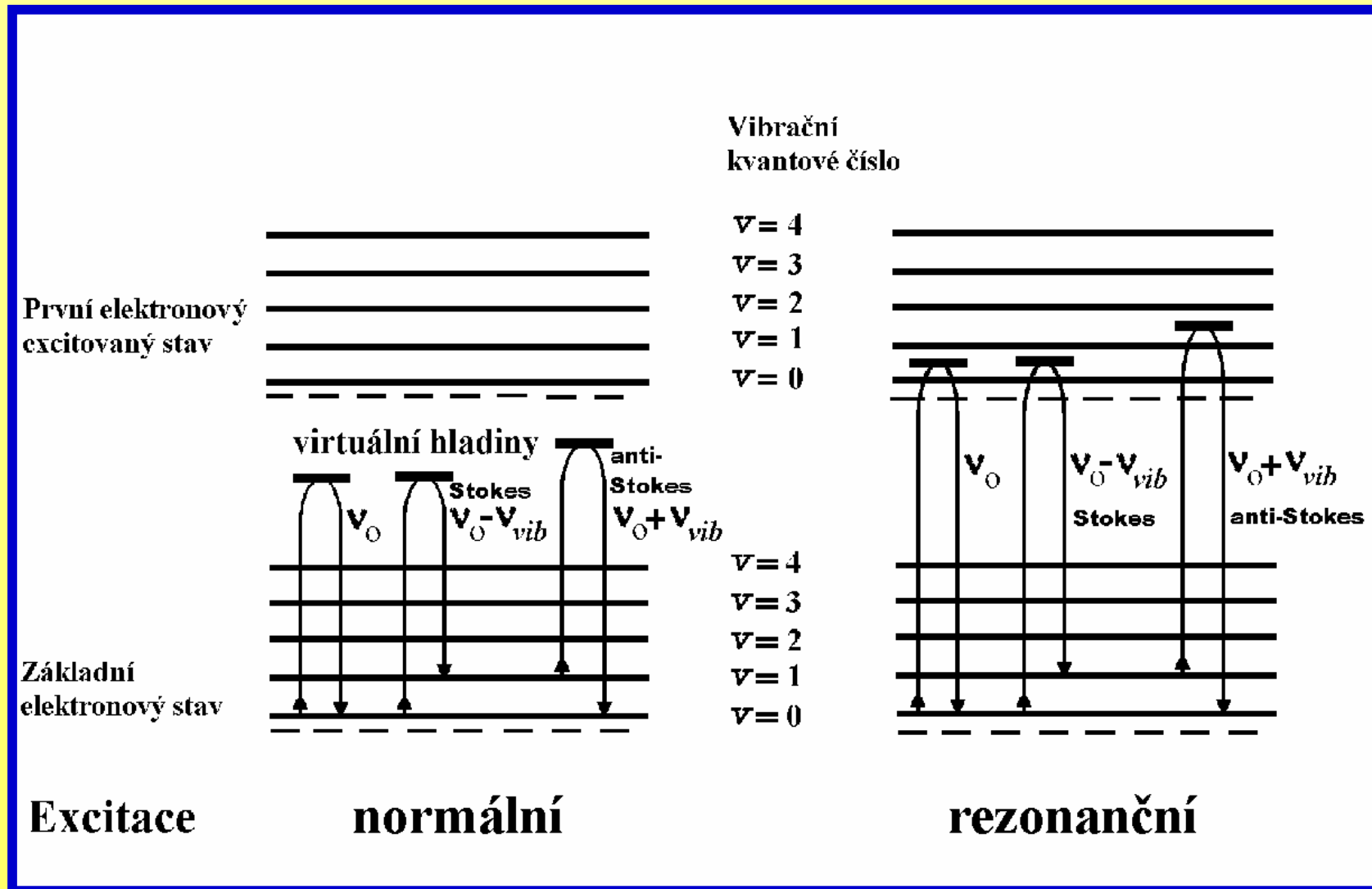


Schéma dvoufotonových přechodů

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

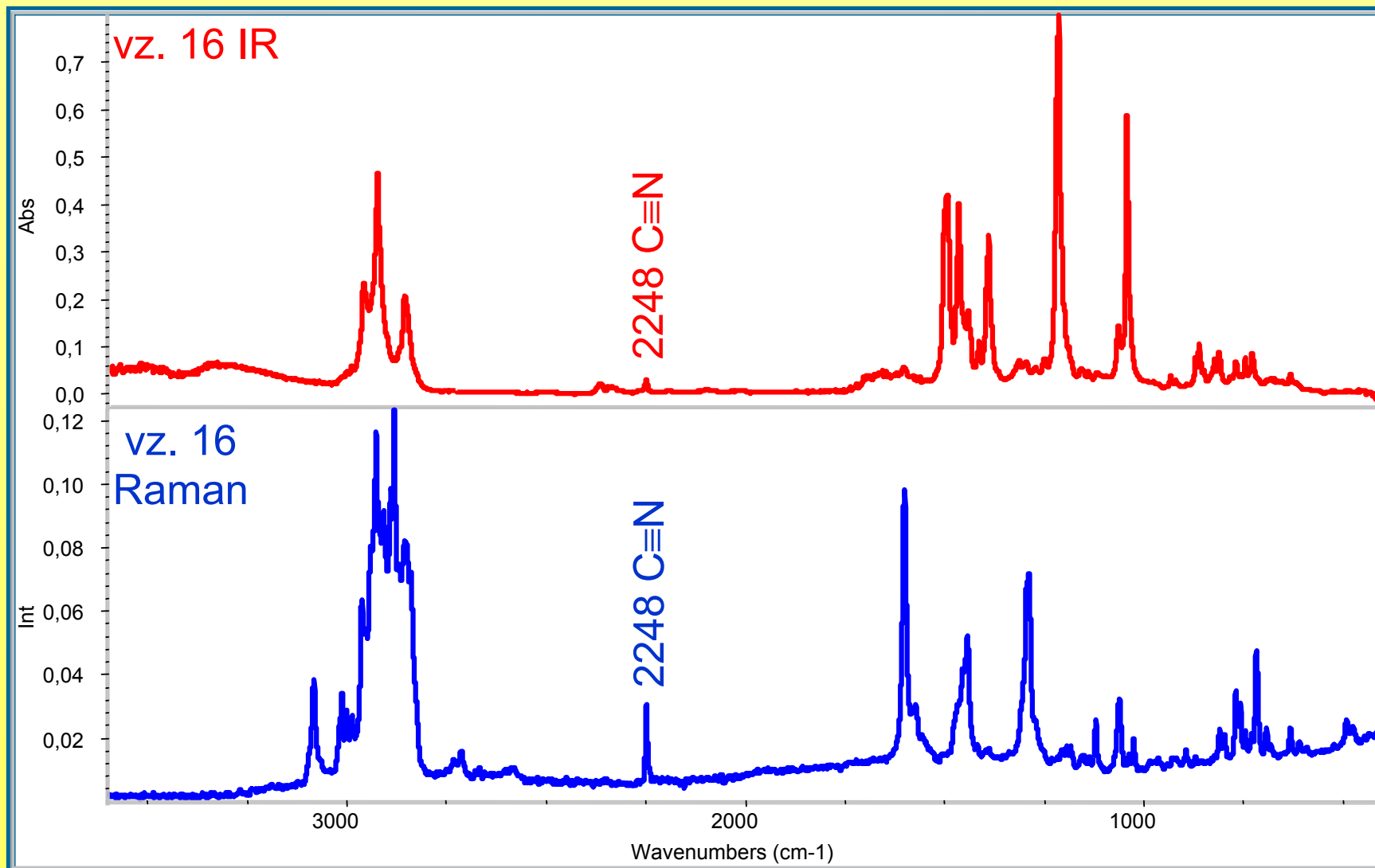
$$(\delta\alpha/\delta q)^2,$$

zatímco v infračerveném spektru

je úměrná

druhé mocnině změny dipólového momentu.

Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

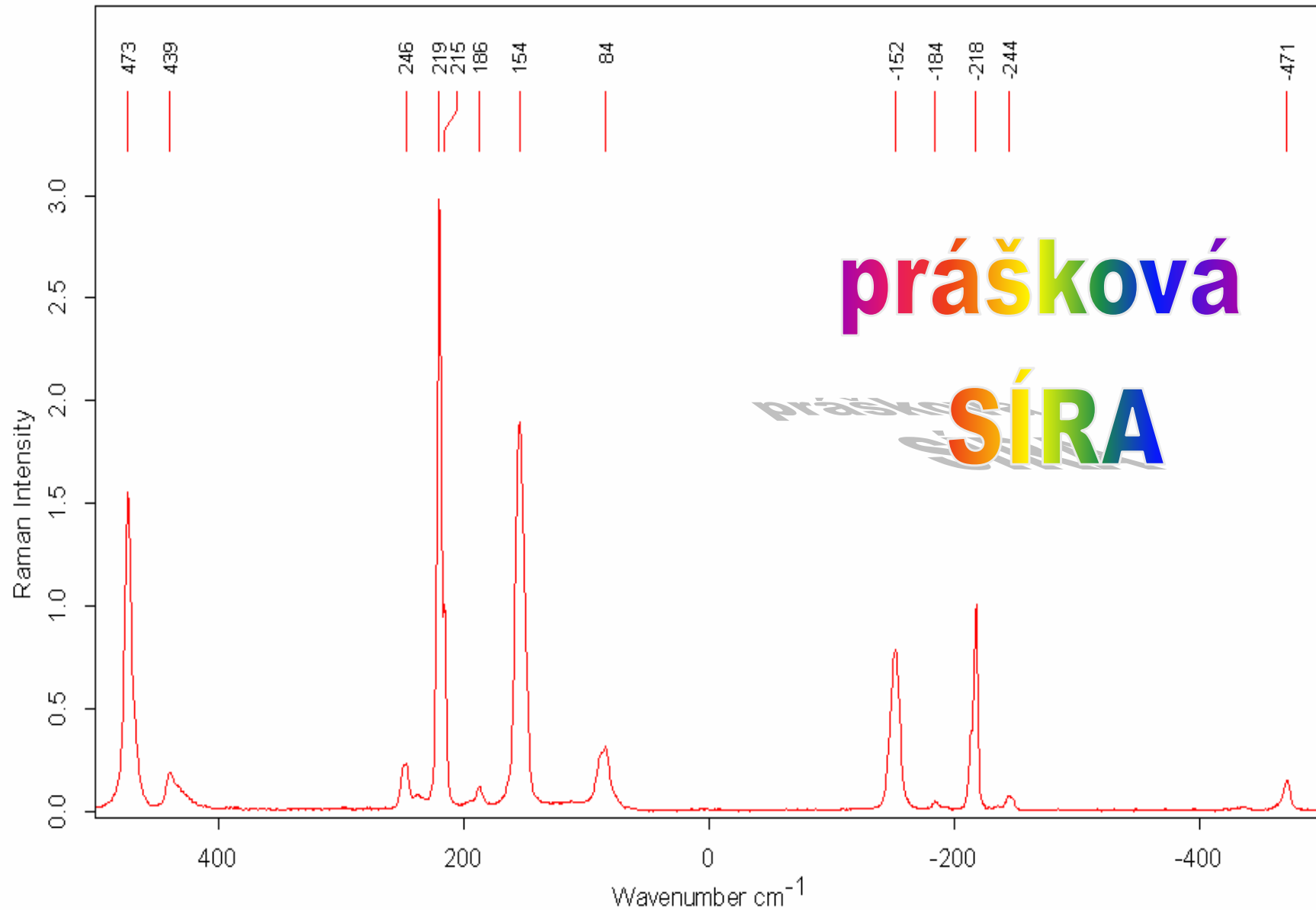


Principy Ramanovy a FT Ramanovy spektroskopie

**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 ⁺	514,5
Ar ⁺	488,0
Ar ⁺	457,9
Kr ⁺	568,2
Kr ⁺	647,1
Kr ⁺	676,4
Kr ⁺	752,6
Nd-YAG	1064
Nd-YAG - 2f	532
diodové	780, 785 - NIR
barvivové	360 - 750 - UV, vis

Schéma Ramanova disperzního přístroje

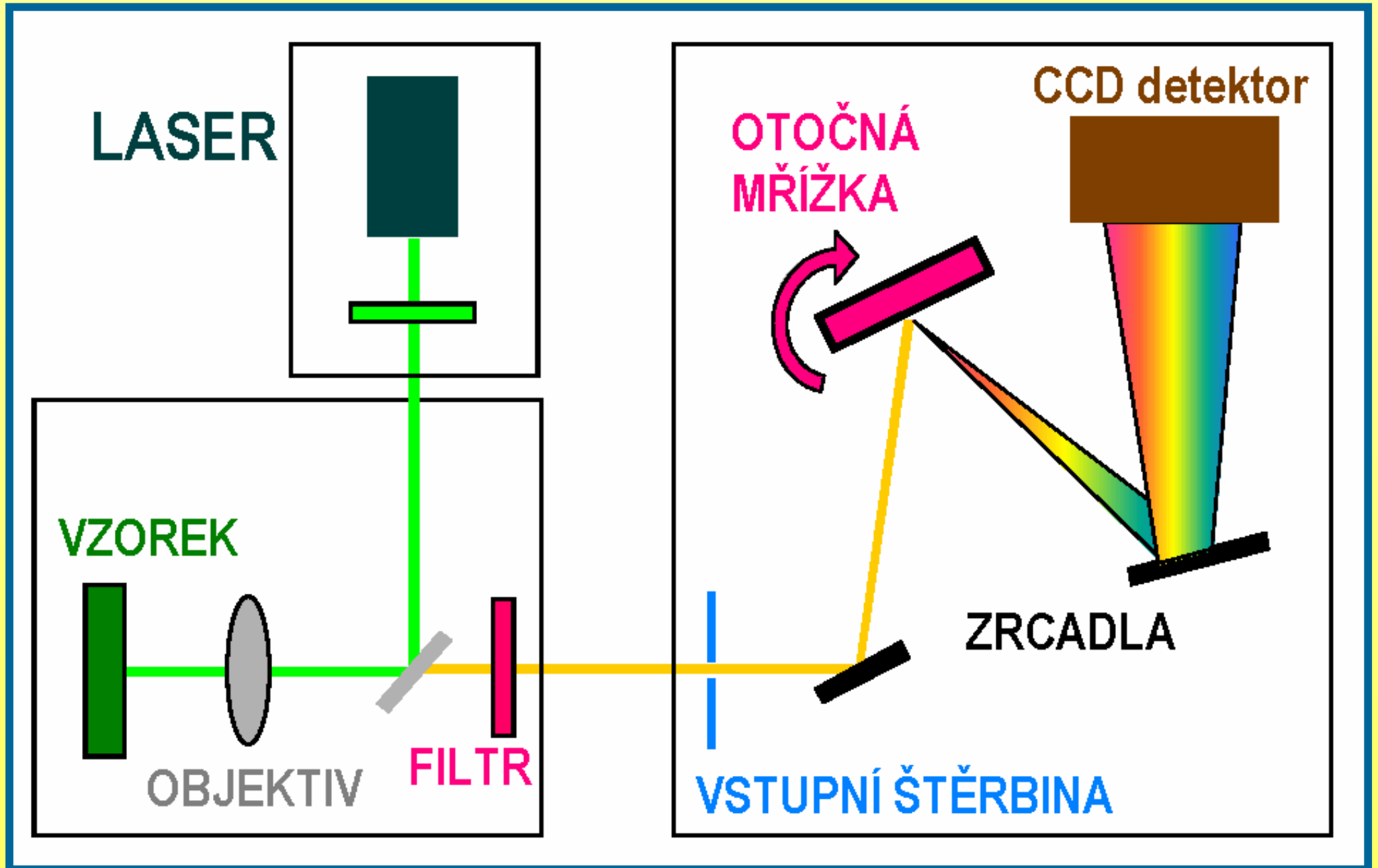
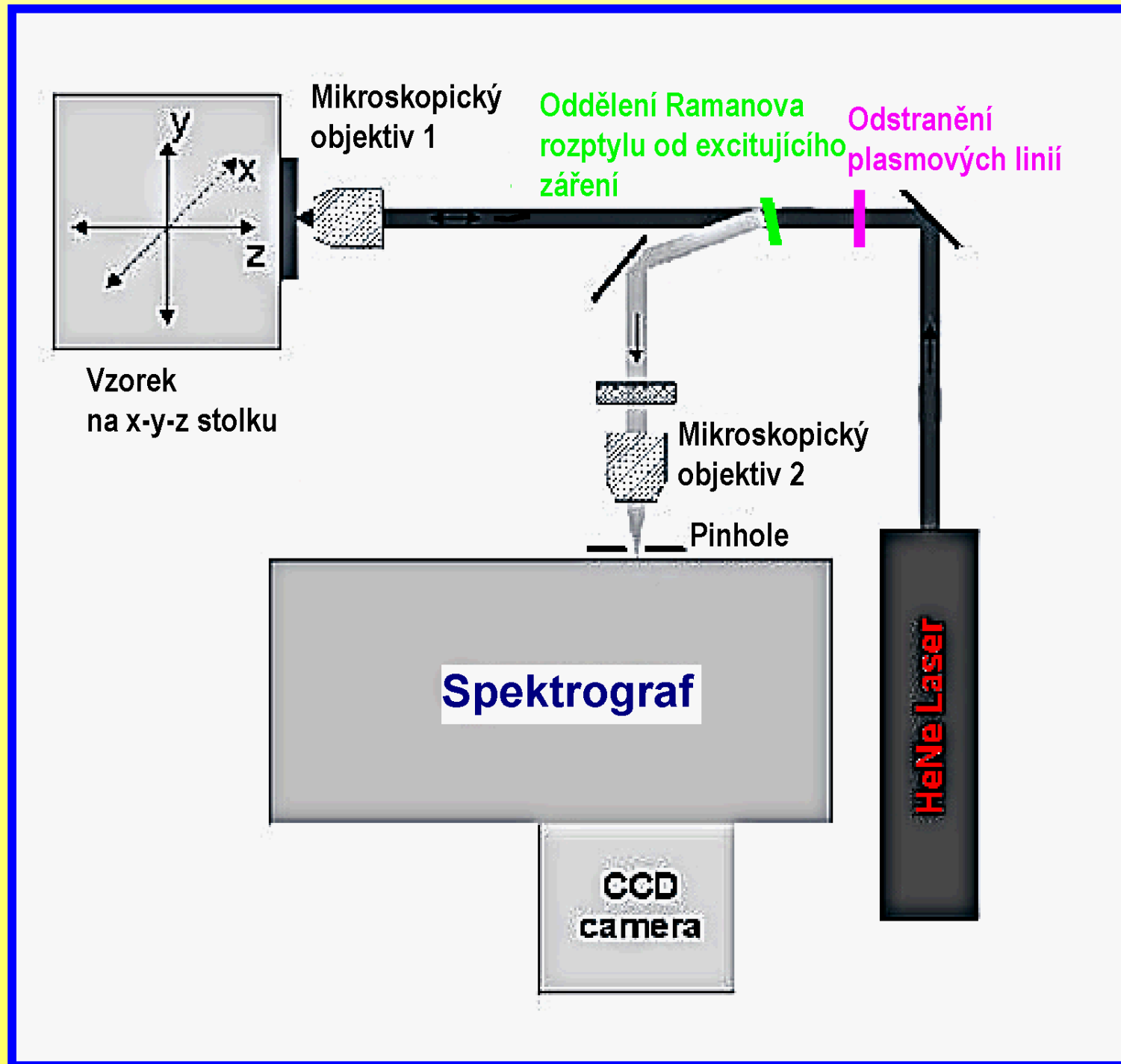


Schéma Ramanova mikroskopu



Externí sondy připojené pomocí vláknové optiky



Křemenná vlákna

Fokusační zrcadla

**Vysoce světelné
objektivy
z kvalitního optického
skla**

Mobilní přístroje



Principy FT Ramanovy spektroskopie

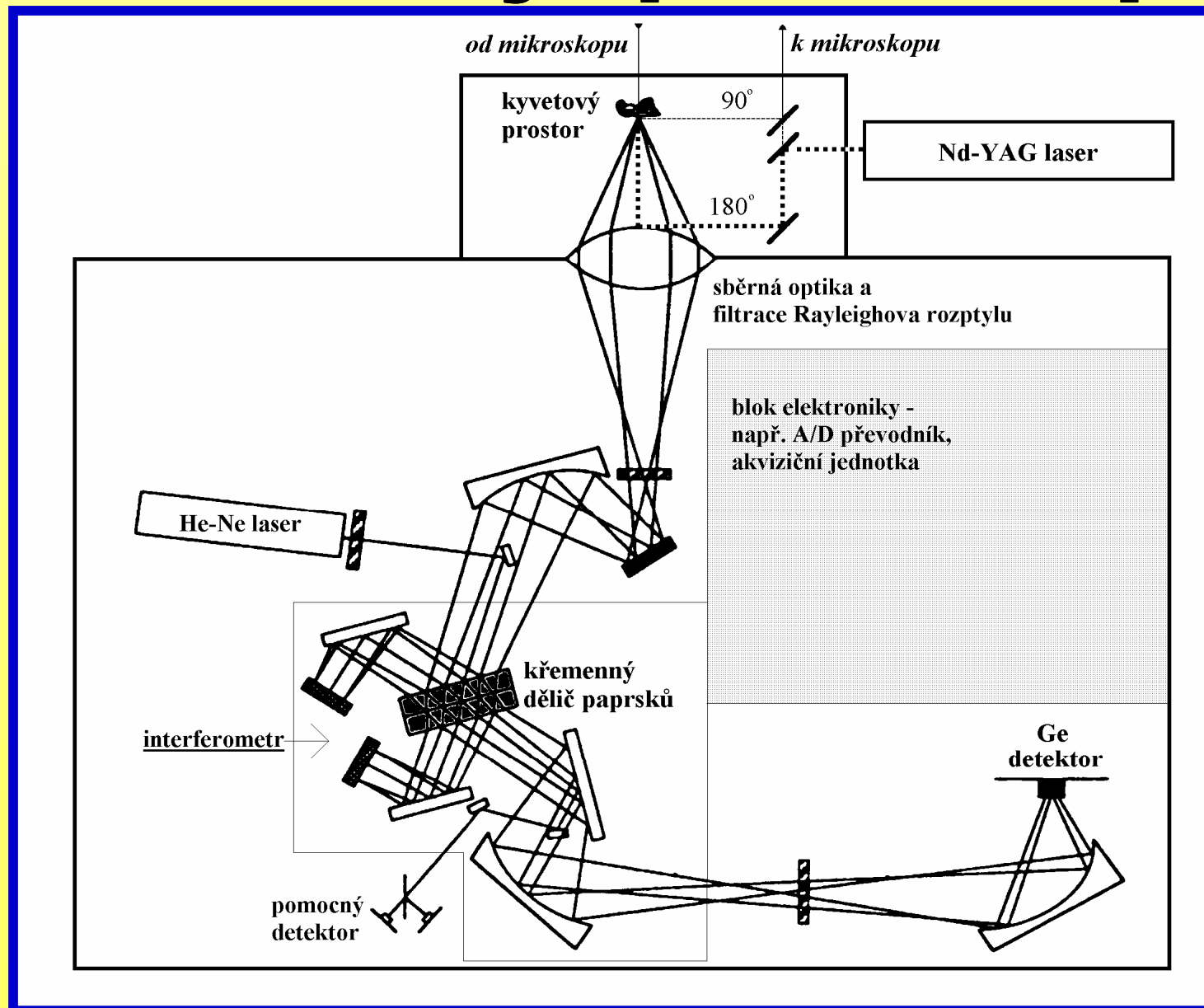


Schéma FT Ramanova spektrometru s NIR excitací

Instrumentace

Materiály pro dělič paprsků

<u>Propustný materiál</u>	<u>Polopropustný povlak</u>	<u>rozsah použití</u> [cm ⁻¹]
křemen	Si (Fe ₂ O ₃)	23 000 – 4 000
CaF ₂	Si (Fe ₂ O ₃)	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

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

Kvantitativní spektrometrie

- specifické aspekty jednotlivých metod

Ramanova spektrometrie -

ANALÝZA MATERIÁLŮ - polovodiče

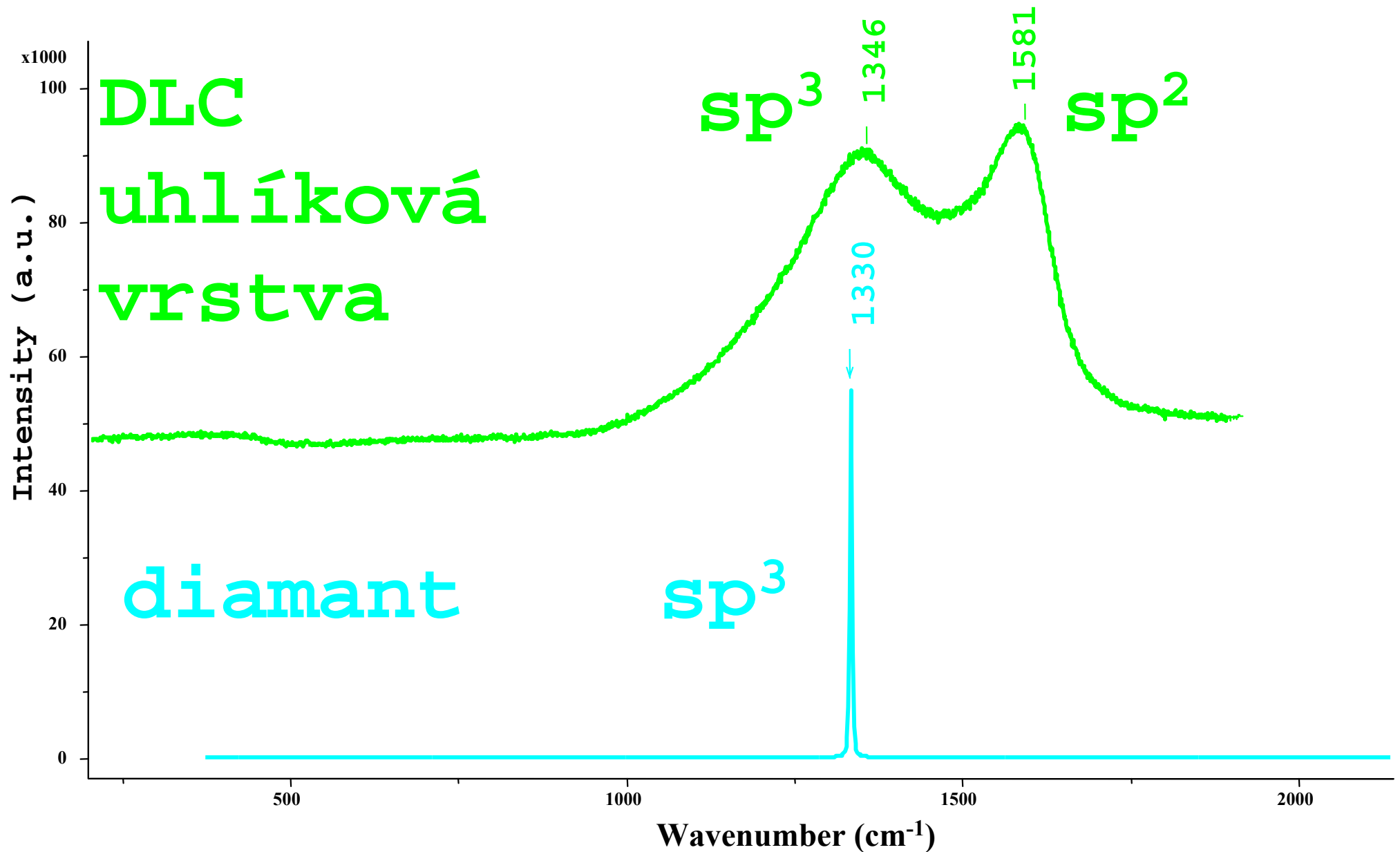
- kontrola povrchu pevných disků, Seagate 1992

- 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

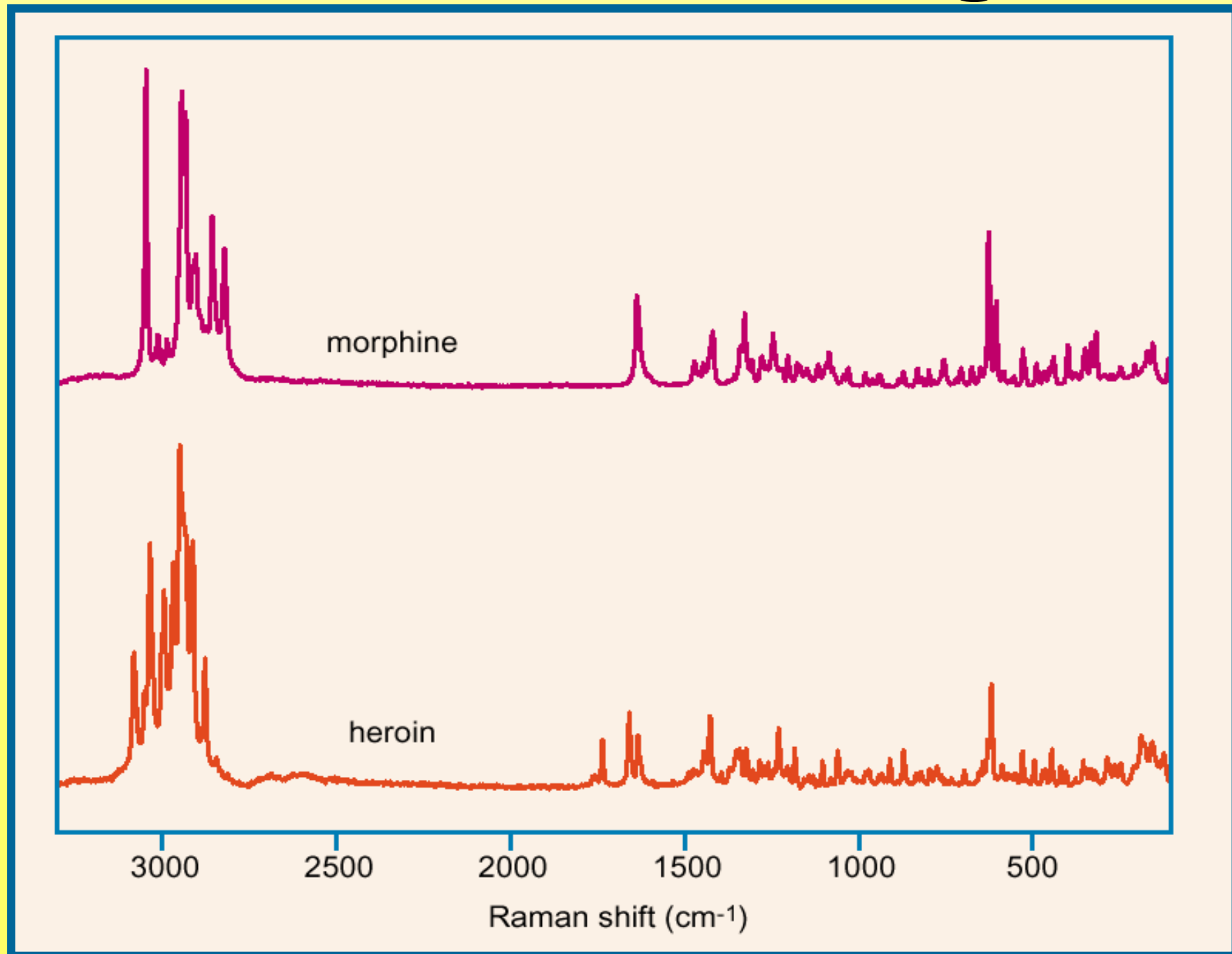
- specifické aspekty jednotlivých metod

FT Ramanova spektrometrie -

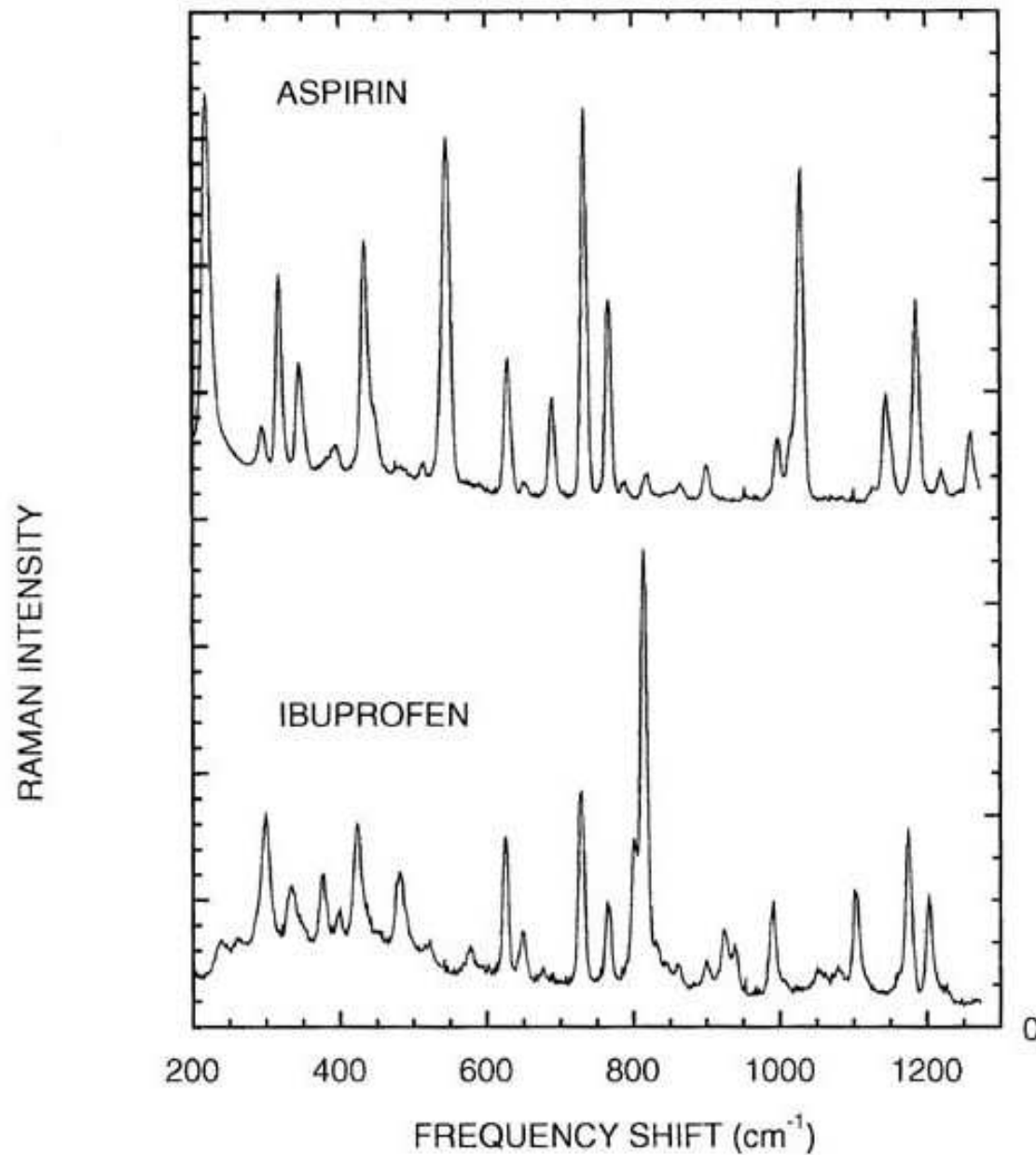
**ANALÝZA ropných produktů - stanovení
oktanového čísla**

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

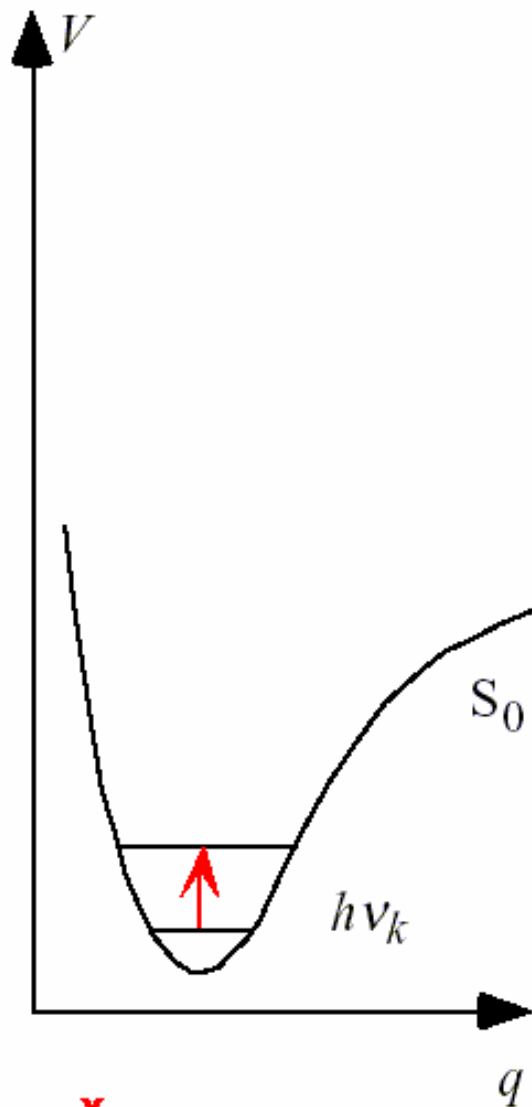
Identifikace drog



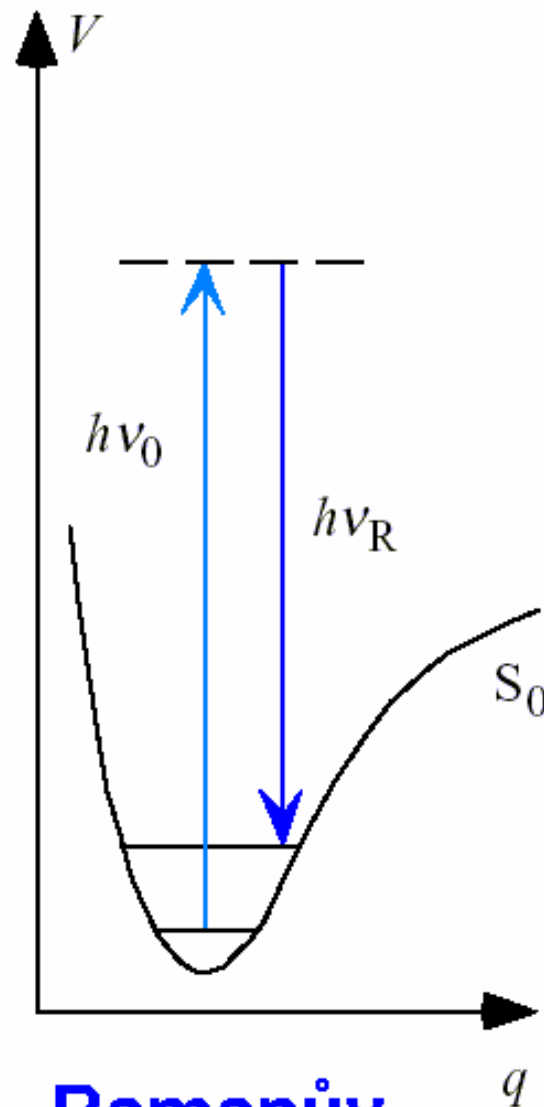
Identifikace léčiv



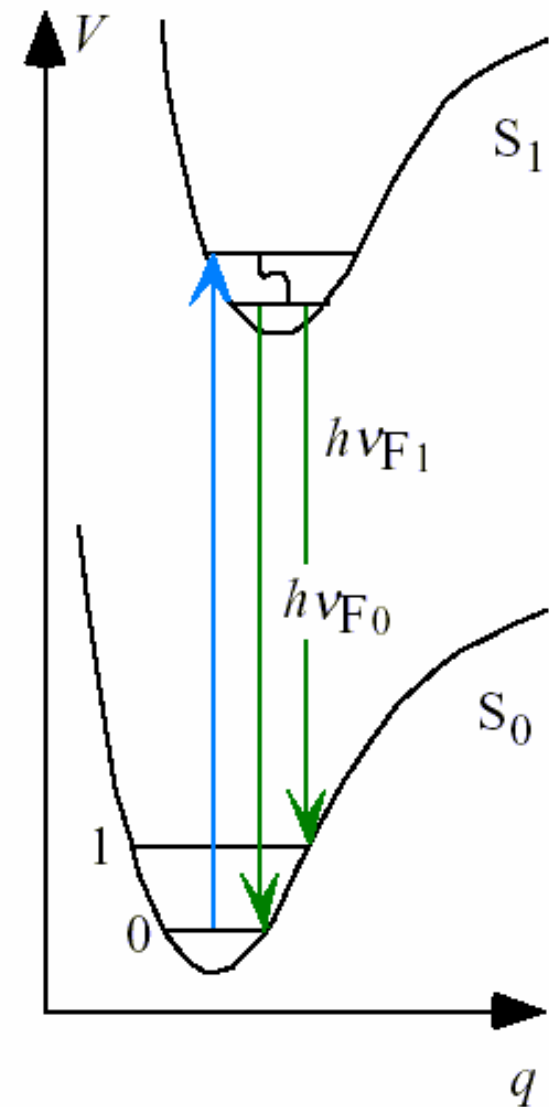
Fluorescence



IČ absorpce

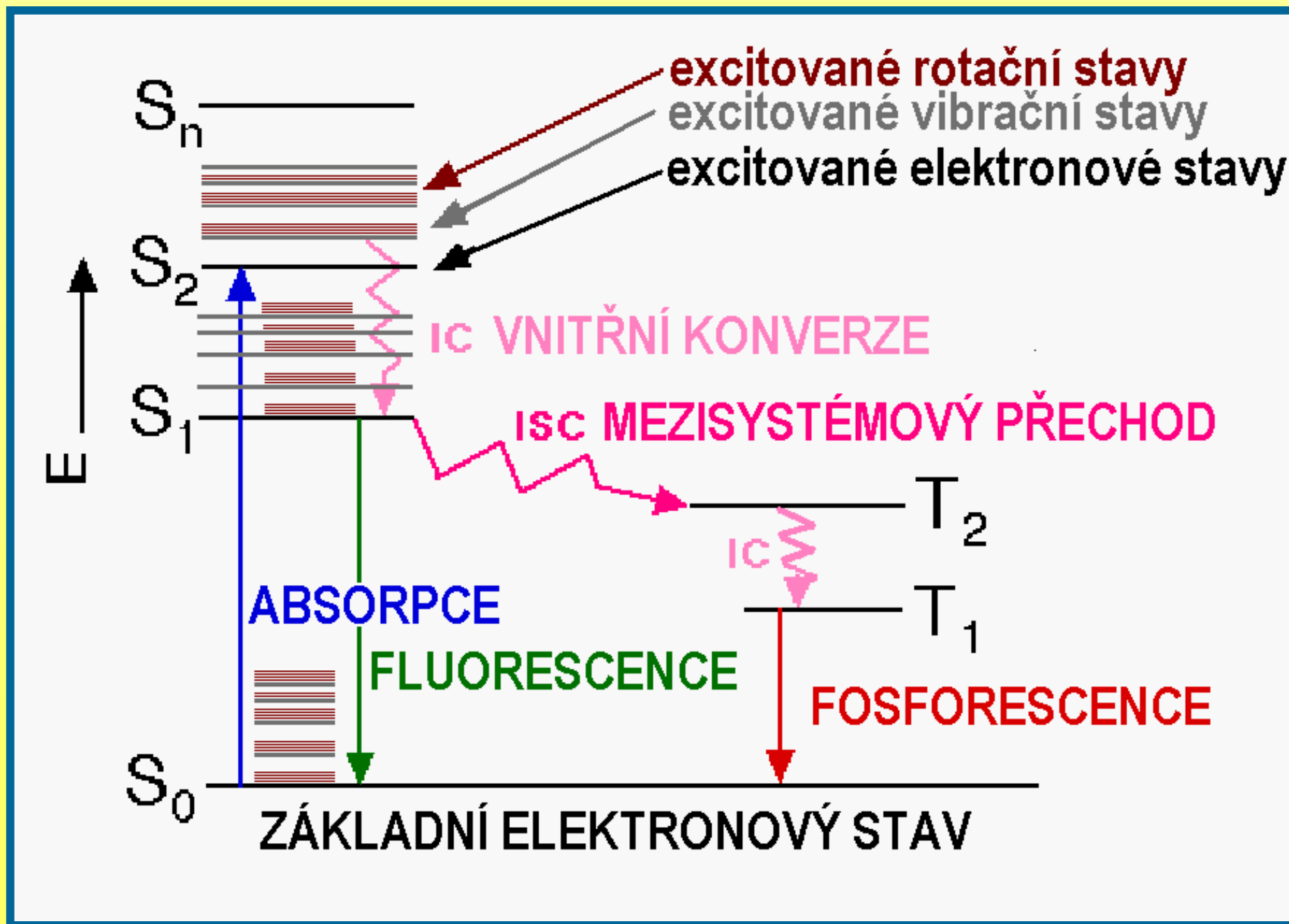


Ramanův rozptyl



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

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

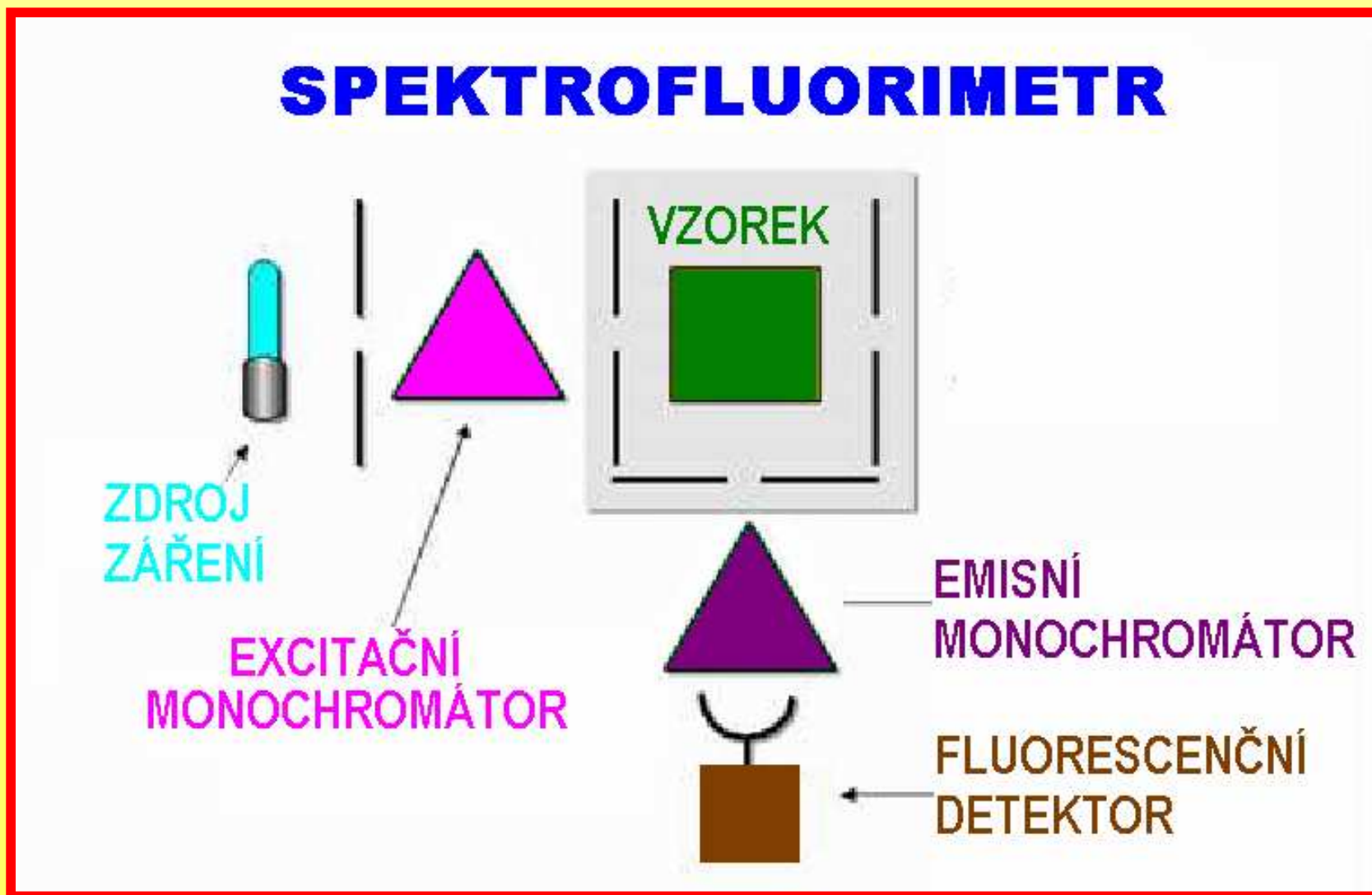
- počet vyzářených fotonů vůči počtu absorbovaných
 - VLIV NEZÁŘIVÝCH PROCESŮ - intra- a inter-molekulárních

Fluorescence a fosforescence

- **STRUKTURA MOLEKULY**
 - dvojně vazby - aromáty, konjugované C=C
 - heteroatomy - C=O, dusíkaté heterocykly
 - VLIV SUBSTITUENTŮ - -OH, -NO, -NO₂ ...
 - RIGIDITA struktury π -elektronového systému
 - CHELÁTÝ
- **MEZIMOLEKULOVÉ INTERAKCE**
 - především zhášení luminiscence
 - vliv pH, teploty, viskozity, polarita rozpouštědla

Fluorescence a fosforescence

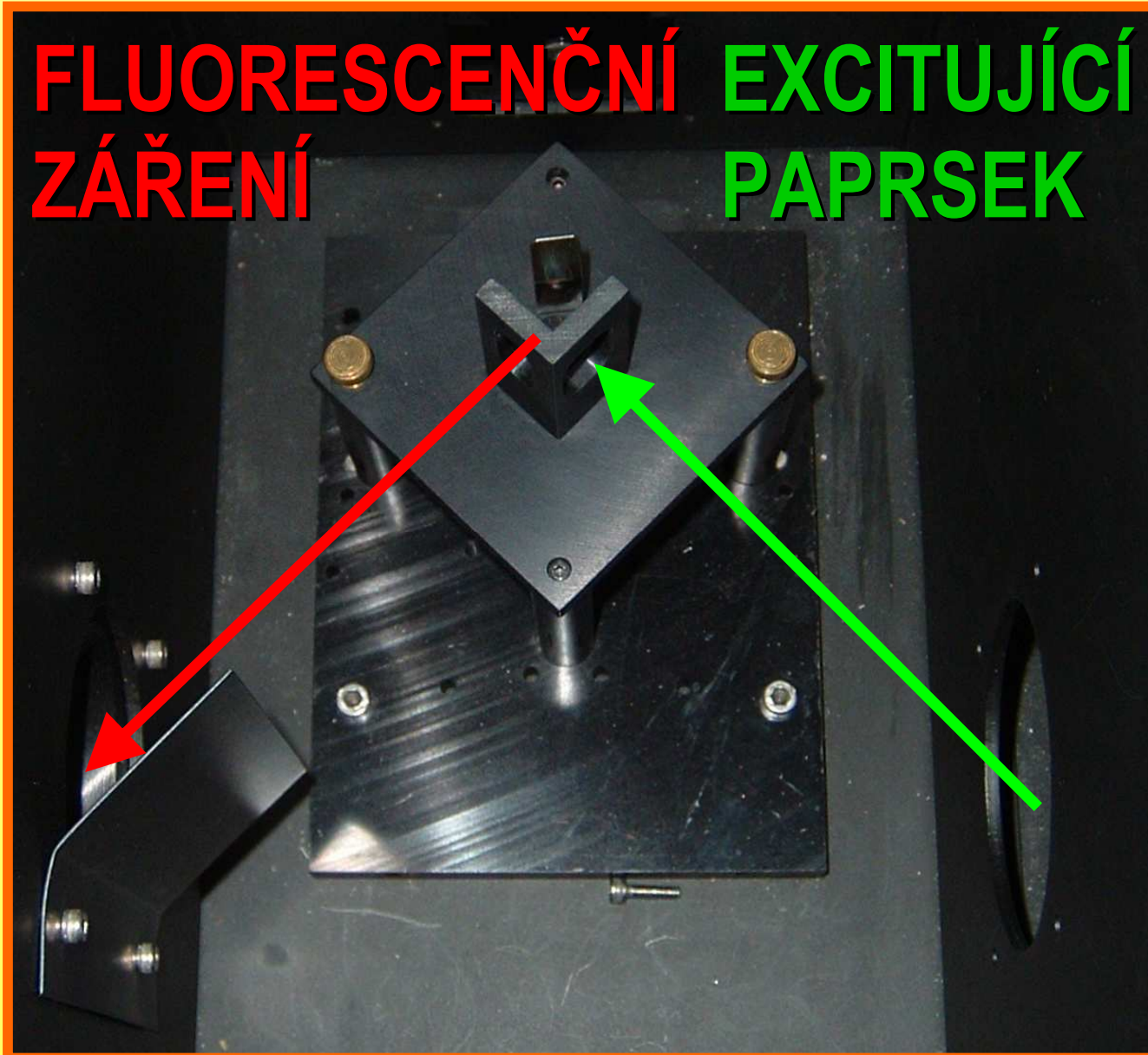
- MĚŘENÍ STACIONÁRNÍCH SPEKTER
– spektrofluorimetr



MOLEKULOVÁ emisní spektrometrie

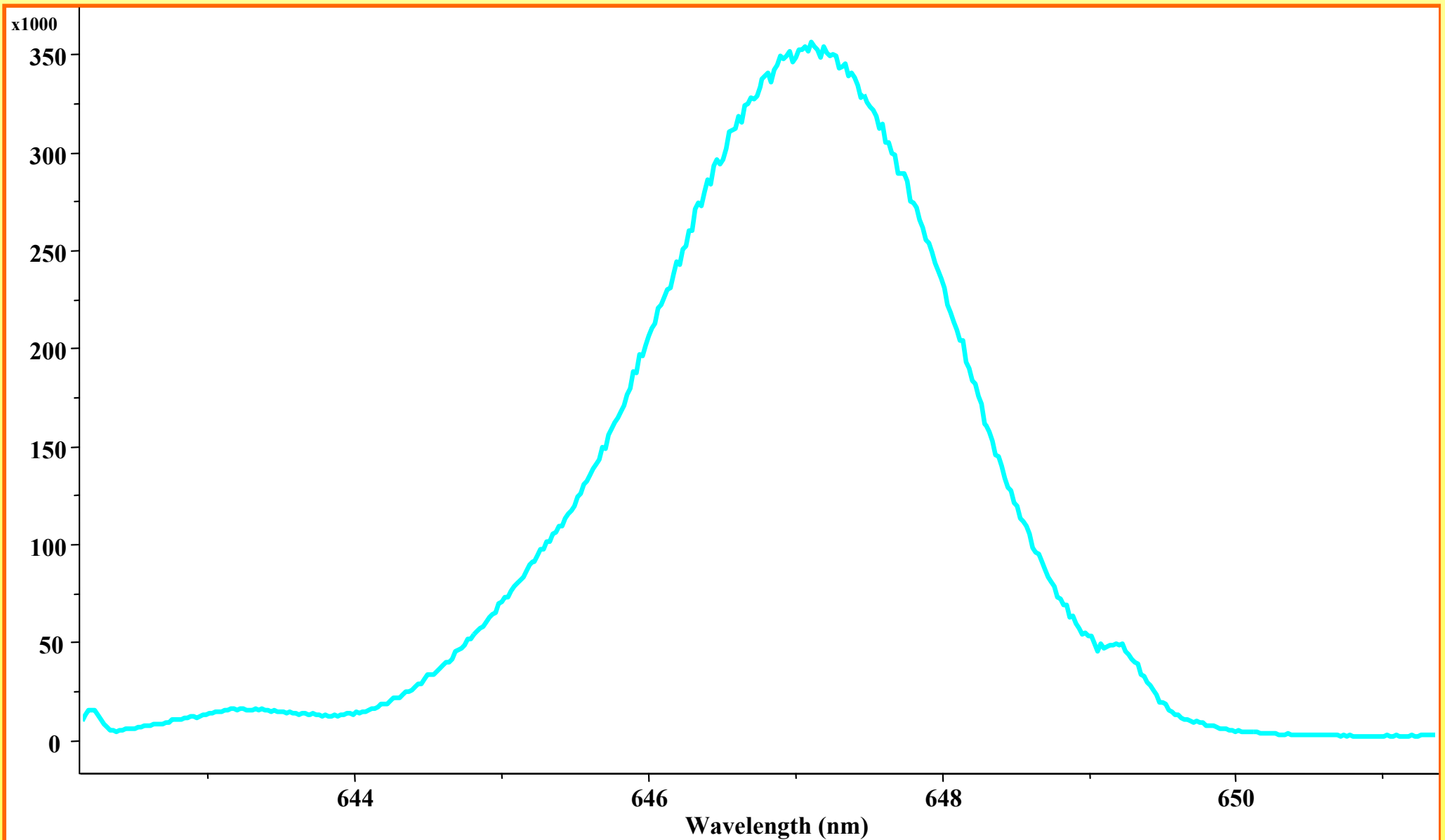
- VIS a UV oblast - fluorescence a fosforescence

FLUORESCENČNÍ ZÁŘENÍ **EXCITUJÍCÍ PAPRSEK**



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 λ emisního toku
 - emisní - fixovaná λ excitujícího záření
 - proměnná λ 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

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

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

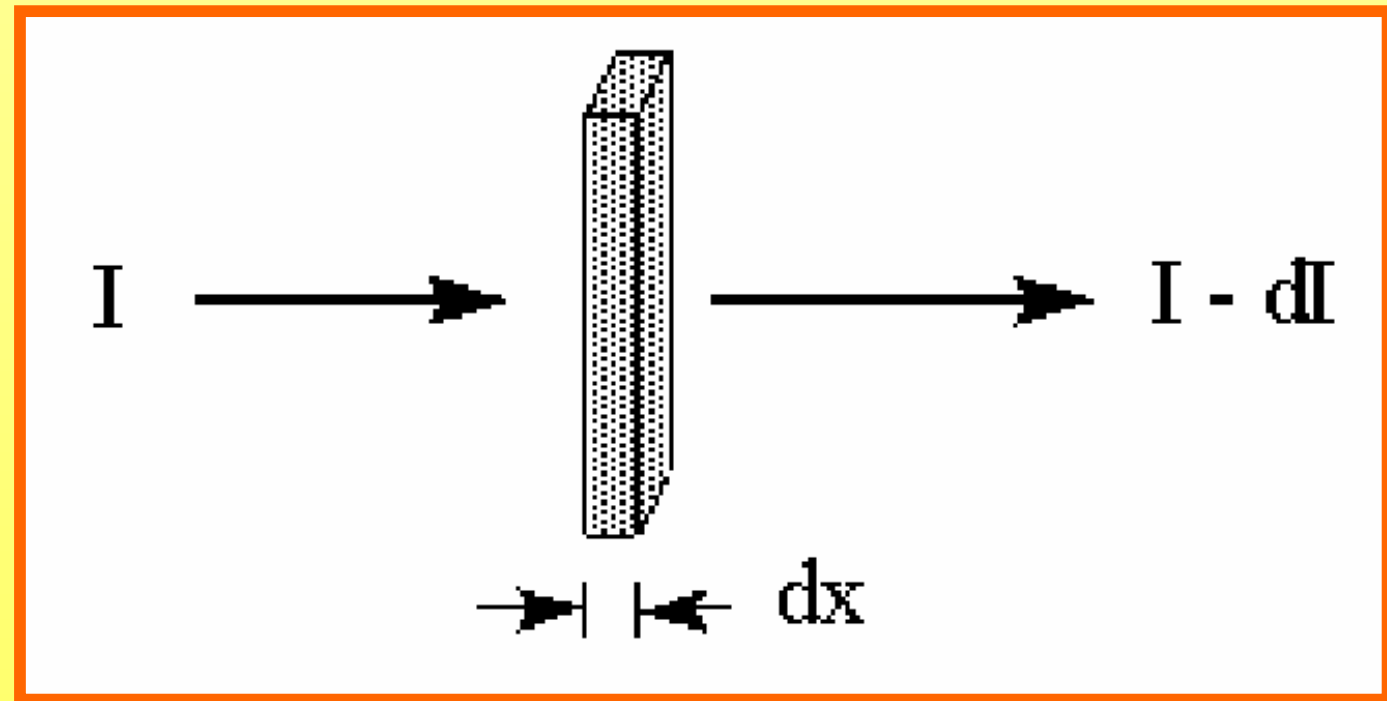
Kvantitativní spektrometrie

- 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 $(\epsilon_{\lambda})_i$

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

