

MASARYKOVA UNIVERZITA BRNO

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Lasery v analytické chemii

*(seminární práce)*

Brno 2007

Alice Staňková

## OBSAH

|  |    |
|--|----|
| 1. Úvod.....   | 3  |
| 2. Lasery v analytické chemii.....                             | 3  |
| 2.1. Lineární spektroskopické metody .....                     | 4  |
| 2.2. Nelineární spektroskopické techniky .....                 | 6  |
| 2.3. Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP) .....    | 7  |
| 2.4. Spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu – LIBS ..... | 8  |
| 2.5. MALDI-TOF technika .....                                  | 9  |
| 2.6. Fotochemické reakce.....                                  | 10 |
| 3. Závěr.....  | 10 |
| 4. Literatura .....  | 10 |

# *LASERY V ANALYTICKÉ CHEMII*

## **1. Úvod**

Lasery jsou zařízení, která se dají používat v různých oborech lidské činnosti. Využívají se například v lékařství (oční lékařství, dermatologie, stomatologie a chirurgie) v astronomii (zkoumání kosmu), geodézii (měření velkých vzdáleností s velkou přesností), ve výpočetní technice (CD- a DVD-mechaniky, laserové tiskárny a kopírky), vojenství (laserové značkovače, laserové zaměřování raketových střel), průmyslu (obrábění materiálů, svařování a gravírování kovů, dekorace skla), holografii (2D, 3D hologramy) a také v chemii.

Využití laserů v analytické chemii je velmi široké, zahrnuje veškeré použití u spektroskopických technik spojených s laserovou ablací (LA-ICP-MS/OES) a dále například použití u MALDI-TOF (ionizace laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu) techniky a fotochemických reakcí. Laserové metody se uplatňují v základním výzkumu a ve velkých laboratořích. Aplikace laserů dělíme na spektroskopické a nespektroskopické. O nespektroskopickém použití hovoříme tehdy, je-li laserový paprsek použit pouze jako iniciační zdroj pro další analytické zpracování. Dále o tomto použití hovoříme tehdy, je-li působení laseru při přípravě vzorku dáno jeho tepelným působením a nebo je požadované hustoty záření dosaženo volbou vhodné délky pulzu laseru fokusací laserového paprsku.

## **2. Lasery v analytické chemii**

Lasery v analytické chemii mohou být použity na přípravu vzorku (laserové tepelné odpaření – ablace, atomizace a ionizace), frakcionování vzorku (laserová selektivní ionizace) a jako detekční systém (laserová spektrální detekce).

U spektroskopických technik, kde se laser používá na přípravu vzorku, se jedná konkrétně o hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a optickou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Další technikou využívající laserové ablace jako vzorkovací techniky je spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu,

známá pod zkratkou LIBS. Na rozdíl od ostatních technik je to poměrně nová analytická technika.

Při spektroskopických interakcích dochází k přímé interakci laserového záření s kvantovými stavy částic. Monochromaticnost (kmitání pouze na jedné frekvenci) laserového záření je významnou vlastností, která je využívána u spektroskopických technik. Další významné parametry jsou vysoké výstupní výkony, krátká délka pulzu laseru – pro získání časově rozlišeného údaje (u postupného sledování fluorescenčního vyhasínání) a spektrální intenzita laserů (analýza na velké vzdálenosti při metodách dálkové detekce – LIDAR – Light Detection and Ranging, Laserový výškoměr).

Podle počtu interakcí fotonů rozdělujeme spektroskopické interakce na lineární a nelineární. O lineárních interakcích hovoříme tehdy, jde-li výsledek interakce vztáhnout na jeden foton. Naopak jestliže dochází k interakci více fotonů zároveň, hovoříme o nelineární interakci.

### 2.1. Lineární spektroskopické metody

#### ✓ Absorpční spektroskopie

Je to optická metoda, kde se využívá měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Atomy stanovovaného prvku jsou z kapalného stavu převedeny do plynného atomárního stavu, přičemž volné atomy jsou v základním energetickém stavu. Atomizace se provádí buď v plameni, který má teplotu 2000-3000 K nebo elektrotermicky v grafitové kyvetě. Princip analýzy je založen na emisi primárního záření (jako zdroj se používá buď výbojka nebo laser), které má definované emisní čáry stanovovaného prvku. Toto záření prochází absorpčním prostředím, kde volné atomy prvku absorbují určité vlnové délky. Monochromátor izoluje vybranou rezonanční čáru a detekční systém zaznamená zeslabení toku původního záření. Zeslabení primárního svazku je úměrné koncentraci stanovovaného prvku v roztoku. Před měřením neznámého vzorku je třeba provést kalibrační měření vzorků se známým obsahem sledovaného prvku a sestavit kalibrační křivku. Citlivost měření může být pro některé prvky až v ppm. Tato technika se dá například použít ve strukturní analýze (identifikace spektrálních čar v IR oblasti pomocí laserového polovodičového spektrometru v IR oblasti – polovodičový laditelný laser) a při určování chemického složení látek.

### ✓ Optoakustická detekce v metodách laserové spektroskopie

Princip detekce spočívá v následující posloupnosti dějů: absorpce elektromagnetického záření částicí → kolize částice s další částicí → relaxace → transformace energie na kinetickou energii → energie tepelného pohybu → ohřev → zvýšení objemu → nárůst tlaku v uzavřeném prostoru.

Měření je založeno na detekci tlakových změn vzniklých v důsledku rychlé disipace absorbované energie (používá se detektor). Metody využívající optoakustické detekce jsou velmi citlivé (jednotky ppb). Výhodou techniky je její velká linearita – až pět řádů koncentrace, naopak nevýhodou je zbytková absorpce a rozptyl laserového záření na vstupních okénkách kyvety, ohřívání okének a parazitní signál na mikrofonu. Tato technika, doplněná LIBS technikou se dá použít při laserovém čištění materiálů.

### ✓ Laserem indukovaná fluorescence

Kapilární zónová elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF) je další analytická technika, při které se využívá laser. V předchozích případech laserový paprsek sloužil k analýze, nebo k přípravě pevného vzorku pro analýzu, v tomto případě je využit k vybuzení fluorescence.

Kapilární zónová elektroforéza je separační technika založená na migraci analytů v kapalině mezi dvěma elektrodami o vysokém napětí, obvykle je realizována v kapiláře. Zónová se nazývá protože je zde použit jeden pracovní elektrolyt, tím pádem je v celém objemu konstantní elektrické pole. Kvalitativní charakteristika analytu je dána jeho migračním časem píku, kvantita souvisí s výškou a plochou píku. Detekce je nejčastěji založena na změně absorbance nebo fluorescence při průchodu zóny analytu detektorem. Laserový paprsek je zaostřen tak, že kolmo prochází mezi vnitřními stěnami kapiláry. Podmínkou pro použití tohoto typu detekce je přítomnost fluoroforů v látce. Pokud látka neobsahuje žádné chromofory ani fluorofory je nutná jejich derivatizace, tzn. umělé zavedení těchto skupin do analyzované látky. Tato technika se používá například ke stanovení aminokyselin v různých biologických materiálech. Nejčastěji se používají lasery He-Ne, diodové a Ar<sup>+</sup>.

## 2.2. Nelineární spektroskopické techniky

Nelineární techniky jsou takové techniky, při kterých dochází k současné absorpci více fotonů částicí vzorku. Dále při interakci vzorku s velkým množstvím fotonů dochází ke zvýšení obsazení horní energetické hladiny a sníží se tím absorpce vzorku díky nasycení absorpčního přechodu. Pokud u těchto technik dochází k nelineárním efektům, nelze pro absorpci použít Lambert-Beerův zákon.

### ✓ Saturační subdopplerovská spektroskopie (spektroskopie Lambova řezu)

Tato technika nalézá hlavní uplatnění při stabilizaci laseru a při zjišťování přesných hodnot absorpčních čar, ale co se týče analytického zaměření, nemá velké využití. Dá se použít pro studium látek v plynném skupenství. Je založena na Dopplerově jevu. Částice plynu interagují se zářením s frekvenčním posunem daným okamžitou složkou rychlosti pohybu do směru šíření laserového paprsku.

### ✓ Dvoufotonová spektroskopie

Při zvýšení intenzity laserového záření (například použitím pulzního laseru) roste pravděpodobnost současné absorpce dvou fotonů. Ke dvoufotonové absorpci dojde tehdy, je-li částice atakována druhým fotonem ve chvíli, kdy se ocitla ve virtuálním stavu po interakci s prvním fotonem. Při experimentu se přivádí dva laserové paprsky směřující proti sobě. Detekce se u této techniky provádí pomocí fluorescence.

### ✓ Vícefotonové a vícekvantové procesy

Multifotonový proces je ten, při němž dojde k pohlcení většího množství fotonů pocházejících z jednoho zdroje. Při multikvantovém procesu dochází k excitaci pomocí fotonů s různou energií. Při vícekvantové fotoionizaci atomů je možné díky mimořádné ionizační účinnosti procesu a délce doby života iontů dosáhnout extrémní analytické citlivosti. V případě detekce molekul je možné použít kombinaci metod dvoufotonové excitace (ionizace) a hmotnostní spektrometrie.

### 2.3. Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP)

Při použití spektroskopických technik se velmi často používá kapalný vzorek. V případě pevných vzorků musí být tyto rozpuštěny a poté, jako kapalné, mohou být analyzovány. Převedení do roztoku je ovšem zdoluhavé, neekonomické, neúplné a často může dojít v průběhu přípravy ke kontaminaci vzorku. Řešením může být přímá analýza pevných látek bez jejich předchozího rozpouštění. K tomuto účelu se používá laserová ablace. Při použití laserové ablace je pevný vzorek nutné jen minimálně připravit pro analýzu. V případě práškových vzorků je nutná homogenizace a lisování do formy tablet. Jedná se o semidestruktivní vzorkovací techniku, se kterou ve spojení s technikami ICP-MS/OES a LIBS můžeme dosáhnout nízkých mezí detekcí a umožňuje nám stanovení prvků při ablaci plochy vzorku v řádu několika mikrometrů, často jediným pulzem.

Při použití laserové ablace působí na povrch vzorku zaostřený laserový paprsek o vysoké energii. Při této interakci dochází k lokálnímu přehřátí, odpaření a uvolnění materiálu ve formě suchého aerosolu, za současného vzniku mikroplazmatu a k následné kondenzaci materiálu. Proud nosného plynu vede tento aerosol do prostředí indukčně vázaného argonového plazmatu, kde vlivem vysoké teploty plazmatu dochází k odpaření, atomizaci, ionizaci a excitaci materiálu. Podle způsobu detekce pak ICP rozlišujeme na ICP-MS nebo ICP-OES

V případě ICP-MS nám kladně nabitě ionty vstupují do hmotnostního spektrometru, ve kterém dochází k jejich separaci podle jejich  $m/z$ . Nejčastěji se používá kvadrupólový analyzátor, kde jsou analyzované ionty vedeny tak, aby na povrch elektronového násobiče v daném okamžiku dopadaly ionty jen o určité hmotnosti. Měří se intenzita elektrického proudu vzniklého dopadem na zesilovač.

Nejčastěji používanými lasery při laserové ablaci jsou: Nd:YAG lasery pracující při vlnové délce 213, případně 266 nm. Použití LA-ICP-MS je velmi široké, zahrnuje například stanovení mikro prvků v biologických vzorcích životního prostředí, mapování povrchů ocelí, analýzu geologických materiálů, analýzu gelu po gelové elektroforéze.

V případě ICP-OES se využívá excitace a následné deexcitace atomu vzorku. Ta je spojena s emisí záření, které je monochromatizováno pomocí optické mřížky a monochromatizované záření je poté detekováno pomocí fotonásobiče.

U optické emisní spektrometrie dochází k excitaci elektronů přítomných atomů do vyšších energetických hladin. Excitovaný stav atomu je nestabilní, z toho důvodu se vrací excitované elektrony zpět do základního stavu za současné emise světla o přesně definované vlnové délce. Vedené světlo je vedeno na monochromátor, který rozdělí zachycené světelné záření podle jeho vlnových délek a fotony tohoto rozděleného světla dopadají na detektor, který převádí intenzitu dopadajícího světla na elektrický signál. Intenzita signálu o dané vlnové délce pak odpovídá množství prvku v analyzovaném vzorku.

I v tomto případě jsou nejčastěji používány Nd:YAG lasery. Tato technika je vhodná ke stanovení makro a mikro prvků v různých vzorcích.

#### 2.4. Spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu – LIBS

Spektroskopie laserem buzeného mikroplazmatu (laser induced breakdown spektrometry – LIBS) je analytická technika založena na sledování mikroplazmatu vznikajícího při laserové ablací. Excitované atomy a ionty emitují záření s vlnovými délkami charakteristickými pro jednotlivé prvky zastoupené ve vzorku. Emitované záření nám charakterizuje složení zkoumaného materiálu. Emitované záření je snímáno objektivem a optickou kamerou vedeno na mřížku detektoru, kde dochází k jeho rozkladu. Nejčastěji se používá Nd:YAG lasery nebo excimerové lasery pracující u UV/VIS oblasti. Tato technika nachází uplatnění v různých oblastech vědy, například při NASA výzkumech (součást vozítka na Marsu – pro analýzu hornin na povrchu planety), ve vojenství (analýzy na dálku, detekce výbušnin) ... v analytické chemii se používá pro stanovení prvků v různých typech vzorků – biologické, geologické, kovové, k monitoringu tavených materiálů (oceli, sklo) in-situ Tato technika je zajímavá i tím, že se dá použít v archeologii a podmořské archeologii (laserový paprsek je veden pomocí optických vláken pod hladinu a k ablací dochází přímo pod hladinou; snímané mikroplazma je pak optickým kabelem vedeno do detektoru, který může být umístěn například na lodi). Velká perspektiva metody LIBS souvisí s jejím využitím pro analýzu vzdálených objektů (remote LIBS). Laserový paprsek je soustavou čoček zaostřen na analyzovaný předmět, který se může nacházet až ve vzdálenosti několika desítek metrů. Vznikající mikroplazma je sbíráno pomocí speciálního zrcadla a pomocí další optické soustavy je transportováno na mřížku spektrometru. Použitelnost této metody je zejména



v analýze radioaktivních materiálů, analýze v těžko dostupných místech nebo například detekci výbušnin.

### 2.5. MALDI-TOF technika

Technika MALDI-TOF se řadí do hmotnostní spektrometrie. Laserovým paprskem nastává ionizace matrice, která je tam ve velkém nadbytku a tato ionizovaná matrice je odpařena a dochází k její fragmentaci a ionizaci. Toto silné odpařování je doprovázené chemickou ionizací v plynu. Vytvořené ionty se následně separují v hmotnostním TOF analyzátoru. Změnou energie budícího pulzu můžeme měnit stupeň fragmentace vzorku.

Matrice je látka, jejímž prostřednictvím se ionizační energie laseru přenáší na molekuly vzorku a tím brání jejich štěpení. Ionizace laserem za pomoci matrice nám umožňuje měřit molekulové hmotnosti více látek ve stejném vzorku. Odtud také plyne název techniky – ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (time of flight). Detektor umožňuje změřit dobu průletu a z ní pak vypočítat rychlost částice. Ionty o stejné energii nebo o stejném impulsu mají rychlosti závislé na hodnotách efektivní hmotnosti  $m/z$ . Ionty získanou energií postupují analyzátozem rychlostí  $v$ , takže dráhu  $d$  proletí za dobu  $t$ . Mezi dvěma ionty rozdílných hmotností je tedy diference v dobách letu  $t = k (m_1/z - m_2/z)$ .

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF umožňuje s výjimečnou rozlišovací schopností šetrně separovat molekuly na základě jejich molekulové váhy  $m/z$ . Pro vhodné poměry molekulových vah monomerních jednotek je tudíž v principu možné určit z MALDI-TOF hmotnostního spektra nejen distribuci molekulových vah ale i distribuci složení, neboť molekulová váha je k němu klíčem. Jedná se o metodu s nízkou mezí detekce, například při stanovení peptidu je potřeba pouze femtomolární koncentrace. Pomocí MALDI-TOF jsme schopni změřit hmotnost celé molekuly s přesností mezi 0,1 – 0,01% a praktický hmotnostní limit této techniky se pohybuje kolem 0,5 MDa. Jako laser je většinou používán dusíkový laser pracující při 337 nm, ale můžeme se setkat s použitím Nd:YAG (355 nm, 266 nm), Er:YAG (2940 nm), nebo CO<sub>2</sub> (10600 nm) laserů. Nejčastěji se tato technika používá při analýzách biomolekul.

## 2.6. Fotochemické reakce

Fotochemické reakce - Fotochemie se zabývá reaktivitou excitovaných elektronových stavů molekul, tj. stavů o vyšší energii, vzniklých absorpcí elektromagnetického záření. Organický polutant absorbuje záření, přičemž následně může podléhat fotochemické transformaci. Tento proces se obecně nazývá přímá fotolýza. Druhým typem fotochemického procesu je nepřímá fotolýza, při které se nejdříve excituje senzibilizující látka a ta poté přenáší energii na polutant. U přímé fotolýzy se jedná o chemické reakce, které po ozáření přímo vedou k transformaci na produkty.

## 3. Závěr

Cílem této seminární práce bylo alespoň stručně přiblížit jak se dají lasery použít v analytické chemii. Bylo nastíněno u jakých technik se dají použít, ať už jako detektory, nebo jako iniciační zdroje a jaké typy laserů se dají použít.

Lasery nachází široké uplatnění nejen v analytické chemii, ale také v ostatních oborech lidské činnosti (CD a DVD mechaniky, čtečky čárových kódů,...). Již od 60. let dvacátého století, kdy byl sestaven první laser se lasery začaly používat v různých oblastech a jejich využití se dále rozšiřovalo. Jedním z běžných aplikací, které se již berou jako samozřejmost jsou čárové kódy na zboží.

## 4. Literatura

Engst P., Horák M.: Aplikace laserů, SNTL, 1989

<http://www.rp-photonics.com/encyclopedia.html>

Tůma P., Samcová A.: Stanovení volných aminokyselin v biologických tekutinách kapilární elektroforézou, Chem.Listy 101, 200-207 (2007)

Havlíček V.: Organická hmotnostní spektrometrie a její biologické aplikace, Biol. listy 65 (3-4), 219-257 (2000)

Cremers D.A., Radziemski L.J., Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, London: John Wiley & Sons, 2006