

INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE – KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Úvod:

Infračervená spektrometrie (IR) je analytická metoda molekulové vibrační spektrometrie, která se zabývá studiem pohybů atomů v molekulách, tj. molekulových vibrací. Tato nedestruktivní analytická technika zaznamenává pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Infračerveným zářením rozumíme elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek (λ) 0,78–1000 μm , což odpovídá rozsahu vlnočtů 12800–10 cm^{-1} . Nejpoužívanější jednotkou v IR je vlnocet $\tilde{\nu}$, který je provázán s vlnovou délkou $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ a s frekvencí ν vztahem $\tilde{\nu} = \nu/c$. Celá oblast infračerveného záření bývá dělena na blízkou (12800–4000 cm^{-1}), střední (4000–200 cm^{-1}) a vzdálenou infračervenou oblast (200–10 cm^{-1}). V kvalitativní analýze je nejpoužívanější střední oblast (Mid-Infrared Spectrometry – MIR Spectrometry), kterou můžeme rozdělit na oblast charakteristických vibrací (cca 4000–1500 cm^{-1}), kde se vyskytují absorpční pásy charakteristických funkčních skupin (např. –OH, C=O, N–H, –CH₃, –CH₂ aj.) a oblast otisku palce (1500–400 cm^{-1}), která je dána celkovou strukturou molekuly. MIR spektrometrie je určena především k identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a anorganických látek. V kvantitativní analýze je hojně používána blízká oblast (Near-Infrared Spectrometry – NIR Spectrometry) pro stanovení převážně organických látek. Výhodou IR je možnost měření vzorků jak v plynném (plynová kyveta), kapalném (kyvety, tenký film), tak pevném stavu (technika KBr tablety, tenký film, nujolová technika, reflektanční techniky). V praxi se infračervená spektrometrie využívá v odvětví chemického a farmaceutického průmyslu, potravinářství, kriminalistice, zemědělství a v medicíně.

Princip:

V IR spektrometrii jsou používány dvě základní techniky měření a to transmisní měření a reflektanční (reflexní) techniky. Principem transmisní techniky je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně-vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Pro interpretaci IR spekter jsou důležité především změny vibračních stavů. Vazba mezi atomy v molekule se chová jako pružina, která je schopna absorbovat energii, která je kvantována. Přejít ze základního do vzbuzeného vibračního stavu je vyvolán absorpcí záření o frekvenci rovné frekvenci vibrace dotyčné vazby. Vibrace dvouatomové molekuly se znázorňuje pomocí harmonického oscilátoru. Pro frekvenci harmonického oscilátoru v platí rovnice 1:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

kde k je silová konstanta oscilátoru (charakteristika vazby) a μ je redukovaná hmotnost atomů s hmotnostmi m_1 a m_2 spojených vazbou, viz rovnice 2.

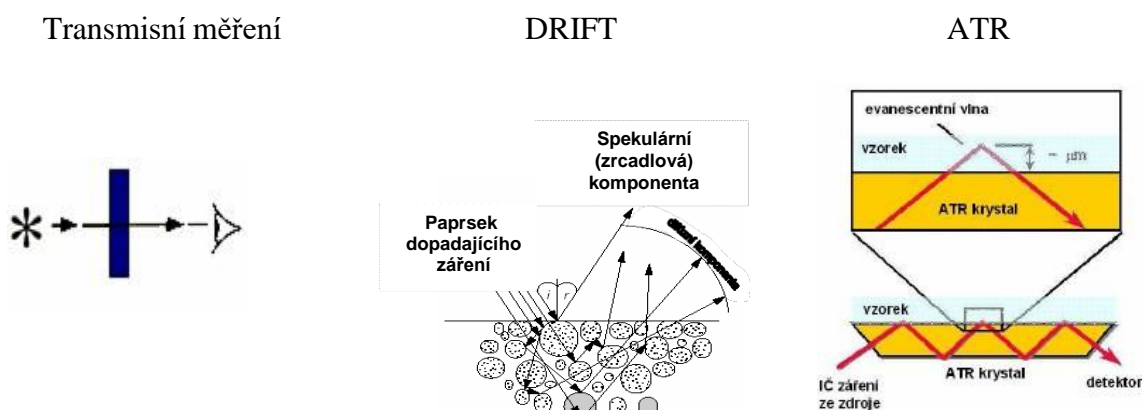
$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

Z rovnice 1 vyplývá, že frekvence vibrace vazby, a tedy frekvence absorbovaného záření, přímo závisí na pevnosti této vazby a nepřímo na hmotnosti atomů spojených touto vazbou.

Alternativou transmisní techniky jsou reflektanční techniky měřící odražené záření. Mezi tyto techniky se řadí difúzní reflektance a zeslabená úplná reflektance (ATR). Difúzní reflektance měří difúzně rozptýlenou složku záření. Principem je, že se paprsek infračerveného záření přivádí přímo na práškový vzorek, kdy část záření je absorbována, část je odražena ve formě

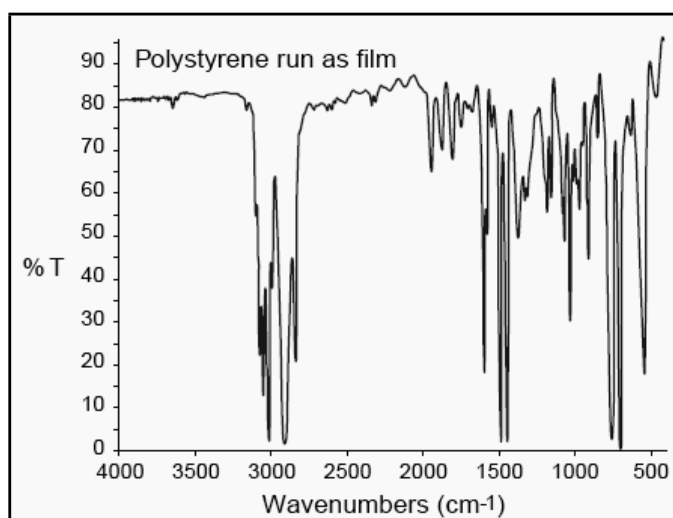
spekulární složky a část je rozptýlena (difúzní reflektance). Tato technika je označována jako DRIFT – Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectrometry.

Zeslabená úplná reflektance (ATR) je založena na principu jednoho nebo vícenásobného úplného odrazu záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřicího krystalu z materiálu o vysokém indexu lomu. Princip ATR techniky je zobrazen na obrázku 1, kde je znázorněn průnik záření ve formě evanescentní vlny (penetrační hloubka) do vzorku. Penetrační hloubka záření do vzorku je řádově v jednotkách μm . Obě tyto techniky jsou méně časově náročné a nevyžadují velké množství vzorku jako u transmisní metody.



Obr. 1: Schémata principu transmisního měření a reflektančních technik

Analytickým výstupem IR je infračervené spektrum (obr. 2), které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorpance (A) na vlnočtu (wavenumbers) dopadajícího záření. V MIR spektru se vyskytují převážně úzké absorpční pásy odpovídající fundamentálním přechodům. V NIR spektru jsou pásy mnohem širší než u MIR spekter, odpovídající svrchním tonům (overtony) a kombinačním pásům. Lze vymezit oblasti, kde jsou dominantní pásy kombinačních přechodů (cca $4000\text{--}5300\text{ cm}^{-1}$), první overtóny (cca $4600\text{--}7300\text{ cm}^{-1}$), druhé overtóny (cca $6000\text{--}10000\text{ cm}^{-1}$) a třetí overtóny (cca $8800\text{--}14500\text{ cm}^{-1}$).

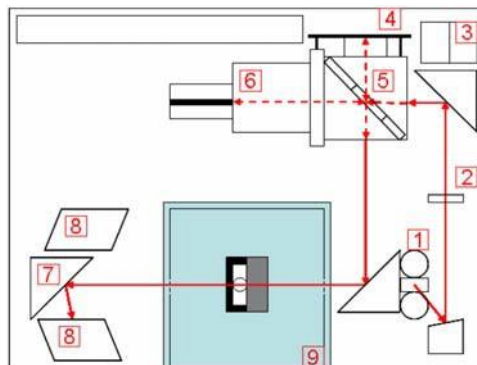


Obr. 2: IR spektrum polystyrenu

Pro kvantitativní vyhodnocení NIR spekter nelze použít Lambertův-Beerův zákon, protože pásy jsou obvykle široké i pro čisté látky a nelze tak vyloučit překryv pásů různých složek a vzájemné vlivy měnících se koncentrací jednotlivých složek na tvar příslušných absorpčních pásů. Proto je třeba pro kalibraci v NIR spektrometrii vyvíjet kalibrační modely s využitím pokročilých chemometrických algoritmů. V současné době se nejvíce uplatňují dvě regresní metody, a to regrese hlavních komponent (PCR – Principal Component Regression) a metoda částečných nejmenších čtverců (PLS – Partial Least Squares).



Nicolet iS 50 FT-IR spektrometr



Obr. 3: Schéma FT-IR spektrometru (1 – zdroj záření, 2 – apertura, 3 – nepoužívané děliče paprsků, 4 – pevné zrcadlo, 5 – dělič paprsků, 6 – pohyblivé zrcadlo, 7 – otočné zrcadlo, 8 – detektor, 9 – vzorkový prostor)

Úkoly:

- Úkol č. 1: Identifikace organické látky pomocí infračervené spektrometrie ve střední oblasti
- Úkol č. 2: Stanovení ethanolu v alkoholickém nápoji pomocí NIR spektrometrie

Úkol č. 1: Identifikace organické látky pomocí infračervené spektrometrie ve střední oblasti

- Změřte infračervené spektrum předloženého vzorku organické látky transmisí technikou KBr tablety.
- Změřte infračervené spektrum vzorku technikou ATR.
- Vyhodnoťte IR spektra a interpretujte charakteristické funkční skupiny.

Přístroje, chemikálie:

FT-IR spektrometr (Nicolet iS 50, Thermo, USA – viz obr. 3)

vzorek organické látky

KBr čistoty vhodné pro IR spektrometrii

Tabulka 1: Parametry měření pro transmisní a reflexní techniku

Parametry	Transmisní technika	ATR
Rozsah vlnočtů	4000–400 cm ⁻¹	4000–400 cm ⁻¹
Rozlišení	4 cm ⁻¹	4 cm ⁻¹
Počet skenů	32	64
Dělič paprsku	KBr	KBr
Detektor	DTGS KBr	DTGS KBr
Zdroj záření	IR	IR

Pracovní postup:

– Technika KBr tablety

Malé množství vzorku (1–2 mg) se smísí s 300–400 mg KBr v achátové třecí misce. Dokonale zhomogenizovaná směs se použije k přípravě tablety. Směs převedeme do ocelové raznice a v ní se vystaví působení tlaku cca 80 kN/m² na hydraulickém lisu po dobu 5–10 minut. Po dobu lisování odsáváme prostor raznice vývěvou. Vzniklá vylisovaná transparentní tableta se přenese do držáku a umístí do vzorkového prostoru spektrometru. Parametry měření jsou uvedeny v tabulce 1. Před začátkem měření jednotlivých standardů je potřeba změřit samostatnou tabletu KBr jako pozadí. Vylisovaná tableta KBr je zcela propustná pro infračervené záření, takže spektrometr zaznamenává pouze spektrum vzorku, který je v KBr matici rozptýlen.

– Technika zeslabené úplné reflektance – ATR

Malé množství vzorku se převede na diamantový krystal. Pomocí nástavce se vzorek přitlačí ke krystalu, aby byl s ním v dokonalém kontaktu, a provede se měření podle parametrů v tabulce 1.

Zpracování výsledků:

V naměřených spektrech vyhodnotíte nejintenzivnější pásy, zapište si jejich vlnočty a intenzitu. Proveďte přiřazení těchto pásů jednotlivým funkčním skupinám na základě předložené tabulky od vedoucího cvičení a pomocné tabulky 3 (Příloha 1).

V protokolu uveďte tabulku vlnočtů maxim pásů a jejich intenzit pro vzorek organické látky s pravděpodobným přiřazením funkčních skupin.

Při interpretaci je vhodné držet se jistých základních pravidel:

- Postupovat od nejvyšších vlnočtů směrem k nižším. Začněte s nejvýraznějšími absorpčními pásy v oblasti 3700–2700 cm⁻¹, pokuste se nejprve zjistit typ skeletu (aromatický, alifatický nasycený, nenasycený atp.) a pak analyzovat možné substituenty.
- U jednotlivých pásů zhodnotit jejich polohu, intenzitu, tvar a symetrii s využitím tabulky 2 a tabulky od vedoucího cvičení. Poloha absorpčních pásů některých skupin je závislá na přítomnosti ostatních funkčních skupin v molekule. Výsledky je proto vždy nutno konfrontovat.
- Má-li být daná funkční skupina v molekule prokázána, měly by být nalezeny všechny absorpční pásy, které ji charakterizují, a měly by korespondovat i intenzity jednotlivých absorpčních pásů (v případě intenzit je nutno respektovat poměr intenzit, jejich absolutní hodnota je totiž závislá na zastoupení skupin v molekule). Naopak z nepřítomnosti pásů v určitých oblastech lze přítomnost některých funkčních skupin nebo vazeb vyloučit.
- Není (ani teoreticky) možné přiřadit všechny absorpční pásy jednotlivým částem molekuly.

Úkol č. 2: Stanovení ethanolu v alkoholickém nápoji pomocí NIR spektrometrie

- Připravte a naměřte NIR spektra kalibračních roztoků ethanolu, parametry měření jsou uvedeny v tabulce 2.
- Naměřte NIR spektrum předloženého modelového vzorku a libovolného alkoholického nápoje (např. domácí pálenka).
- Proveďte kvantitativní vyhodnocení metodou PLS pomocí programu TQ Analyst.

Přístroje, chemikálie:

FT-IR spektrometr (Nicolet iS 50, Thermo, USA)

křemenná kvjeta 1 nebo 2 cm

ethanol (nedenaturovaný)

Tabulka 2: Parametry měření pro transmisní techniku NIR

Parametry	Transmisní technika NIR
Rozsah vlnočtů	12500–4000 cm^{-1}
Rozlišení	8 cm^{-1}
Počet skenů	32
Dělič paprsku	CaF ₂
Detektor	InGaAs
Zdroj záření	Bílé světlo

Pracovní postup

- Do 25 ml odměrných baňek připravíme sadu kalibračních roztoků ethanolu o koncentraci 0, 20, 30, 40, 50 a 60 % (v/v).
- Změříme referenční spektrum (Background) a postupně spektra jednotlivých kalibračních roztoků v křemenné kyvetě s tloušťkou 10 cm v rozsahu vlnočtů 12500–4000 cm^{-1} .
- NIR spektra kalibračních roztoků podle potřeby upravíme a uložíme s vedoucím cvičení.
- Změříme NIR spektrum modelového vzorku a alkoholického nápoje, spektrum podle potřeby upravíme a uložíme.
- V programu TQ Analyst zvolíme metodu PLS k vyhodnocení kalibrační závislosti a koncentrace ethanolu ve vzorcích. V programu TQ Analyst postupujeme podle návodu uvedeného níže (viz. Příloha 2)

Zpracování výsledků

Vyhodnocení pomocí PLS metody (TQ Analyst), do protokolu uvést procentuální koncentraci ethanolu v modelovém vzorku a alkoholickém nápoji.

Použitá literatura

1. <http://lms.vscht.cz/Zverze/Infrared.htm>.
2. http://tftp.zcu.cz/files/pdf/skripta_kap3_irspektrometrie.pdf.
3. http://www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf.
4. <http://www.vscht.cz/anl/lach2/NIR.pdf>
5. Holler F.J., Skoog D.A., Crouch S.R.: Principles of Instrumental Analysis, 6. edice, Books/Cole, Cengage Learning, USA, 2007.

Přílohy

Příloha 1: Tabulka 3: Vybrané valenční vibrace

Absorbující vazba	Přibližný vlnčet (cm^{-1})	Intenzita píku a vzhled
O-H volná	3600	Střední
O-H (alkoholy, fenoly), vázaná intermolek. H-mostem	3500–3100	Silná, široký pás
O-H (alkoholy, fenoly), vázaná intramolek. H-mostem	3400–2500	Silná
N-H (aminy primární)	3500–3000	Střední, zdvojený pás
N-H (aminy sekundární)	3500–3000	Střední
N-H (amidy primární)	3500–3300	Střední, zdvojený pás
N-H (aminy sekundární, laktamy)	3450–3300	Střední
C-H (alkany)	2980–2850	Slabá, zdvojený pás
C-H (alkiny)	3300	Silná
C-H (alkeny)	3100–3000	Slabá
C-H (aromatické)	3050–2950	Velmi slabá
C-H (aldehydické)	2900–2700	Slabý, zdvojený pás
C-trojná-C	2250–2100	Slabá až střední
C-trojná-N	2270–2200	Silná, velmi ostrý
C=O (anhydridy)	1850–1800 a	Silná
	1790– 740	
C=O (chloridy kyselin)	1820–1790	Silná
C=O (estery)	1750–1730	Silná
C=O (amidy primární)	1690–1600	Silná
C=O (amidy sekundární)	1700–1670 a	Silné
	1550–1500	
C=O (aldehydy, ketony)	1740–1695	Silná
C=O (ketony cyklické šestičlenné)	1730–1700	Silná
C=O (ketony cyklické pětičlenné)	1750–1740	Silná
C=C (alkeny)	1680–1640	Slabá
C=C (dieny)	1650–1600	Silná, zdvojený pás
C=C (aromáty)	1600–1500	Střední, zdvojený až ztrojený pás
C=N	1700–1620	Střední až silná
NO₂	1550 a 1350	Silná
C-O (alkoholy, ethery, estery)	1300–1100	Silná
C-F	1400–1000	Střední
C-Cl	800–600	Střední
C-Br	600–500	Střední
C-I	500–400	Střední

Příloha 2: TQ Analyst

1. krok – výběr metody

TQ Analyst - [New Method]

File Edit View Diagnostics Window Help

Calibrate | Quantity | Explain | Close | Performance Index: N/A Previous: N/A | ■ Uncalibrated

Description | Pathlength | Components | Standards | Spectra | Regions | Conditions | Other | Report

Suggest | How To...

Revision: 0
Last saved: Tue Nov 29 14:31:10 2011 (GMT+01:00)

Method Title
Stanovení ethanolu NIR spektrometrií

Analysis Type

Quantitative analysis

- Single Beer's law
- Classical least squares (CLS)
- Stepwise multiple linear regression (SMLR)
- Partial least squares (PLS)
- Principal component regression (PCR)
- Undecided

Classification

- Stability match
- Distance match
- Discriminant analysis
- Search standards
- QC Compare search

Measurement

- Measurement only

Developer's Name

Method Description

2. krok – volba typu tloušťky absorpčního prostředí

TQ Analyst - [New Method]

File Edit View Diagnostics Window Help

Calibrate | Quantity | Explain | Close | Performance Index: N/A Previous: N/A | ■ Uncalibrated

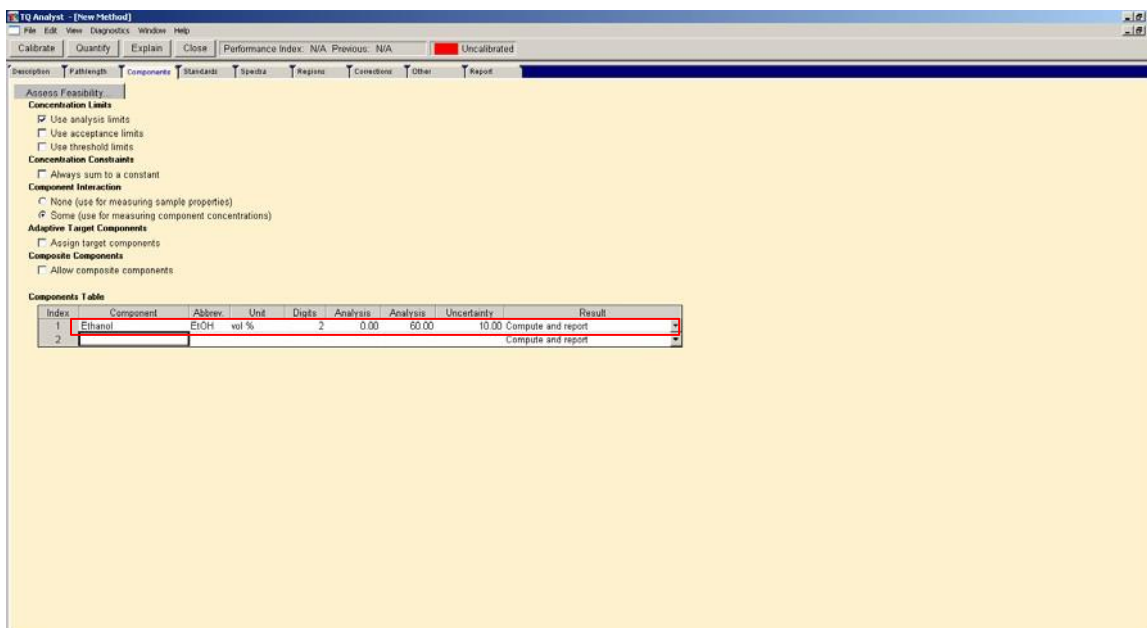
Description | Pathlength | Components | Standards | Spectra | Regions | Conditions | Other | Report

Suggest | Advanced | Edit Region

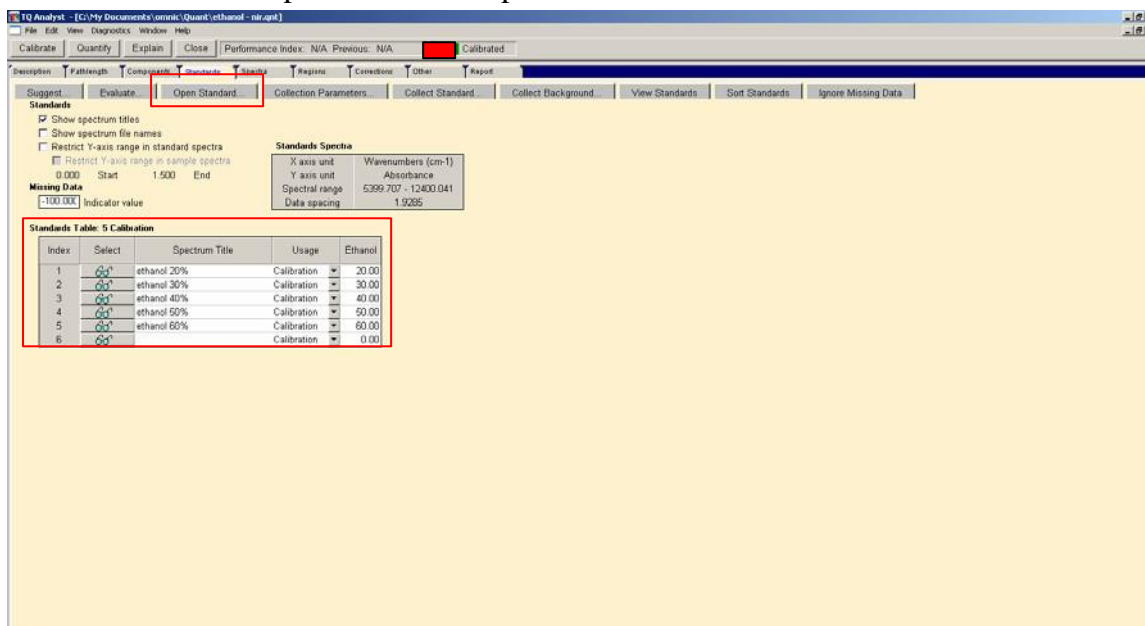
Pathlength Type

- Constant
- Undecided
- Known
- Predict
- Internal reference (A_{ik}B_jC)
- Peak ratio or Normalize (A_{ik}B_jC)
- Multiplicative signal correction (MSC)
- Standard normal variate (SNV)

3. krok – specifikace stanovovaných analytů (název stanovované složky, její zkratka, jednotky veličiny použité pro kvantitativní analýzu, horní a dolní limit pro analýzu)



4. krok – vložení spekter standardů pro kalibraci



5. krok – výběr spektrální oblasti

The screenshot shows the TQ Analyst interface. The 'Suggest' button in the top toolbar is highlighted with a red box. A 'Suggest Regions' dialog box is open, featuring a spectral plot with a blue vertical bar indicating a selected region. The dialog contains the following text:

TQ Analyst will analyze the components and standards data. It will identify spectral regions which correlate to component concentration. Suggestions for baseline handling within each region will also be provided.

If the pathlength type is Undecided, TQ Analyst will also suggest a pathlength type at the time.

You must enter component concentrations and collect spectra of each standard before continuing.

At the bottom of the dialog, the 'Suggest' button is highlighted with a red box.

Regions Table

Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset
1	Spectrum Range	7,117.00		None			
2	Spectrum Range	6,963.00		None			
3		8,919.00					
		7,553.00					

Components in Regions Table

Index	Measurement Location / Range	ETH
1	7117.00 - 6963.00	+
2	8919.00 - 7553.00	+

6. krok – kalibrace

The screenshot shows the TQ Analyst interface. The 'Calibrate' button in the top toolbar is highlighted with a red box. The 'Regions Table' and 'Components in Regions Table' are visible, showing the same data as in the previous step.

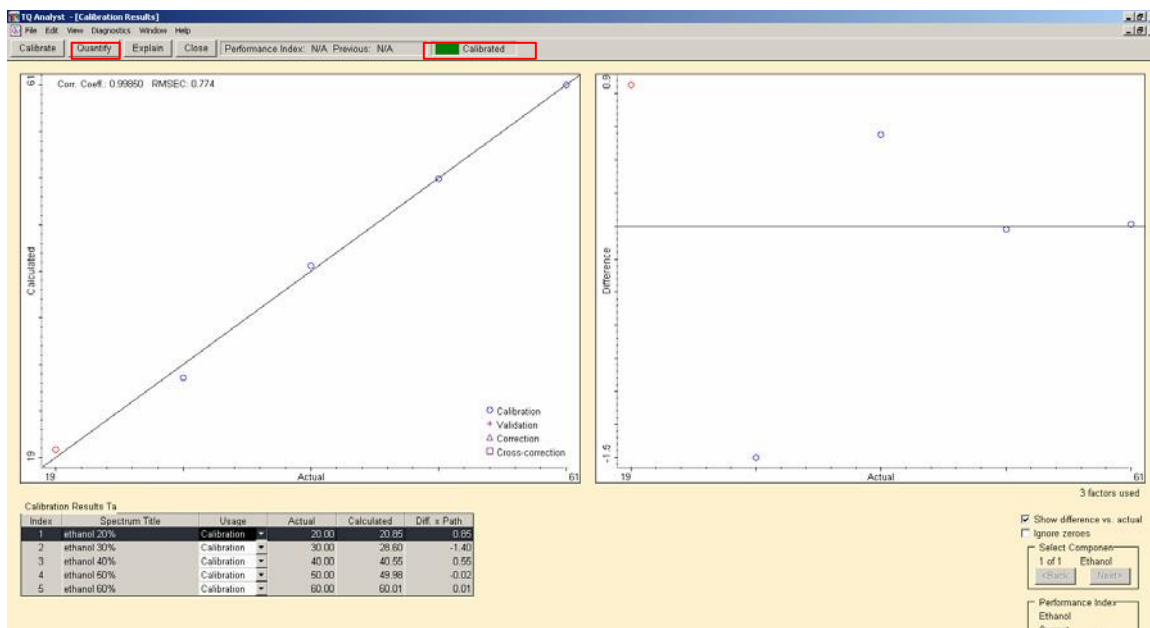
Regions Table

Index	Region Type	Location	% or Ht	Baseline Type	Point 1	Point 2	Offset
1	Spectrum Range	7,117.00		None			
2	Spectrum Range	6,963.00		None			
3		8,919.00					
		7,553.00					

Components in Regions Table

Index	Measurement Location / Range	ETH
1	7117.00 - 6963.00	+
2	8919.00 - 7553.00	+

7. krok – Výsledky kalibrace



8. krok – kvantifikace

Corr. Coeff: 0.99850 RMSEC: 0.774

Index	Spectrum Title	Usage	Actual	Calculated	Diff. x Path
1	ethanol 20%	Calibration	20.00	20.85	0.85
2	ethanol 30%	Calibration	30.00	28.60	-1.40
3	ethanol 40%	Calibration	40.00	40.55	0.55
4	ethanol 50%	Calibration	50.00	49.98	-0.02
5	ethanol 60%	Calibration	60.00	60.01	0.01

Vybrat spektrum vzorku