

INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE – KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ

Úvod:

Infračervená spektrometrie (IR) je analytická technika 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 0,78 – 1000 μm , což odpovídá rozsahu vlnočtů 12 800 – 10 cm^{-1} . Nejpoužívanější jednotkou v IR je vlnočet $\tilde{\nu}$, který je provázán s vlnovou délkou λ vztahem $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ a s frekvencí ν vztahem $\tilde{\nu} = \nu/c$. Celá oblast infračerveného záření bývá dělena na blízkou (12 800 – 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 (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 – 200 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 používaná 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 techniky měření a to transmisní měření a reflektanční (reflexní) techniky. Principem transmisní metody 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. Přechod 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 ν platí:

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

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

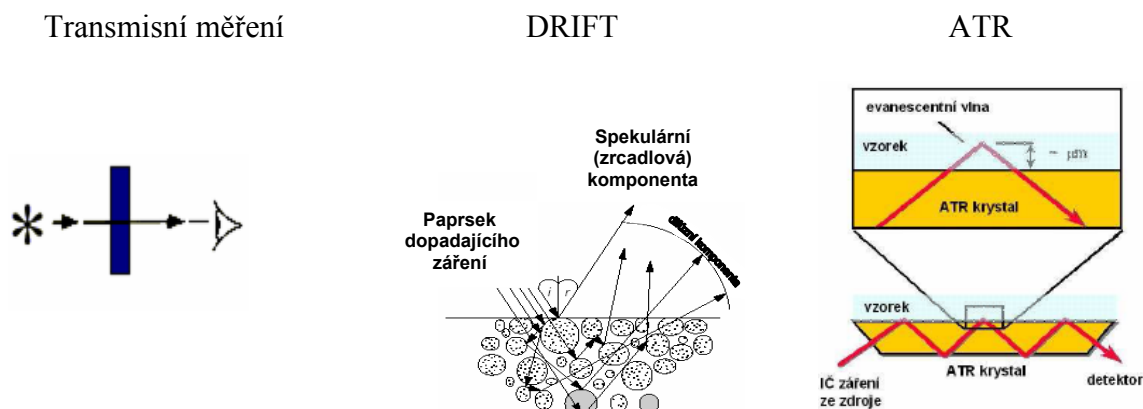
$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (2)$$

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

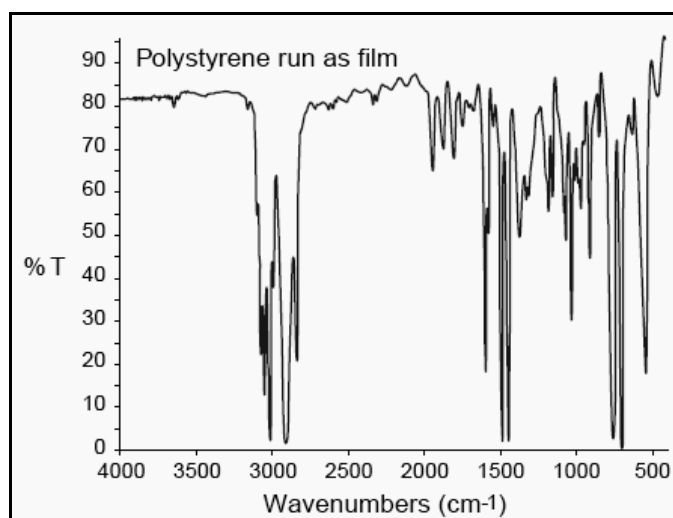
spekulární složky a část je rozptýlena (difúzní reflektance). Tato technika je označována jako DRIFT - Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy.

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 je infračervené spektrum (Obr. 2), které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (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 $4000 - 5300 \text{ cm}^{-1}$), první overtóny (cca $4600 - 7300 \text{ cm}^{-1}$), druhé overtóny (cca $6000 - 10000 \text{ cm}^{-1}$) a třetí overtóny (cca $8800 - 14500 \text{ cm}^{-1}$).

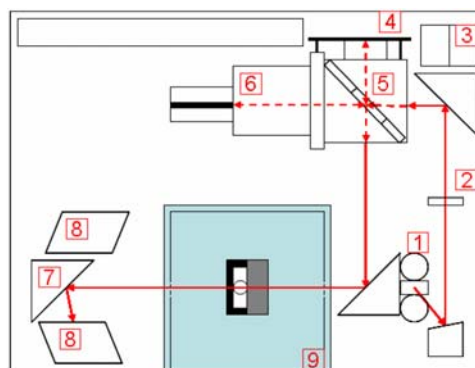


Obr 2: IR spektrum polystyrenu

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 6700 FT-IR spektrometr



Obr. 3: Schéma FT-IR spektrometru (1 – zdroj záření, 2 – apertura, 3 – nepoužívané beamsplittery, 4 – pevné zrcadlo, 5 – beamsplitter, 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 transmisní technikou KBr tablety.
- Změřte infračervené spektrum vzorku technikou ATR.
- Vyhodnoťte IR spektra a interpretejte charakteristické funkční skupiny.

Přístroje, chemikálie

FT-IR spektrometr (Nicolet 6700, Thermo, USA)

vzorek organické látky

Tabulka 1: Parametry měření pro transmisní a reflexní techniku

| Parametry | Transmisní technika | ATR |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Rozsah vlnočtů | 4000 – 400 cm^{-1} | 4000 – 600 cm^{-1} |
| Rozlišení | 4 cm^{-1} | 8 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 10 tun na hydraulickém lisu po dobu 5 -10 minut. Po dobu lisování odsáváme prostor raznice vývěvou. Vzniklá vylisovaná transparentní tableta se převede do držáku a umístí do vzorkového prostoru spektrometru. 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 ZnSe krystal. Pomocí nástavce se vzorek přitlačí ke krystalu, aby byl s ním v dokonalém kontaktu a provede se měření.

Zpracování výsledků

V naměřených spektrech vyhodnoťte 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 $3700 - 2700 \text{ cm}^{-1}$, 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.
- Naměřte NIR spektrum předloženého modelového vzorku a libovolného alkoholického nápoje (např. domácí pálenka).
- Proveďte kvantitativní vyhodnocení metodou PLS (Partial Least Squares) pomocí programu TQ Analyst.

Přístroje, chemikálie

FT-IR spektrometr (Nicolet 6700, Thermo, USA)

Křemenná kyveta 10 cm, Ethanol

Tabulka 2: Parametry měření pro transmisní techniku NIR

| Parametry | Transmisní technika NIR |
|----------------|--------------------------------|
| Rozsah vlnočtů | 12 500 – 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 12 500 – 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://ttp.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 vlnoččet (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 – 1740 | |
| 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

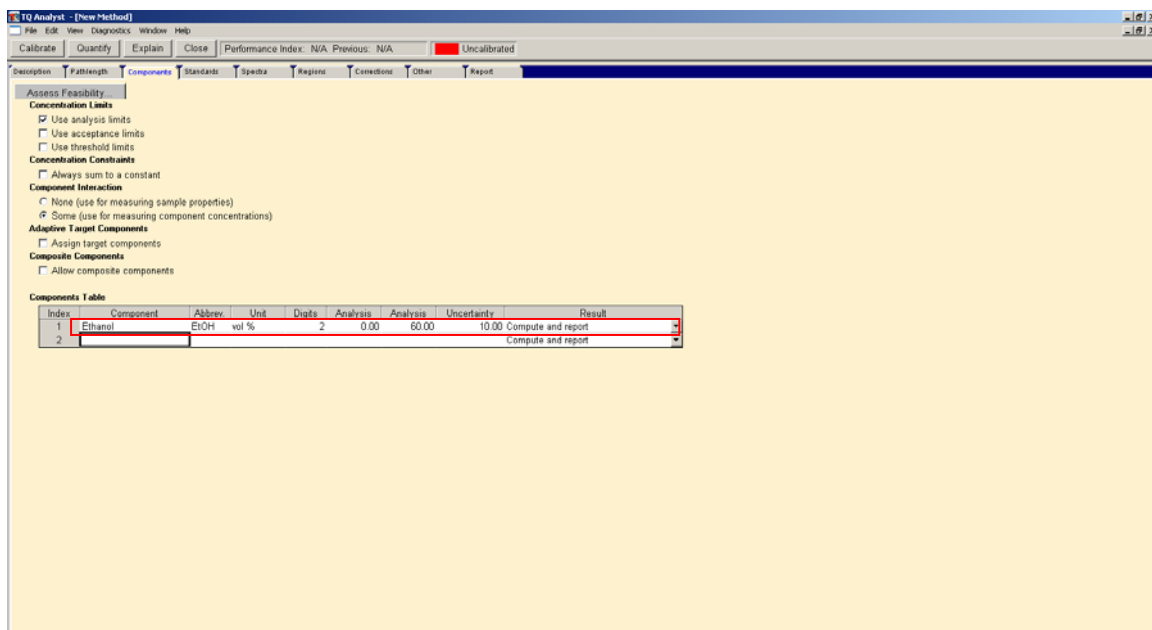
1. krok – Výběr metody

The screenshot shows the 'TQ Analyst - [New Method]' window. The 'Method Title' field contains 'Stanovení ethanolu NIR spektrometrií'. Under 'Analysis Type', the 'Quantitative analysis' section is active, with 'Partial least squares (PLS)' selected. Other options include 'Single Beer's law', 'Classical least squares (CLS)', 'Stepwise multiple linear regression (SMLR)', 'Principal component regression (PCR)', and 'Undecided'. The 'Classification' section includes 'Similarity match', 'Distance match', 'Discriminant analysis', 'Search standards', and 'QC Compare search'. The 'Measurement' section has 'Measurement only' selected. The 'Developer's Name' and 'Method Description' fields are empty. The top right shows 'Revision: 0' and 'Last saved: Tue Nov 29 14:31:10 2011 (GMT+01:00)'. The bottom navigation bar includes 'Suggest', 'How To...', 'Pathlength', 'Components', 'Standards', 'Spetra', 'Regions', 'Connections', 'Other', and 'Report'.

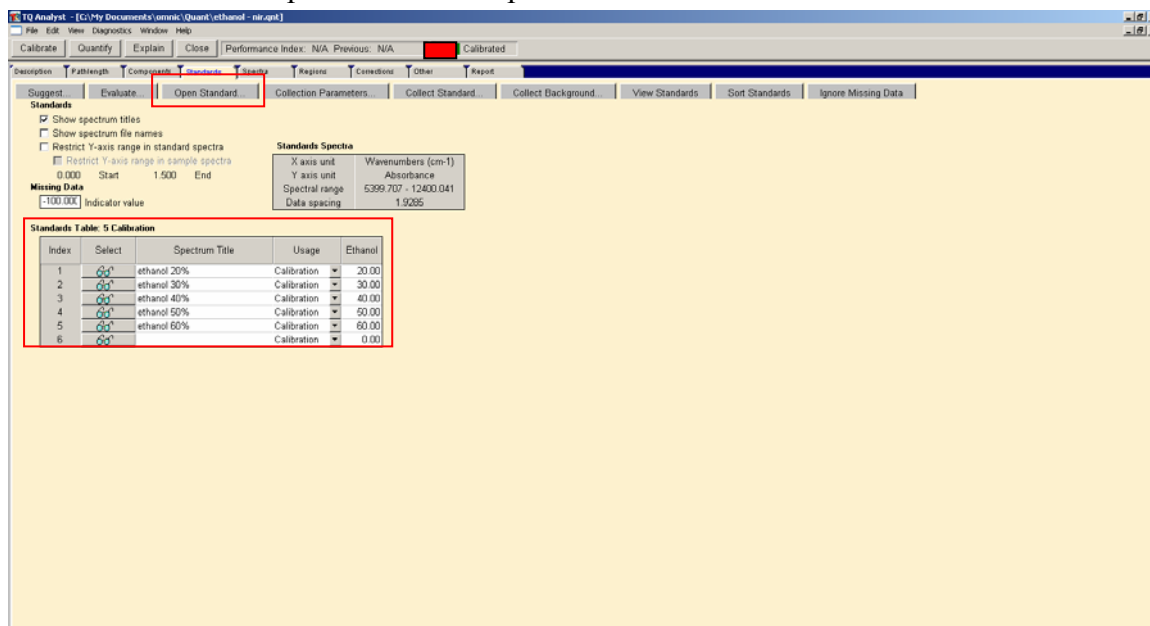
2. krok - Volba typu tloušťky absorpčního prostředí

The screenshot shows the 'TQ Analyst - [New Method]' window with the 'Pathlength Type' section selected. The 'Constant' option is selected. Other options include 'Undecided', 'Mirror', 'Predict', 'Internal reference (A=k*b*c)', 'Peak ratio or Normalize (A/B=k*E)', 'Multiplicative signal correction (MSC)', and 'Standard normal variate (SNV)'. The top navigation bar includes 'Suggest', 'Advanced', and 'Edit Region'. The bottom navigation bar is the same as in the previous screenshot.

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

TQ Analyst will analyze the components and standards data. It will identify spectral regions which correlate to component concentrations. 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 this time.

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

TQ Expert < Back **Next >** Cancel

| 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 | | | | | |

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

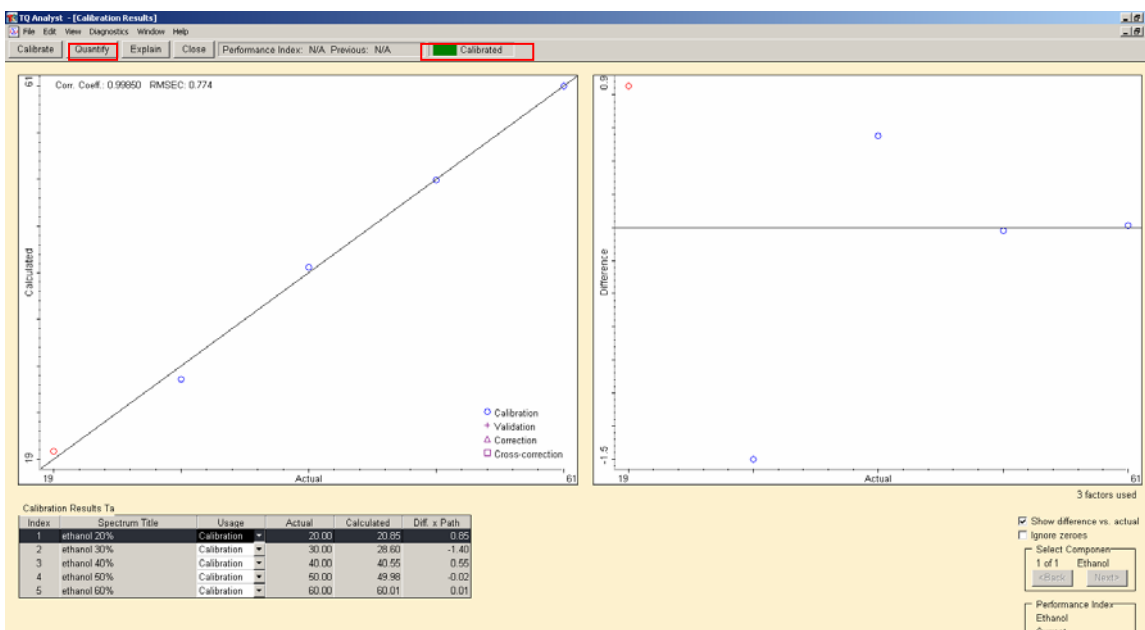
6. krok – Kalibrace

Calibrate Quantify Explain Close Performance Index: N/A Previous: N/A Calibrated

| 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 | | | | | |

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

7. krok - Výsledky kalibrace



8. krok - Kvantifikace

