

Infračervená spektroskopie v MIR a NIR oblastech

A. Vlnočtová kalibrace infračervených spektrometrů

Pro využití informací obsažených v infračervených absorpčních spektrech je mimo jiné nutná znalost přesných hodnot vlnočtů záření v rozsahu požadovaného spektra. U běžných disperzních přístrojů údaj vlnočtu na registračním zařízení neodpovídá přesně skutečnosti. Odchyšky mnohdy dosahují i několik desítek cm^{-1} a liší se nejen u různých přístrojů, ale i v různých oblastech spektra měřeného na stejném zařízení. Pro přesná měření je nutno vlnočtovou stupnici každého spektrometru oceňovat, t.j. sestavit kalibrační křivku, s jejíž pomocí se pak korigují experimentálně určené vlnočty.

V praxi se kalibrace disperzních spektrometrů běžně provádí pomocí literárních údajů o vlnočtech absorpčních pásů pro tento účel vhodných sloučenin, jejichž spektra byla velmi přesně změřena. Látky používané ke kalibraci by měly být snadno přístupné v požadované čistotě a v kalibrované oblasti musí vykazovat dostatek úzkých, přiměřeně intenzivních absorpčních pásů, jejichž vlnočty jsou s potřebnou přesností známy. Pro rutinní kalibraci (přesnost 1 cm^{-1}) spektrometru pracujícího ve střední infračervené oblasti ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$) obvykle postačují dvě až tři látky, nejčastěji polystyrenová folie ($700 - 2000$ a $2800 - 3100 \text{ cm}^{-1}$) a atmosferické vodní pára a oxid uhličitý ($300 - 800$, $1300 - 2000$, $2300 - 2400$ a $3400 - 3900 \text{ cm}^{-1}$). Pro přesnější měření počet potřebných standardních látek značně vzrůstá. Nejčastěji jsou využívána rotačně-vibrační spektra plynů, na př. amoniaku ($800 - 1100 \text{ cm}^{-1}$), oxidu uhelnatého ($2000 - 2200 \text{ cm}^{-1}$), chlorovodíku ($2600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$) a dalších. Velmi výhodně se ke kalibraci využívá jednopaprskového provozu spektrometru. Vzorkem jsou oxid uhličitý a vodní pára obsažené ve vzduchu, takže odpadá jakákoliv manipulace s květy.

Kalibrace infračervených spektrometrů pracujících na principu interferometru je velmi rychlá a snadná. Integrální součástí takových přístrojů je He-Ne laser, sloužící ke kontrole polohy pohyblivého zrcadla interferometru. Vlnočtem jím emitovaného záření je přesně znám a lze ho proto využít i ke kalibraci vlnočtové stupnice měřených spekter. Plně k tomu postačí kontrola vlnočtu jediného pásu v rotačně-vibračním spektru vodní páry a případná úprava hodnoty vlnočtu He-Ne laseru uvedená v optických parametrech.

Úkoly

1. Vlnočtová kalibrace spektrometru IFS 28 (IFS 55)

Spustíme program OPUS a dialogový box MĚŘENÍ otevřeme kliknutím levého tlačítka myši na ikonu MEAS. K měření použijeme metodu (EXPERIMENT) uloženou v souboru CALIB.XPM, který vybereme po zadání příkazu LOAD. Aktivujeme funkci ALIGN_MODE a vyčkáme až se stabilizuje výkon zdroje (optimálně $20\,000 - 22\,000$ counts). Z nabídky SET_UP (SET_UP > OPTICS > OPTIONS&SETTINGS > LASER_WAVENUMBER) zjistíme nastavený vlnočt He-Ne laseru ($15\,800.521 \text{ cm}^{-1}$). Změříme spektrum pozadí (BACKGROUND) a příkazem SAVE ho uložíme do souboru (vytvoří se soubor s označením [100] na stavové liště). Pomocí funkce POST_ZERO_FILL (faktor 8) v nabídce MANIPULATE spektrální křivku upravíme (vytvoří se soubor [1]), zobrazíme ji na displeji a funkcí X/Y nastavíme optimální rozsah obou os. Funkcí ZOOM zobrazíme na celé obrazovce pouze pás s vlnočtem cca 1554 cm^{-1} . Modulem TABEL (GET_DISPLAY_LIMITS, PEAKS >1 %) určíme přesnou hodnotu vlnočtu tohoto pásu (v_{exp}) a korigovanou hodnotu vlnočtu He-Ne laseru vypočteme ze vztahu

$$v_{\text{corr}} = 1554.353 * 15800.521 / v_{\text{exp}}$$

2. Stanovení relativní vlhkosti v prostoru spektrometru

Metodou MOIST.XPM (16 scans) změříme spektrum pozadí (BACKGROUND) a příkazem SAVE ho uložíme do souboru. Zobrazíme ho na displeji a funkcí X/Y nastavíme optimální rozsah obou os. Maximální hodnotu Y-souřadnice si zapíšeme (Y_{max}). Funkcí ZOOM zobrazíme okolí pásu s vlnočtem cca 1559 cm^{-1} a kurzorem zjistíme hodnotu jeho Y-souřadnice (Y_{1559}), kterou si rovněž poznamenejme. Relativní vlhkost v prostoru spektrometru pak určíme ze vztahu

$$M_{\text{rel}} (\%) = 100 \cdot (1 - Y_{1559}/Y_{\text{max}})$$

Pokud zjištěná hodnota přesahuje 70 %, je nutno obnovit náplň patron s molekulovým sítím, aby nedocházelo ke korozi optických prvků z KBr.

Protokol

Uvedeme vypočtené hodnoty z obou úkolů.

B. Měření tloušťky kapalinových kyvet

Při průchodu infračerveného záření prázdnou kapalinovou kyvetou vznikají interference mezi paprsky mnohonásobně reflektovanými vnitřními stěnami kyvety. Tyto interference závisí na vlnočtu procházejícího záření a vzdálenosti mezi vnitřními stěnami kyvety, t.j. její tloušťce. Grafický záznam měření prázdné kapalinové kyvety není proto přímka rovnoběžná s osou vlnočtů, nýbrž zvlněná křivka (s rostoucí tloušťkou kyvety klesá vzájemná vzdálenost maxim). Na infračerveném spektrometru lze tedy tloušťku kapalinových kyvet snadno a přesně měřit. Významné je, že se určí tloušťka té části kyvety, kterou prochází paprsek při jejím použití.

Odečtením počtu maxim resp. minim (n) ležících mezi dvěma vlnočty ν_1 a ν_2 maxim resp. minim lze zjistit tloušťku kyvety ze vztahu

$$d = (n + 1) / 2(\nu_2 - \nu_1) \quad [\text{cm}]$$

Interferenční maxima jsou tím zřetelnější, čím lepší je paralelita okének kyvety. Pokud nelze interferenční vlny pozorovat, je to vždy způsobeno nevyhovující paralelitou okének kyvety. Rovnoměrnější přitažení šroubů na držáku rozebiratelné kapalinové kyvety tento problém eliminuje.

Úkol

1. Měření tloušťky nerozebiratelných kapalinových kyvet

Metodou SOURCE.XPM (8 scans) změříme spektrum pozadí a potom spektra prázdných nerozebiratelných kapalinových kyvet. K určení hodnot vlnočtů obou zvolených krajních hodnot vlnočtů (např. v oblasti $2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$) využijeme modulu TABEL, počet maxim (alespoň 8) ležících mezi nimi odečteme na displeji.

Protokol

Vypočteme tloušťku kyvet v **mm** a výsledky srovnáme s údaji výrobce.

C. Měření spekter pevných látek ve střední infračervené oblasti (MIR)

Pevné látky je třeba pro získání infračerveného (MIR) spektra vhodným způsobem upravit. Měří se jejich roztoky ve vhodném rozpouštědle, suspenze v nujolu, hexachlorbutadienu nebo polychlorotrifluoretylenu, vylišované tablety s bromidem draselným nebo chloridem stříbrným, filmy vzniklé odpařením rozpouštědla z roztoku na vhodné podložce, napařené vrstvy a pod. Volba vhodné metody může mít rozhodující vliv na kvalitu získaných výsledků. Naproti tomu měření Ramanových spekter prakticky žádnou úpravu vzorku nevyžaduje. Vzorek se naplní do skleněné kapilární kyvety a je-li citlivý ke vzdušné vlhkosti, kyveta se v inertní atmosféře zataví.

Nejrozšířenější je technika roztírání pevných vzorků s parafinovým olejem (**nujolem**), jehož infračervené spektrum je k dispozici v knihovně CVICENI. Doplňující měření se obvykle provádí se suspenzí v hexachlorbutadienu nebo poly-(chlorotrifluoretylenu), které nemají absorpční pásy v oblastech, v nichž absorbuje nujol. Jejich infračervená spektra jsou uložena rovněž v knihovně CVICENI. Suspenze se plní do rozebíratelných kapalinových kyvet bez distanční folie. Kapilárními silami se mezi okénky udrží vrstvička vzorku potřebná pro měření.

Okénka kyvet musí být zhotovena z materiálů, které dobře propouštějí infračervené záření a jsou současně chemicky inertní vůči měřeným vzorkům. Sklo a křemen běžně používané při měření viditelných, ultrafialových a NIR absorpčních spekter nelze v infračervené oblasti použít, protože toto záření téměř kvantitativně absorbují. Běžně se používá okének zhotovených z monokrystalů LiF (1600 cm^{-1}), CaF₂ (1100 cm^{-1}), NaCl (670 cm^{-1}), KBr (370 cm^{-1}), KRS-5 (250 cm^{-1}) a CsI (200 cm^{-1}). V závorkách jsou uvedeny dlouhovlnné hranice propustnosti jednotlivých materiálů. CaF₂ a KRS-5 (směsné monokrystaly bromidu a jodidu thallného) jsou ve vodě prakticky nerozpustné a lze v nich proto měřit vodné roztoky. Při takových měřeních je limitujícím faktorem kontinuální absorpce infračerveného záření rozpouštědlem. V H₂O je dostupná pouze oblast nad 900 cm^{-1} , v D₂O lze měřit až do 400 cm^{-1} .

Příprava suspenze pevného vzorku

50 až 100 mg vzorku (v případě potřeby rozetřený v achátové třecí misce), přeneseme na zdrsňenou skleněnou desku a přikápneme 2 až 3 kapky nujolu (hexachlorbutadienu nebo poly-(chlorotrifluorethylenu). Druhou deskou pak směs roztíráme tak dlouho (cca 1 min.), až získáme homogenní suspenzi. Je-li třeba, přidáváme během roztírání vzorek nebo nujol tak, abychom dosáhli optimálního poměru obou složek. Výsledná suspenze v nujolu by měla mít konzistenci podobnou zubní pastě, při přípravě suspenze v hexachlorbutadienu je vhodné pracovat v digestoři.

Připravenou suspenzi z desek setřeme stěrkou z umělé hmoty a kovovou lopatičkou ji nanese na střed spodního okénka rozebíratelné kapalinové kyvety. Nanášení je nutno provádět velmi opatrně, abychom kovovým nástrojem nepoškrábali leštěný povrch okénka. Přiložením druhého okénka se z dobře připravené suspenze vytvoří kruh nebo elipsa. Ukáže-li první měření nevyhovující množství vzorku, je třeba kyvetu vyčistit a znovu naplnit.

Čistění kyvetových okének z materiálu rozpustného ve vodě

Okénko nejprve otřeme kouskem papírové vaty a zbytky suspenze odstraníme dalším kouskem vaty smočeným ve vhodném organickém rozpouštědle. Leštění provádíme na deskách potažených flanelem s krátkým vlasem. Okénko položíme použitou stranou na flanel zvlhčený 96 % etanolem a krouživými pohyby 10 až 20 vteřin leštíme. Okénko pak co n e j r y c h l e j i přeneseme na desku se suchým flanelem, kde je stejným způsobem doleštíme. Došlo-li k hrubšímu mechanickému nebo chemickému poškození povrchu okénka, použijeme v první fázi čistění 50 % etanol. Leštění pak musí být krátké a vyžaduje rovnoměrný tlak na celou plochu okénka. Pro tento účel je třeba používat zvláštní desku a flanel na ní často měnit. Celý postup je obvykle třeba několikrát opakovat.

Okénka se uchovávají ve speciálních exikátorech. K zamezení koroze jejich povrchu vzdušnou vlhkostí je třeba exikátory otevírat na co nejkratší dobu a okénka z nich vyjmát až těsně před použitím. Dotyk prstů zanechává na leštěném povrchu okének těžko odstranitelné otisky. Okénka odládáme vždy jen na papírovou podložku na nosníku kyvety nebo na desku potaženou flanelem.

Tabelativní záznam infračervených a Ramanových spekter

Primární vyhodnocení infračervených a Ramanových vibračních spekter spočívá v určení dvou základních parametrů charakterizujících každý pás ve spektru - jeho vlnočtu a intenzity. Tyto údaje se obvykle shrnují do tabulky, v níž se v případě potřeby uvede i poznámka o tvaru pásu a u Ramanových spekter i údaj o hodnotě depolarizačního faktoru. Teprve po shromáždění těchto údajů se lze na jejich základě pokusit o přiřazení pozorovaných pásů jednotlivým fundamentálním vibracím molekuly.

Intenzity pásů se pro tabelativní záznam obvykle uvádí ve stupnici 1 - 5. Pět intenzitních stupňů bývá v literatuře označováno počátečními písmeny slov velmi slabý, slabý, střední, silný a velmi silný (anglicky vw, w, m, s, vs; německy ss, s, m, st, sst). U Ramanových spekter se často používá jemnější stupnice 1 - 10.

Tvar pásu charakterizovaný kvantitativně jeho šířkovým parametrem (tzv. pološířka) se při kvalitativním vyhodnocení popisuje poznámkou za hodnotou vlnočty. Široké pásy se označují počátečními písmeny slov široký resp. velmi široký (anglicky b, vb; německy b, sb). Dochází-li k překryvu dvou nebo více pásů tak, že vrchol je zřetelně vyznačen pouze u nejintenzivnějšího pásu, označují se méně intenzivní pásy jako ramena hlavního pásu (anglicky Sh, německy Sch). Pro stanovení depolarizačních faktorů Ramanových čar je nutno určit jejich integrální intenzity, t.j. plochu.

Úkol

1. Měření MIR spektra pevného vzorku v nujolu

Změříme spektrum pozadí a potom infračervené spektrum pevného vzorku v nujolové suspenzi (**4000 - 400** cm^{-1}) metodou SOURCE.XPM nebo MIR4.XPM (8 scans). Modulem TABEL odečteme vlnočty pásů ve spektru a editorem PEAK_EDIT z tabulky pásů vzorku odstraníme pásy náležející nujolu a doplníme ji interaktivním odečtením parametrů částečně překrytých pásů.

Protokol

Přiložíme grafické záznamy spekter i editorem upravené tabulky pásů.

D. Využití NIR spektroskopie v kvantitativní analýze

Blízká infračervená (NIR) oblast je vymezena vlnočty 12500 - 4 000 cm^{-1} . Záření z této oblasti není absorbováno křemenem a je proto možno ho použít pro zhotovení kyvet. Pro stanovení obsahu neznámé složky ve studované směsi změříme spektra co největšího počtu kalibračních vzorků. V případě, že každá stanovovaná složka má ve spektru vhodný analytický pás, lze z jeho parametr (výška nebo plocha pásu ve spektru zaznamenaném v absorbanční stupnici) a ze známých koncentrací kalibračních roztok sestrojít kalibrační křivku. Předpokládá se lineární závislost mezi koncentrací a intenzitou, t.j. platnost Lambert - Beerova zákona. Na tomto principu je založena metoda QUANTITATIVE_ANALYSIS_1 vhodná pro kvantitativní analýzu v MIR oblasti. Jestliže se mnoho slabých pásů jednotlivých složek ve spektru překrývá, což je běžné v NIR spektrech, je vhodnější použít pro kvantitativní stanovení metodu PLS (Partial Least Squares) označenou jako QUANTITATIVE_ANALYSIS_2 (nabídka EVALUATE). Metoda využívá informace nesené celým souborem experimentálních bodů ve zvoleném intervalu vlnočtů.

Úkol

1. Stanovení koncentrace ethanolu v neznámém vzorku

Sestrojení kalibrační křivky

Spustíme program OPUS a dialogový box MĚŘENÍ otevřeme kliknutím levého tlačítka myši na ikonu MEAS. K měření použijeme metodu (EXPERIMENT) uloženou v souboru NIR8.XPM, který vybereme po zadání příkazu LOAD. Aktivujeme funkci ALIGN_MODE a vyčkáme až se stabilizuje výkon zdroje. Změříme referenční spektrum (BACKGROUND) a pak postupně (po zadání názvů pro jednotlivá spektra) spektra (SAMPLE) 7 kalibračních roztoků ethanolu (koncentrace 0, 10, 20, 30 40, 50 a 60 %) v křemenné kyvetě s tloušťkou 5 mm.

V nabídce programu OPUS zvolením EVALUATE > QUANTITATIVE_ANALYSIS_2 se otevře dialogové okno, v němž lze sestavit metodu kalibrace pro konkrétní soubor vzorků (SET_UP_METHOD, je-li nějaká metoda aktivní, pak následuje CLEAR_SET_UP). Nejprve v modulu SET/EDIT_CALIBRATION_LIST zadáme názvy spekter kalibračních vzorků (ADD_SPECTRA, jako datový blok zvolíme ikonu s obrázkem spektra). V modulu ADD_COMP. zvolíme počet komponent (1), uvedeme její název (ethanol), použité jednotky pro vyjádření koncentrace (%) a u jednotlivých vzorků zadáme číselně jejich koncentraci. Po opuštění modulu (OK) zvolíme SET_FREQUENCIES a zadáme hranice analyzované oblasti spektra (LEFT_EDGE

6020 cm^{-1} a RIGHT_EDGE 5730 cm^{-1}) obsahující pásy, které přísluší první harmonické vibraci methylových skupin v ethanolu. Aktivací SET_REPORT_OPTION zvolíme parametry PLS metody MAX_RANK = 5, FIRST_RPT = 1, LAST_RPT = 5. V modulu SET_RANKS zadáme vhodnou hodnotu RANK (3). Po volbě PRESS zadáme název, pod nímž se sestavená metoda uloží (FILENAME.Q2) a uložíme ji (STORE). Současně se vytvoří i soubor FILENAME.333, v němž se uloží parametry, s jejichž pomocí je pak možno graficky zobrazit kalibrační křivku. Nakonec spustíme kalibraci (CALIBRATE), jejíž výsledek se uloží do souboru FILENAME.222.

Grafické zobrazení kalibrační křivky

V případě, že pro kalibraci použijeme již existující data, funkcí LOAD aktivujeme soubory ETOH.333 a ETOH.222 obsahující data potřebná pro zobrazení kalibrační křivky a informace o použité metodě kalibrace. V nabídce PLOT/PRINT aplikujeme modul PLOT_REPORT na soubor ETOH.333 (nebo FILENAME.333). Vybereme v levé polovině okna postupně položky NO (SET_X_AXIS) a PREDICTION (SET_Y_AXIS) v odstavci PLS_INVERSION_RANK = 3 a přiřadíme je tak osám x a y. (TRUE jsou hodnoty koncentrací kalibračních roztoků zadané při kalibraci a PREDICTION jsou předpovězené hodnoty koncentrací kalibračních roztoků, které vznikly aplikací metody PLS na spektra kalibračních roztoků postupným vynecháním vždy jednoho spektra a určením koncentrace analyzované složky kalibračního roztoku, jehož spektrum bylo vynecháno z ostatních experimentálních údajů). Obě osy můžeme libovolně popsat. Po zobrazení grafu (OK) zvolením FRAME a FITTING_DATA_TO_A_STRAIGHT_LINE proložíme kalibračními body přímkou. Graf pak vytiskneme příkazem PLOT (ikona vpravo nahoře). Na druhou stranu listu s grafem pak volbou PRINT v modulu PLOT/PRINT vytiskneme údaje o kalibraci ze souboru ETOH.222 (nebo FILENAME.222)

Stanovení obsahu ethanolu v neznámém vzorku

K měření neznámých vzorků použijeme rovněž metodu NIR8.XPM. Zvolíme vždy jméno souboru (FILENAME) a změříme spektrum. Po volbě EVALUATE>QUANTITATIVE_ANALYSIS_2 ověříme, zda je aktivní metoda ETOH.Q2 (nebo FILENAME.Q2). V případě, že nikoliv, aktivujeme ji příkazem LOAD. Z názvů spekter všech neznámých vzorků vytvoříme seznam příkazem MAKE_FILE_LIST (ADD_SPECTRA, zvolit blok s obrázkem spektra). Po ukončení tvorby seznamu (OK) spustíme výpočet volbou ANALYSE. Vytvoří se soubor FILENAME.444 obsahující výsledky právě provedené analýzy, který mimo informace o stanovených koncentracích (PREDICTION) a statistického vyhodnocení upozorňuje na případnou odlehlost výsledku (OUTLIER). Soubor vytiskneme příkazem PRINT v modulu PLOT/PRINT.

V případě, že analyzujeme pouze jediný vzorek, nevytváříme seznam, ale kliknutím levého tlačítka myši na ikonu příslušného spektra na liště soubor zvolíme jako SELECTED_FILE a provedeme výpočet (ANALYSE). Výsledek je pak součástí souboru dat daného vzorku a na liště se objeví ikona s označením QUANT. Vytiskneme ho stejně jako v předchozím případě.

Protokol

Do protokolu uvedeme hodnotu koncentrace ethanolu v neznámém vzorku a přiložíme grafické zobrazení kalibrační křivky.