

# *Infračervená spektrometrie*

## *Obsah kapitoly*

- Teorie
- Instrumentace
- Pracovní techniky IR spektrometrie
- MIR
  - Identifikace látek
  - Kvantitativní analýza
  - Aplikace v analýze potravin
- NIR
  - Vlastnosti metody
  - Aplikace v analýze potravin

## *Infračervená spektrometrie*

### *(Infrared spectrometry)*

- měření infračerveného záření absorbovaného nebo odraženého vzorkem
- absorpce IR záření souvisí se změnou vibračního nebo rotačního stavu molekul
- aplikační možnosti:
  - analýza plynů, kapalin, tuhých vzorků
  - identifikace látek
  - kvantitativní analýza
- informace ze spektra:
  - funkční skupiny molekul, konstituce molekul
  - interakce molekul

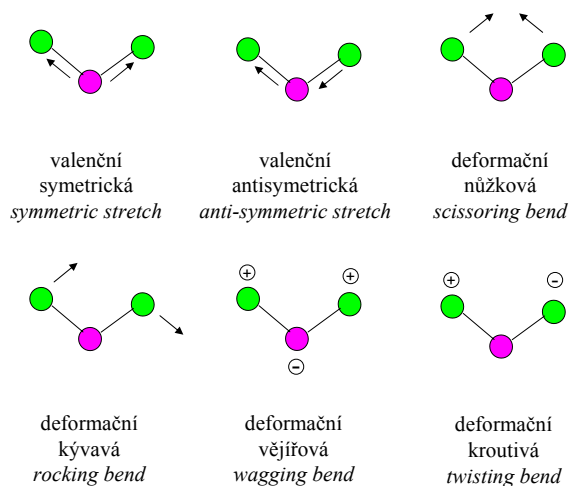
## Vibrační přechody

- **normální (fundamentální):**  
změna vibračního kvantového čísla  $\Delta v = 1$   
vysoká pravděpodobnost  $\rightarrow$  vysoké hodnoty  $\varepsilon$
- **vyšší harmonické:** změna  $\Delta v = 2; 3 \dots$   
menší pravděpodobnost  $\rightarrow$  menší hodnoty  $\varepsilon$
- **kombinační:** současná změna dvou vibračních čísel  
u polyatomové molekuly

## Typy vibrací

- **valenční (*stretching*):** mění se délka vazby
  - symetrické
  - antisymetrické
- **deformační (*bending*):** mění se valenční úhel
  - rovinné (*in-plane*)
  - mimorovinné (*out-of-plane*)

### Příklad: vibrace tříatomové lomené molekuly



### Které látky poskytují signál v IR spektru?

#### ANO

- látky, jejichž molekuly obsahují (alespoň slabě) polární vazby
- = molekuly složené z různých atomů
- = organické sloučeniny a anorganické sloučeniny (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, HCl, soli...)

#### NE

- prvky v molekulovém nebo krystalickém stavu
- = např. Ar, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>, S<sub>8</sub>, křemík, grafit, diamant...

Signál molekuly v IR spektrometrii je úměrný druhé mocnině změny dipólového momentu molekuly během vibračního pohybu molekuly.

## Spektrální oblasti a rozdělení metod

	$\lambda$ ( $\mu\text{m}$ )	$\tilde{\nu}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>Blízká infračervená oblast</b> ( <i>near infrared</i> , NIR)	0,8 – 2,5	12 500 – 4 000
<b>Střední infračervená oblast</b> ( <i>mid infrared</i> , MIR)	2,5 – 25	4 000 – 400
<b>Vzdálená infračervená oblast</b> ( <i>far infrared</i> , FIR)	25 – 1 000	400 – 10

MIR – normální vibrační přechody

NIR – vyšší harmonické vibrační přechody (*overtones*)

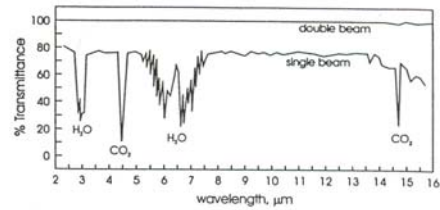
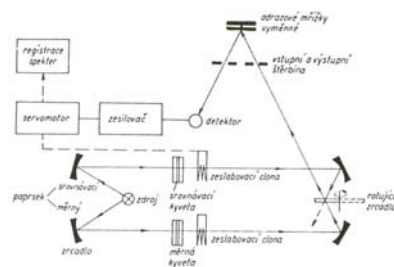
FIR – mřížové frekvence a normální vibrace slabých vazeb  
a vazeb těžkých atomů

## *Instrumentace v IR spektrometrii*

### **Základní součásti přístrojů    Konstrukce**

- zdroj
- měrná (a srovnávací) cela (kyveta)
- zařízení pro selekci vlnové délky
- detektor záření
- jednoduché přístroje s filtrem
- klasické přístroje s disperzním systémem (monochromátorem)
- přístroje na principu interferometru (FTIR)

## Dvoupaprskové vs. jednopaprskové přístroje



## Zdroj IR záření

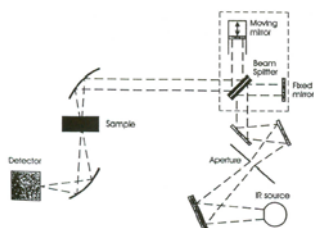
- pro NIR: **wolframová lampa**
- pro MIR:
  - **elektricky ohřivaná** (1100 °C) **tyč z SiC** – poskytuje maximální intenzitu při  $\lambda = 2 \mu\text{m}$ ; při nižší teplotě posun maxima k delším  $\lambda$  (600 °C  $\rightarrow \lambda_{\text{max}} = 3,5 \mu\text{m}$ )
  - **lasery CO<sub>2</sub>, PbS** –  $\lambda_{\text{max}} = 9\text{-}11 \mu\text{m}$
- pro FIR: **vysokotlaká rtuťová výbojka** (emituje také UV-VIS záření, odděluje se filtrem)

## Detektory IR záření

- pyroelektrické TGS (triglycine sulphate) detektory  
– pracují při normální teplotě
- fotokonduktivní detektory MCT (HgTe/CdTe)  
– pracují při teplotě kapalného dusíku (-196 °C),  
mají vysokou citlivost a rychlou odezvu, použití v MIR, FIR
- Ge bolometry (pro FIR) – pracují při teplotě kapalného helia (-271,7 °C)

## Spektrometry s Fourierovou transformací

– založeny na principu Michelsonova interferometru.



Paprsek vycházející ze zdroje se rozdělí v děliči na dvě poloviny; první se odráží k fixnímu zrcadlu, druhý paprsek jde na pohyblivé zrcadlo; odražené paprsky se setkávají v místě děliče a dochází k interferenci.

Pro monochromatické záření nastává úplné vyrušení paprsků (destruktivní interference), platí-li pro optickou retardaci  $\delta$  (= dvojnásobek rozdílu vzdáleností zrcadel od děliče) vztah  $\delta = (n+0,5) \lambda$ .

Konstruktivní interference nastává, je-li  $\delta = \lambda; 2 \lambda; 3 \lambda; \dots n \lambda$

Záznam získaný při průchodu polychromatického záření zdroje interferometrem a vzorkem (interferogram) se převádí na IR spektrum Fourierovou transformací.

## **Výhody FTIR**

- není nutná disperzní optika  
→ do vzorku vstupuje více energie
- rychlý záznam spektra ( $< 1$  s)
- vysoké rozlišení (až  $0,01 \text{ cm}^{-1}$ )

## *Pracovní technika IR spektrometrie*

### **Typy vzorků a jejich příprava k analýze**

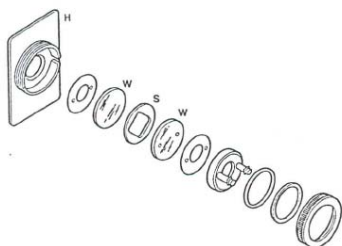
Kyvety pro měření vzorků mají okénka vyrobená z:

- NaCl, KBr,  $\text{CaF}_2$ , ZnSe, AgCl, TlBr/TlI pro MIR
- CsBr, polyethylenu pro FIR
- skla, křemenného skla pro NIR

### **Plynné vzorky**

kyvety se plní podtlakově, délka optické dráhy kyvety je 10 cm-80 m (vnější rozměr max. 1 m)

## Kapalné vzorky



Rozebíratelná kyveta  
pro kapalné vzorky

Vodné roztoky – nutno použít okénka z  $\text{CaF}_2$  nebo  $\text{ZnSe}$ ,  
měření je možné jen v intervalu  $1400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$   
(např. cukry v ovocných šťávách – měření ve filmu  $10\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$ )

## Kapalné vzorky

Rozpouštědla vzorků pro MIR

Rozpouštědlo	Možnost měření v intervalu $\tilde{\nu}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\text{CCl}_4$	4000-1600, 1500-850
$\text{CHCl}_3$	4000-1250 <sup>a</sup> , 1150-850
$\text{CS}_2$	4000-1650 <sup>b</sup> , 1400-500

*a* – kromě intenzivních pásů  $3050$  a  $940\text{ cm}^{-1}$

*b* – kromě intenzivních pásů  $2350$  a  $2200\text{ cm}^{-1}$

Čisté kapalné vzorky (např. oleje) a gely lze měřit v tenkém filmu ( $1\text{ }\mu\text{m}$ ) transmisí technikou nebo technikou ATR.



## Tuhé vzorky

- **příprava KBr tablet:**  
1-15 mg vzorku + 200 mg KBr – lisování za vakua
- **příprava disperzí v Nujolu:**  
práškový vzorek se rozptýlí v parafinovém oleji  
(nevýhoda: nelze analyticky využít absorpční pásy odpovídající vibračním C-H a C-C vazeb)

## Způsoby měření v IR spektrometrii

### Transmisní metody

měření transmittance, absorbance

$$T = I / I_0 = 10^{-\epsilon bc}$$

$$I_0 / I = 10^{\epsilon bc}$$

$$A_\lambda = \log_{10} (1/T) = -\log_{10} T = \log_{10} (I_0/I) = \epsilon_\lambda \cdot b \cdot c$$

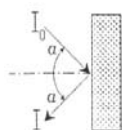
## Reflexní metody

měření záření odraženého vzorkem

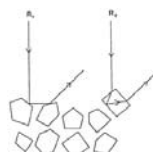
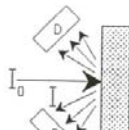
reflektance  $R = I / I_0$

optická hustota  $OD = \log_{10} (1/R) = -\log_{10} R$

Spekulární  
reflexe:

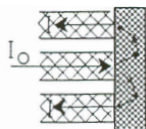


Difuzní  
reflexe



běžná metoda  
v NIR pro tuhé  
práškové vzorky

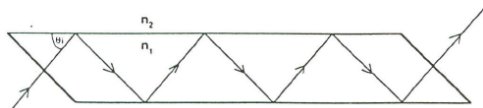
Zvláštní uspořádání:



měření tzv. interaktance – použití vláknové optiky

## Technika ATR

*attenuated total reflectance* (= zeslabený úplný odraz)



- používá se k analýze materiálů, z nichž se obtížně připravují transparentní tenké vrstvy (pastovité vzorky, čokoláda...); vzorek se nanáší v kompaktní vrstvě na povrch měrného hranolu
- materiál hranolu musí mít vysoký index lomu  $n_2$  (vyšší než index lomu vzorku  $n_1$ )
- paprsek vstupuje do hranolu a odráží se od fázového rozhraní; přitom dochází k průniku do malé vrstvy vzorku ( $0,25-4 \mu\text{m}$ ); jestliže paprsek dopadá na rozhraní pod úhlem  $\theta >$  kritický úhel  $\theta_c = \arcsin (n_1/n_2)$ , paprsek je hranolem zcela zachycen (tj. šíří se hranolem); po jednom nebo vícenásobném odrazu vystupuje z hranolu a dopadá na detektor
- penetrační hloubka je závislá na vlnové délce:  
$$d_p = \lambda / 2\pi [\sin^2\theta - (n_1/n_2)^2]^{0,5} \quad [\mu\text{m}]$$

### Výhody ATR

- snadná příprava vzorku k analýze (vhodné pro tekuté a polohuhé vzorky)
- vzorek nemusí být transparentní

### Požadavky na vzorek a hranol

- dobrá přilnavost vzorku k materiálu hranolu
- mechanická pevnost materiálu hranolu (při nalisování vzorku), inertnost vůči vzorku
- možnost odstranění zbytků vzorku z hranolu rozpouštědlem

Materiál hranolu	Vlnočet propouštěného záření	$n$ při 1000 $\text{cm}^{-1}$
safír	50 000 – 1 780 $\text{cm}^{-1}$	1,74
NaCl	40 000 – 590	1,49
ZnSe	20 000 – 454	2,4
Ge	5 500 – 600	4,0
Si	8 300 – 6 600	3,4
TlBr/TlI	20 000 – 250	2,37

## *Spektrometrie ve střední infračervené oblasti (MIR)*

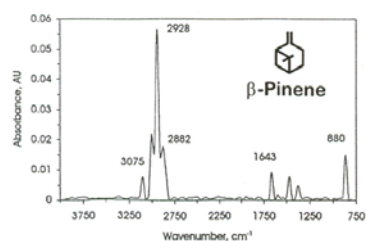
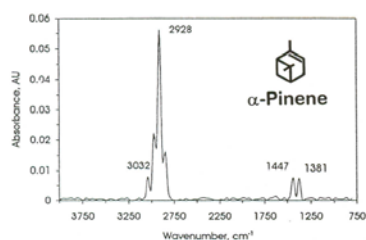
- spektra obsahují převážně signály odpovídající normálním (fundamentálním) vibracím
- počet vibrací molekuly složené z  $N$  atomů
  - $3N-6$  (nelineární molekuly)
  - $3N-5$  (lineární molekuly)
- absorpční pásy mohou být zesíleny u degenerovaných vibrací (vibrace odpovídající vícenásobnému výskytu stejné funkční skupiny, která je v molekule symetricky rozmístěna)

## Identifikace organických látek MIR spektrometrií

MIR oblast se dělí na

- **oblast charakteristických vibrací funkčních skupin**  
2,5-8 nm ( $4000-1250\text{ cm}^{-1}$ )  
obsahuje charakteristické pásy jednotlivých vazeb, které odpovídají převážně valenčním vibracím
- **oblast otisku prstu (*fingerprint region*)**  
8-25 nm ( $1250-400\text{ cm}^{-1}$ )  
obsahuje pásy odpovídající převážně deformačním vibracím  
charakterizuje každou molekulu jako celek

### Příklad spekter izomerních sloučenin



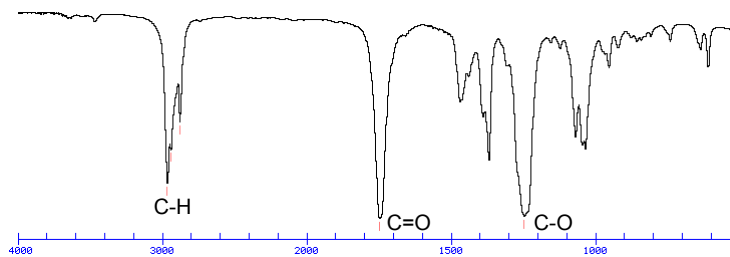
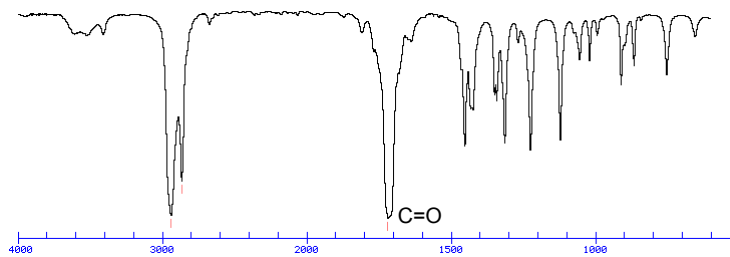
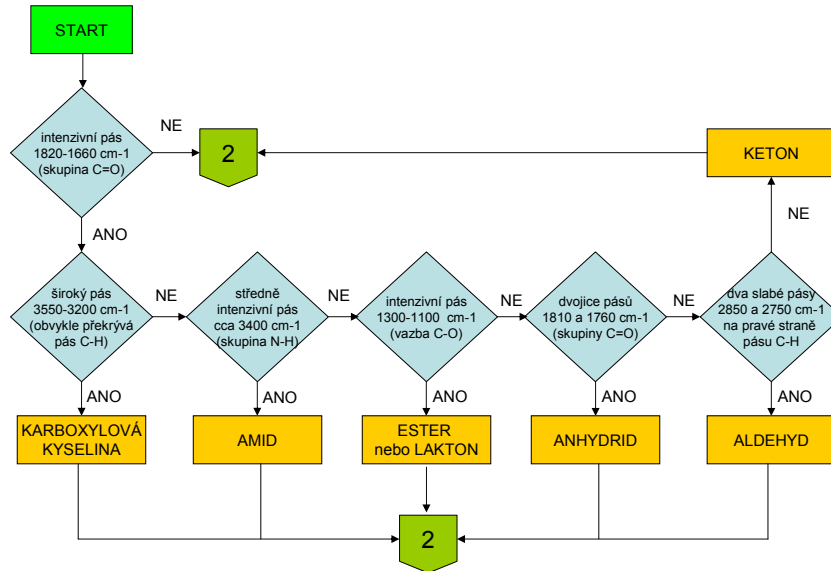
## Postup při identifikaci

- určení funkčních skupin na základě charakteristických vibrací
- konfrontace s výsledky dalších zkoušek (stanovení empirického vzorce sloučeniny elementární analýzou, stanovení molekulové hmotnosti) a odhad skeletu molekuly
- navržení možných struktur
- identifikace struktury porovnáním změřeného spektra s atlasem nebo databází spekter, případně identifikace dalšími metodami (NMR, MS)

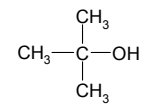
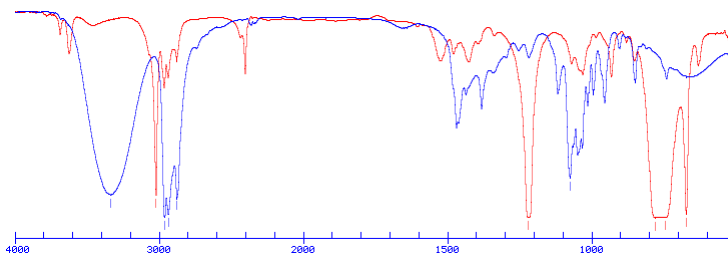
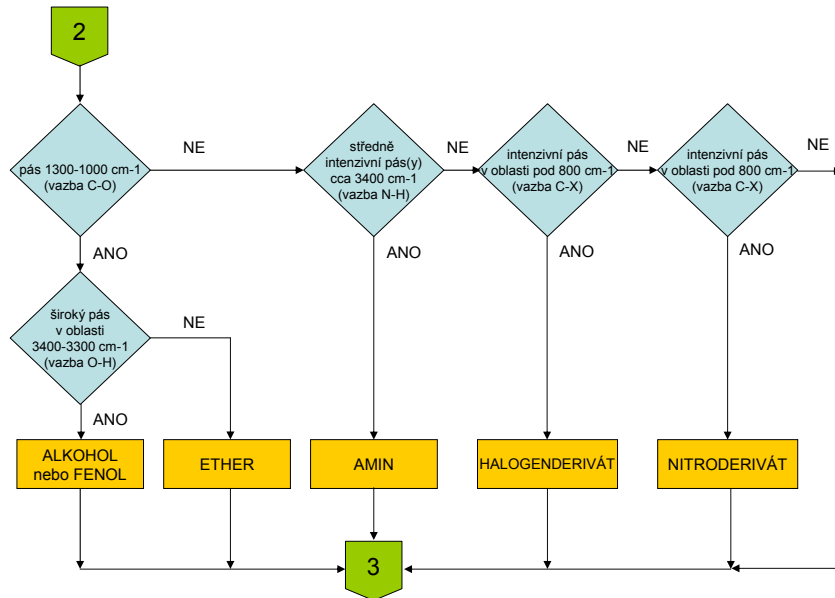
## Charakteristické vlnočty vazeb – trendy

hybridizace uhlíku: vazba mezi uhlíky		vazba uhlík-vodík		hmotnost atomu X ve vazbě C–X:	
C–C	1200 cm <sup>-1</sup>	sp <sup>3</sup> C–H	2900 cm <sup>-1</sup>	C–H	2900 cm <sup>-1</sup>
C=C	1650	sp <sup>2</sup> C–H	3100	C–C	1200
C≡C	2150	sp C–H	3300	C–O	1100
				C–Cl	750
				C–Br	600
				C–I	500

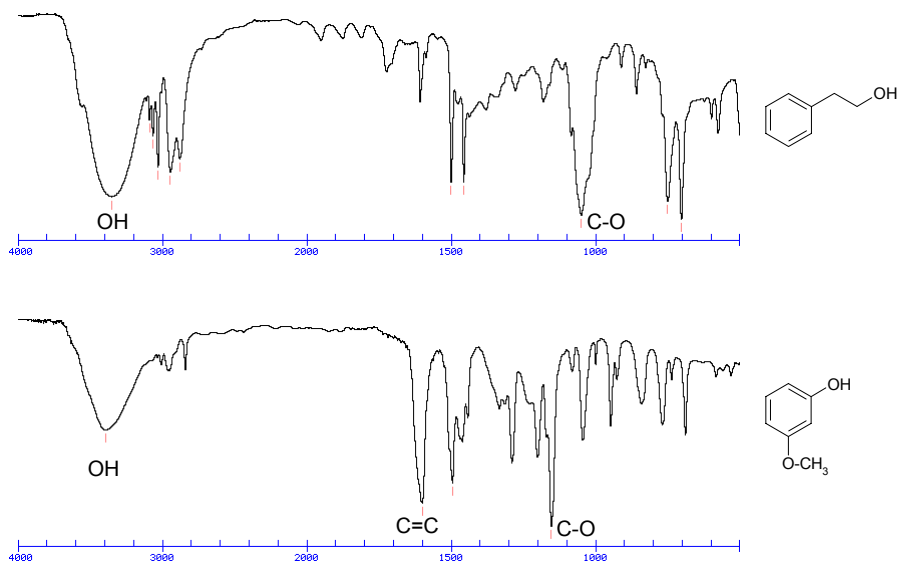
Základní orientace ve spektru: určení funkčních skupin  
1. karbonylová skupina



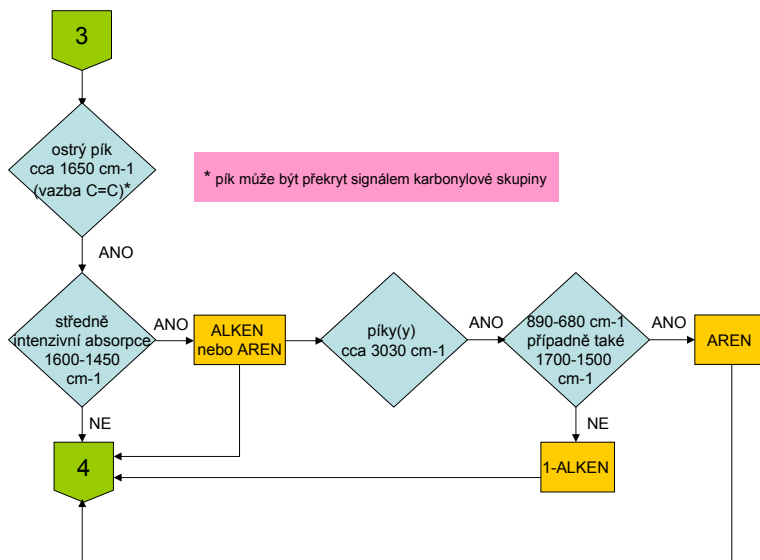
Základní orientace ve spektru: určení funkčních skupin  
2. další funkční skupiny



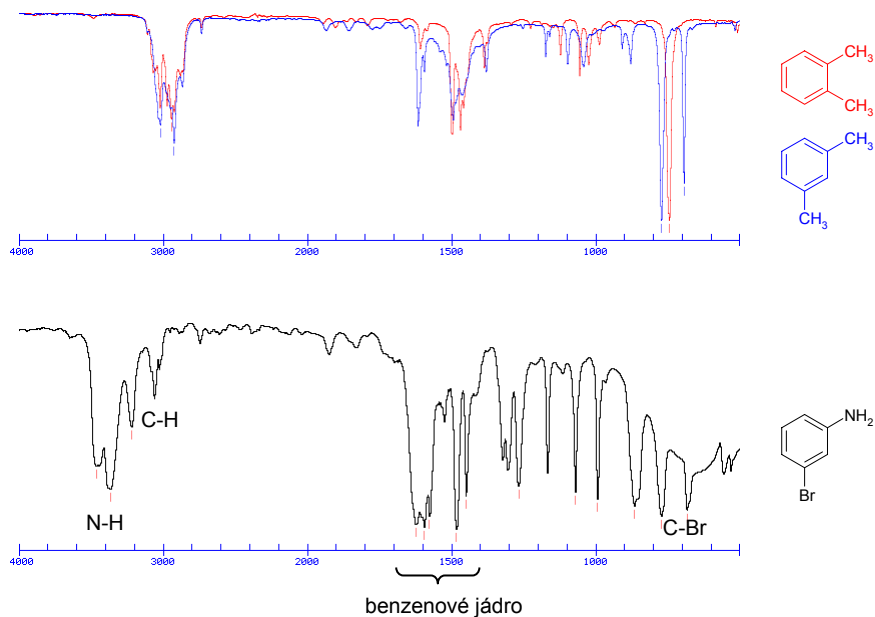
čistý terc-butanol  
zředěný roztok terc-butanolu v  $\text{CHCl}_3$



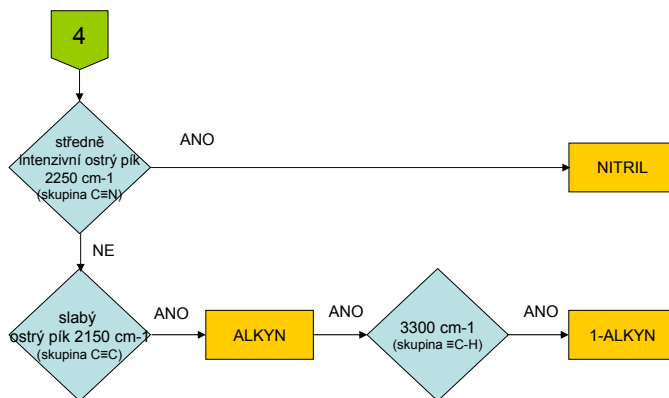
Základní orientace ve spektru: určení funkčních skupin  
3. dvojná vazba a aromatické jádro







#### Základní orientace ve spektru: určení funkčních skupin 4. trojná vazba



Pokud ve spektru nejsou žádné výše uvedené signály, jde pravděpodobně o nasycený uhlovdík. Spektra jsou poměrně jednoduchá a obsahují :

- silný pás cca 2900 cm<sup>-1</sup> (C-H valenční),
- středně silný ostrý pík 1470 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub> deformační),
- slabší ostrý pík cca 1400±50 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>3</sub> deformační),
- případně pík 720 cm<sup>-1</sup> (signál delších řetězců alkanů)

## Kvantitativní analýza metodou MIR

Měřené veličiny:

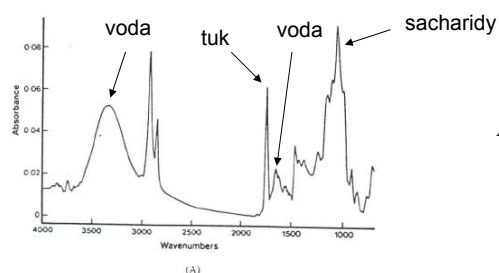
- absorbance nebo optická hustota
- integrální intenzita (plocha vymezená absorpční křivkou v určitém intervalu vlnočtu)  
odečítání signálu metodou základní linie nebo diferenční metodou

### Aplikace v analýze potravin

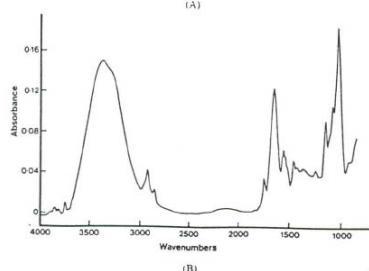
- 1. Stanovení trans-nenasycených mastných kyselin v tukách**  
vlnočty 960-970  $\text{cm}^{-1}$  (*cis* vazby absorbují při 700±50  $\text{cm}^{-1}$ ,  
koncové vazby při cca 900  $\text{cm}^{-1}$ )  
TAG se konvertují na methylestery MK a rozpustí v  $\text{CS}_2$   
ke kalibraci se používá methylester kys. elaidové

### Aplikace v analýze potravin

- 2. Stanovení základních složek potravin technikou ATR**



A: spektrum čokolády

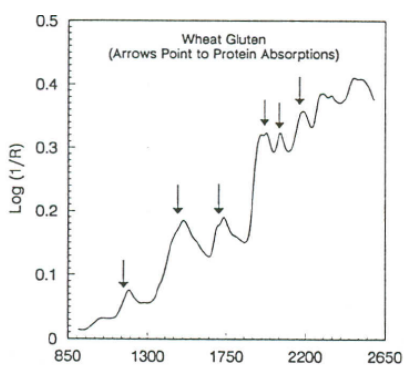


B: spektrum pečiva

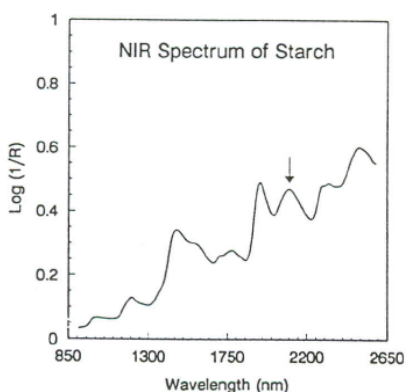
## Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (NIR)

- spektra obsahují málo intenzivní signály
  - kombinační přechody
  - vyšší harmonické přechody (*overtones*):  
změna vibračního kvantového čísla  $\Delta v$  je 2; 3; 4...  
jestliže fundamentální přechod nastává při vlnové délce  $\lambda_0$ ,  
první harmonická nastane při  $\lambda_1 \approx \lambda_0/2$ , druhá při  $\lambda_2 \approx \lambda_0/3$ ,  
třetí při  $\lambda_3 \approx \lambda_0/4$  ..., absorptivita se postupně snižuje
- NIR spektra se měří
  - transmisní technikou
  - difuzně reflexní technikou
  - technikou ATR

### NIR spektra některých potravinářských vzorků

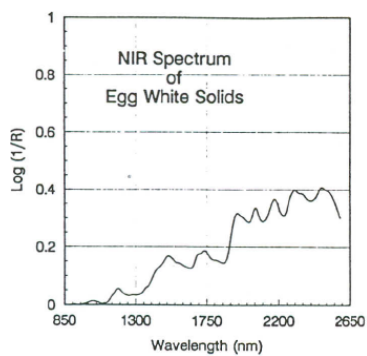


NIR spektrum pšeničného lepku  
signály bílkovin:  
1190, 1488, 1735, 1974, 2054, 2162 nm

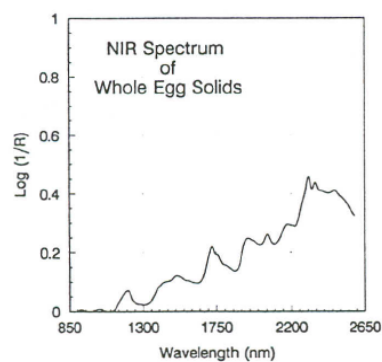


NIR spektrum škrobu  
hlavní signál 2100 nm

## NIR spektra některých potravinářských vzorků

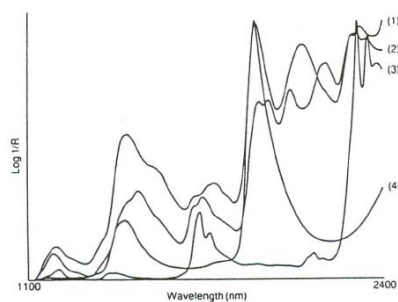


NIR spektrum  
sušeného vaječného bílku  
signály bílkovin 2054 a 2162 nm

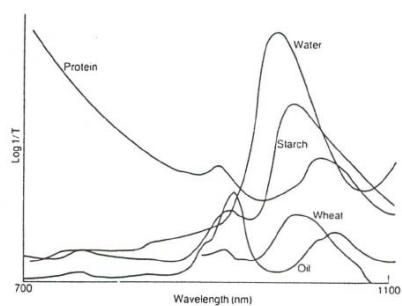


NIR spektrum  
sušené vaječné hmoty  
pík bílkovin 2162 nm deformován  
píky lipidů 1200, 1750 a 2350 nm

## Reflexní a transmisní NIR spektra



A



B

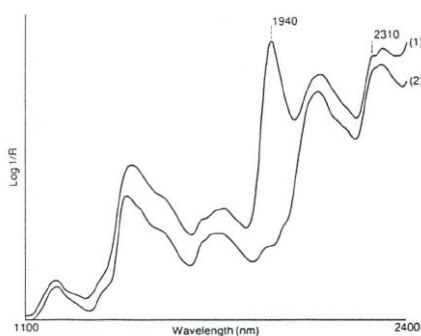
A: NIR reflexní spektrum složek pšenice: škrob (1), bílkovina (2), tuk (3), voda (4)

B: NIR transmisní spektrum pšenice a jejích složek

Poznámka: záření 800-1100 nm prochází 1-2 cm vrstvou vzorku (obilí, maso...)

## Aplikace NIR v analýze potravin

### Stanovení vody

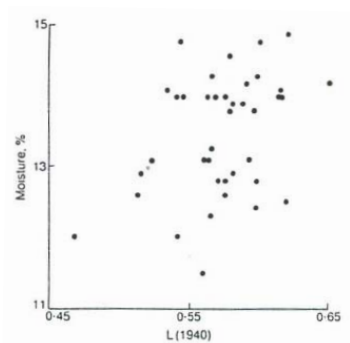


NIR spektra mouky (1)  
a mouky po vysušení (2)

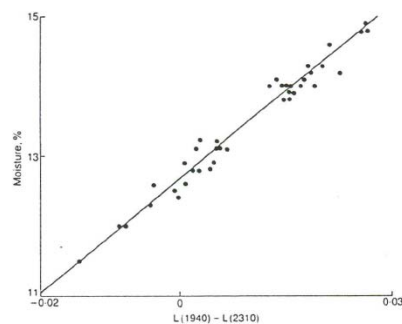
- absorpční pásy vody v NIR: 1940, 1450, 1190, 970 a 760 nm
- poloha maxim se mírně posouvá v důsledku interakcí molekul vody se složkami potravin
- 1450, 970, 760 nm jsou první, druhá a třetí harmonická frekvence
- 1940 a 1190 jsou kombinační přechody

### Možnosti stanovení vody

- měření absorbance extraktu v rozpouštědle, které neobsahuje skupiny OH (N,N-dimethylformamid) při 1940 nm (lineární rozsah 0-2,5 %) nebo při 1450 nm (lineární rozsah 0-4 %); aplikace např. pro analýzu sušené zeleniny a koření
- azeotropická destilace vody ze vzorku (např. kávy) s 1,4-dioxanem a měření absorbance destilátu při 1910 nm
- měření absorbance při 970 nm (analýza piva, masa, obilí)
- příprava suspenze vzorku (mouka, rozemletá semena...) v  $\text{CCl}_4$  a měření OD při 1940 a 2080 nm; obsah vody je úměrný rozdílu hodnot OD; nutná kalibrace nezávislou metodou
- měření reflektance tuhých vzorků (mouka, obilí, slad, suš. mléko, olejnatá semena, chmel...) při 1940 nm a další referenční hodnotě (2310, 1850, 2000 nm) – nutná kalibrace



Závislost obsahu vlhkosti v mouce a  $OD_{1940} = \log 1/R_{1940}$  (data pro 40 vzorků)



Závislost obsahu vlhkosti v mouce a rozdílu  $OD_{1940} - OD_{2310}$

Analytická funkce:

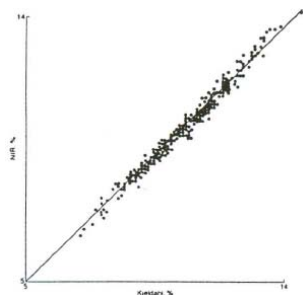
$$\text{Obsah vody} = 12,69 + 81,49 \cdot (\log 1/R_{1940} - \log 1/R_{2310}) \text{ [%]}$$

## Stanovení bílkovin

při analýze obilovin je vhodné vycházet z reflektance při 2180 nm doplněné několika referenčními hodnotami

Analytická funkce pro pšeničnou mouku:

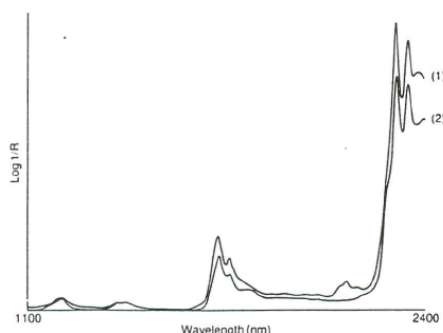
$$\text{Obsah bílkovin} = 12,68 + 493,7 \cdot \log 1/R_{2180} - 323,1 \cdot \log 1/R_{2100} - 234,4 \cdot \log 1/R_{1680} \text{ [%]}$$



Správnost stanovení bílkovin:  
srovnání výsledků NIR analýzy (y)  
s výsledky Kjeldahlovy metody (x)

## Stanovení tuku

Hlavní absorpční pásy tuků v NIR patří vibracím skupin  $\text{CH}_2$  řetězců mastných kyselin. Jsou to první harmonické 1734 a 1765 nm, druhá harmonická 1200 a kombinační vibrační pásy 2310 a 2345 nm.



NIR spektra  
podzemnicového oleje (1)  
a parafinového oleje (2)

## Možnosti stanovení tuku metodou NIR

- měření reflektance vzorku
  - např. analýza masa měřením signálu při 1725 nm a referenční hodnoty při 1650 nm
  - obdobné postupy byly popsány pro obiloviny, kakao, sýry, sušené mléko, olejiny...
- transmisní měření v oblasti 800-1100 nm
  - ve spektru druhé derivace absorbance je poměr hodnot při 931 a 946 nm nebo 931 a 1062 nm úměrný obsahu tuku
  - aplikováno pro analýzu masa

## Stanovení nenasycenosti tuku

NIR spektra tuků obsahují pásy 1180, 2143 a 2190 nm, které odpovídají výskytu *cis*  $-\text{CH}=\text{CH}-$  vazby; měřením  $\log 1/R_{2143}$  lze po kalibraci nahradit stanovení jodového čísla

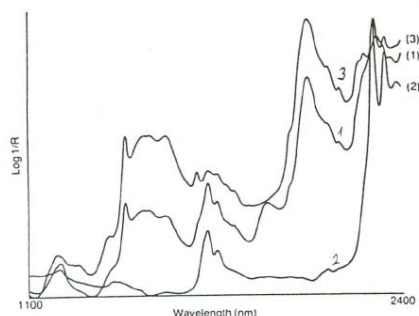
## Stanovení sacharidů

NIR spektra jednotlivých sacharidů jsou navzájem velmi podobná a obsahují mnoho absorpčních maxim – viz tabulka

glukosa	sacharosa	škrob	celulosa	glukosa	sacharosa	škrob	celulosa
1198 nm	1196 nm	1202 nm	1207 nm	-	2008	-	-
1269	1276	1274	1278	2073	2073	-	-
1371	1368	1360	1365	2103	-	2100	2088
1440	1436	1432	1431	2154	2150	-	-
1493	1489	1492	1487	2200	2191	2190	2200
1589	1586	1580	1584	2275	2255	2278	2273
1705	1688	1702	1707	-	2318	2318	-
-	1729	-	-	2330	-	-	2336
1750	1762	-	-	-	-	-	2347
1789	-	1773	1772	2364	2368	2360	-
1834	1823	1824	1824	-	-	-	-

## Některé aplikace NIR v analýze sacharidů

- stanovení Glc, Fru, Sach v práškových směsích
- stanovení sacharosy ve víně (0,8-9 %), stanovení cukrů v ovocných šťávách – měření transmittance v 1-2 mm vrstvě
- stanovení sacharosy v čokoládě a cukrovinkách

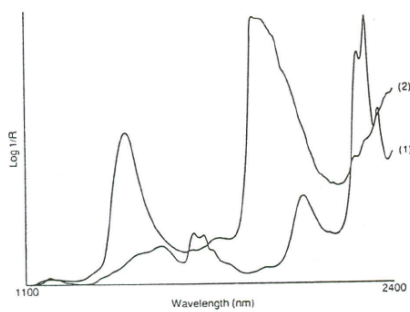


NIR spektra sacharosy (1), tuku (2) a čokolády (3)

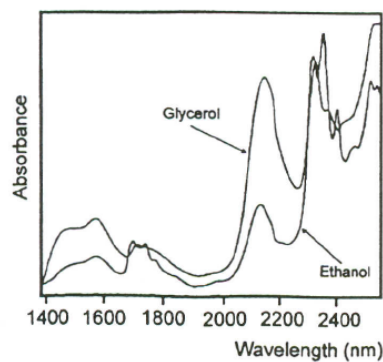


## Stanovení alkoholů

- přímé stanovení ethanolu ve víně měřením absorbance v 1 mm kyvetě (rozsah 11-17 % v/v EtOH)
- stanovení glycerolu



NIR spektra ethanolu (1) a vína (2)



NIR spektra čistého glycerolu a ethanolu