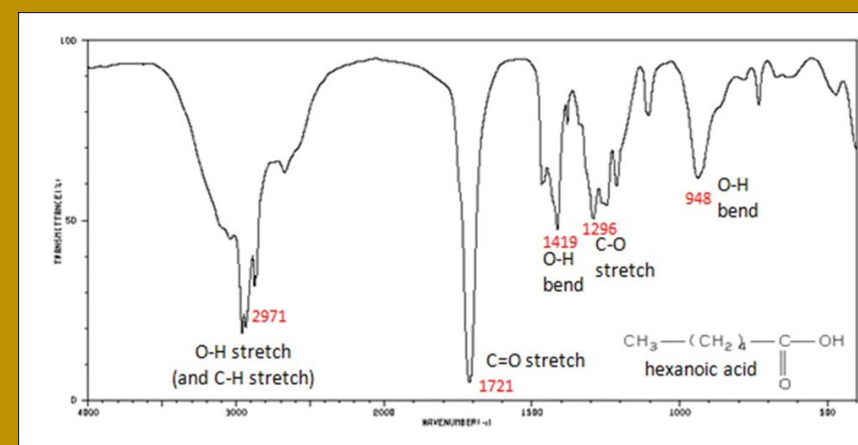
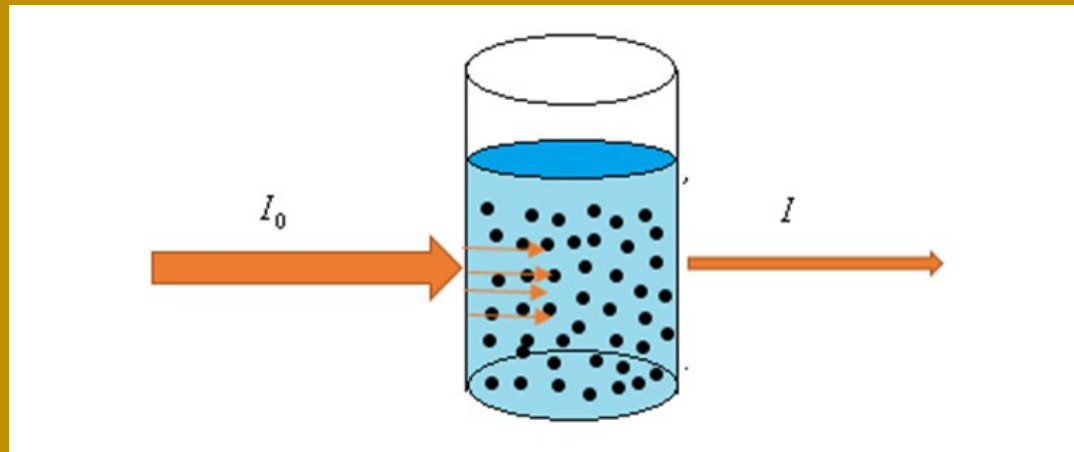
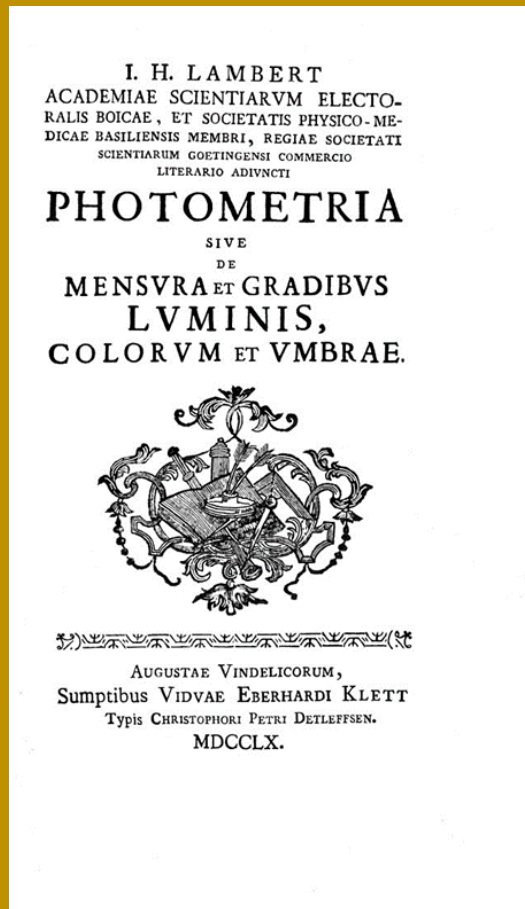


Repetitorium chemie V.

Instrumentální metody zjišťování chemické struktury látek (2024)



Čemu se věnoval pan Armin Delong? A copak měli spolu za tajemství pan Lambert s panem Beerem? A ty liščí ocasy!

Instrumentální techniky analýzy chemických látek

Spektrofotometrie v UV a VIS

Atomová absorpční a emisní spektrometrie

ICP-MS

Infračervená spektrofotometrie

PIXE

Nukleární magnetická rezonance

Hmotnostní spektrometrie

Elektronová mikroskopie spojená s analýzou EDAX

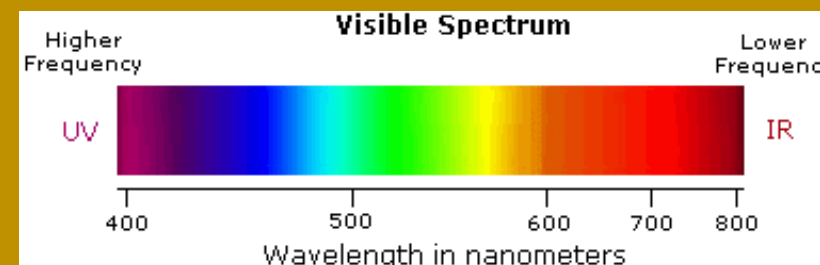
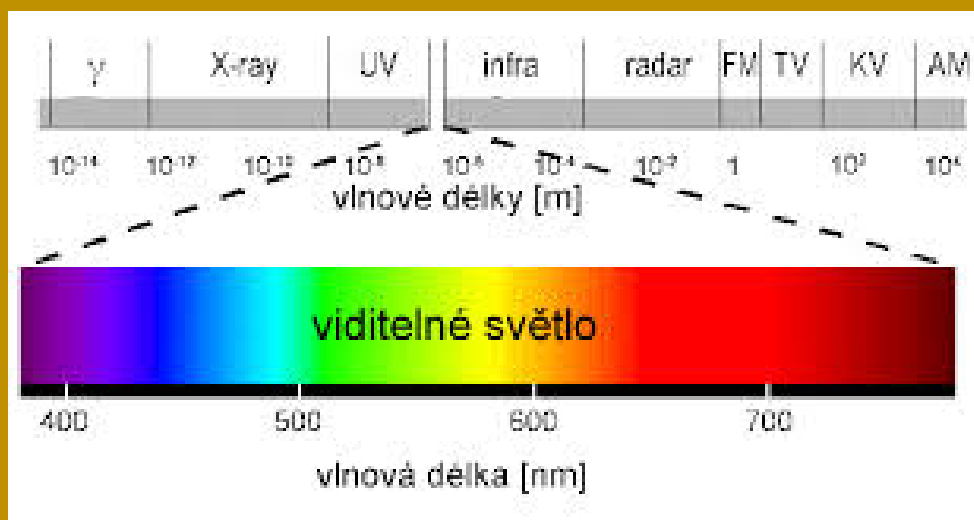
Základní elektrochemické techniky

Chromatografie

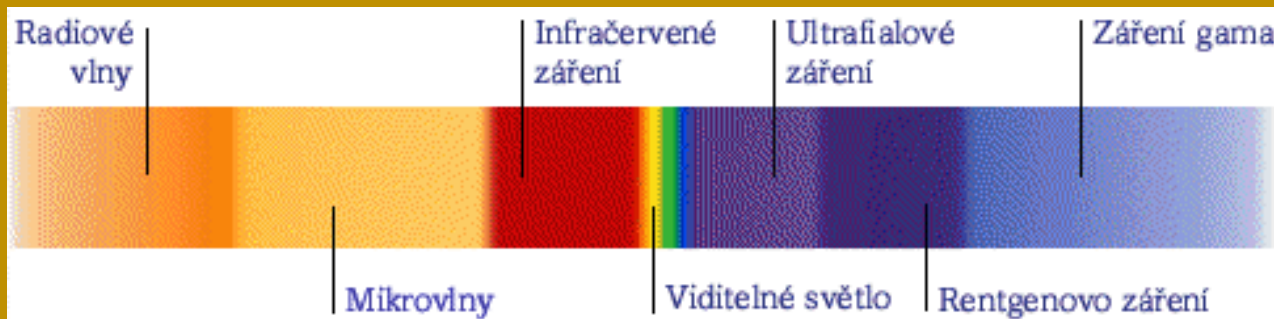


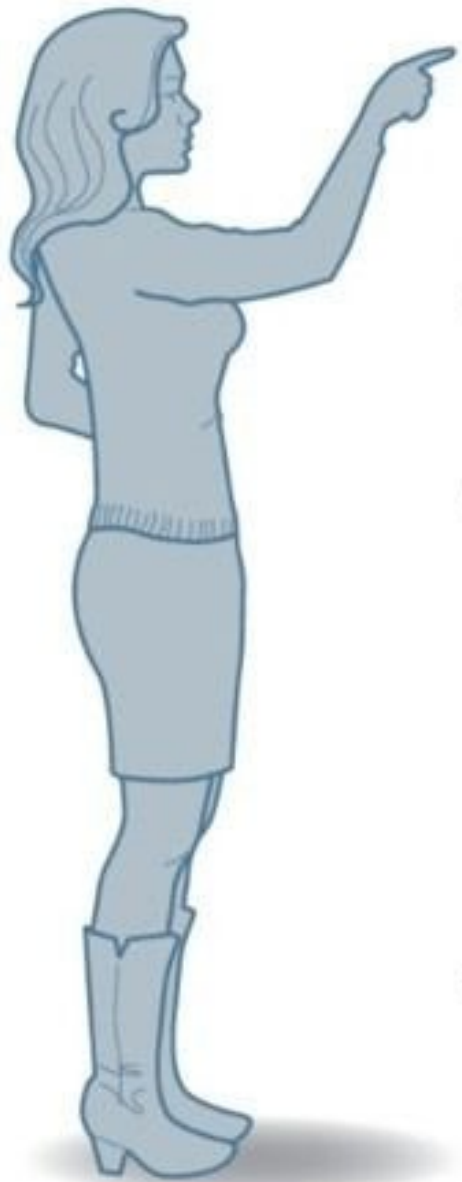
Spektrofotometrické metody: absorpce záření



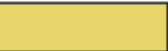





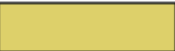









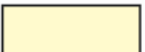




















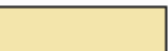


Při analýze anorganických i organických látek se velmi často používají metody, založené na absorpci záření různých vlnových délek.



200 – 400 nm UV oblast
400 – 800 nm viditelná (VIS)





V · T · E [hide]									
Amber	Apricot	Arylide yellow	Aureolin	Beige	Buff	Champagne	Chartreuse	Citron	Citrine
									
		Dark goldenrod	Ecru	Flax	Gamboge	Gold	Gold (metallic)	Goldenrod	Harvest gold
Cosmic latte	Cream								
				Lemon chiffon	Lemon-lime	Light yellow	Lion	Maize	Mikado yellow
Ivory	Jasmine	Jonquil	Khaki						
									School bus yellow
Mindaro	Mustard	Naples yellow	Navajo white	Old gold	Papaya whip	Peach-yellow	Pear	Saffron	
									
Selective yellow	Stil de grain yellow	Straw	Sunglow	Sunset	Vanilla	Wheat	Yellow		
									

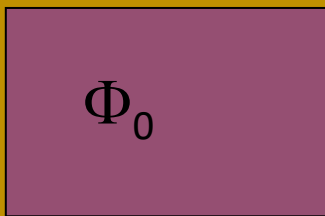
A typical sample is shown for each name; a range of color-variations is commonly associated with each color-name.

60 odstínů žluté

Spektrofotometrické metody: absorpce záření

Obecný princip: světlo určité vlnové délky je pohlcováno analyzovanou látkou. Stupeň absorpce (pohlcení) je možno zjistit měřením toku záření Φ :

Zdroj

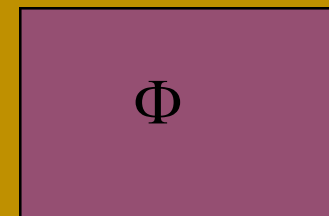


\Rightarrow

Absorpční prostředí

\Rightarrow

Detektor



délka absorpčního prostředí (cm)

koncentrace látky c (mol/l)

vlnová délka záření λ (nm)

Spektrofotometrické metody: absorpce záření

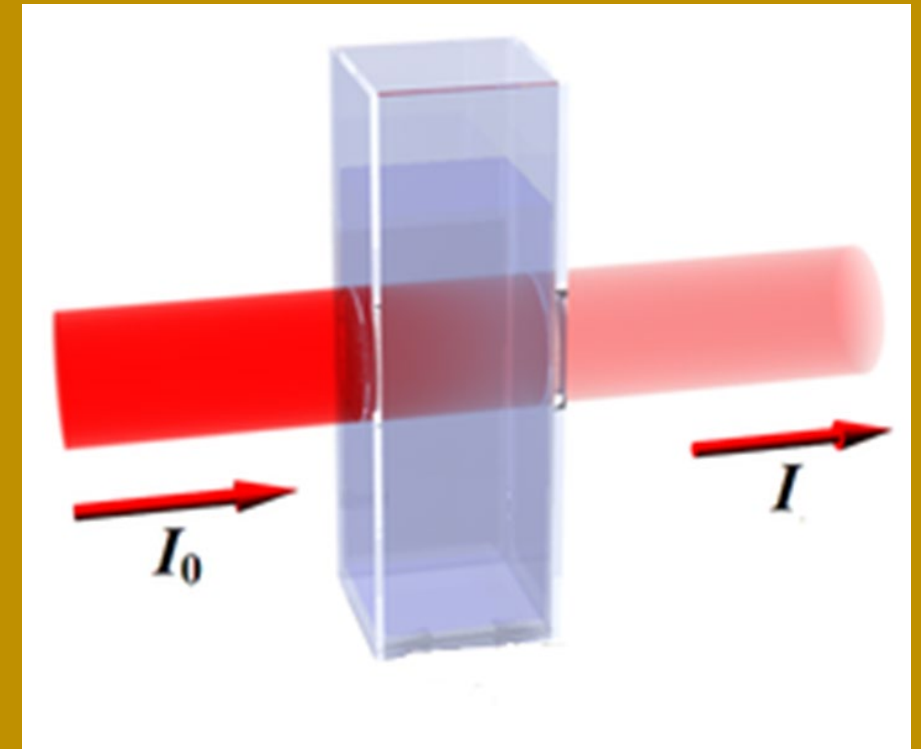
Poměr mezi Φ a Φ_0 je možné změřit. Veličina

$$\Phi/\Phi_0 = T$$

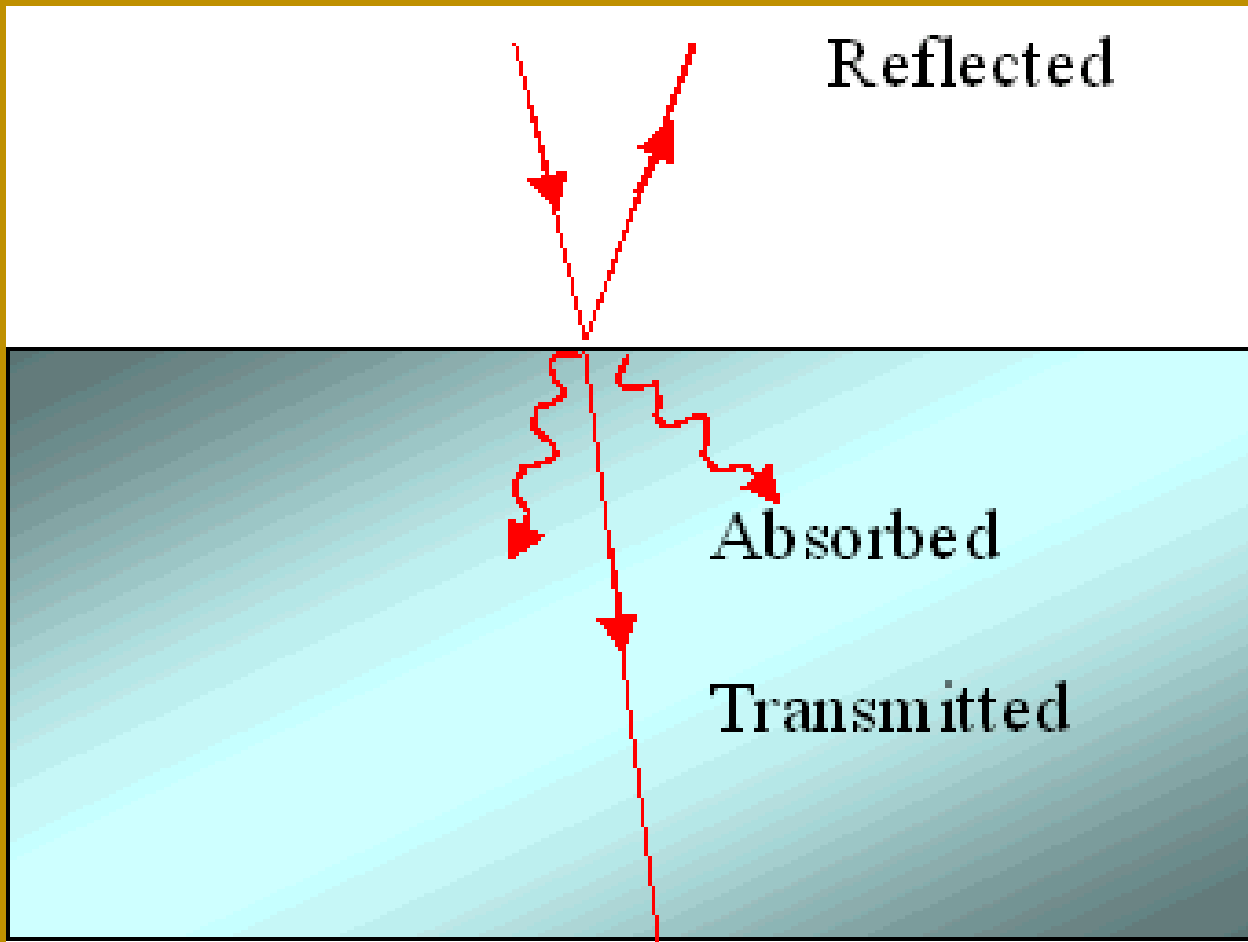
se nazývá „**transmittance**“. Pro praxi je významnější veličina

$$A = -\log T$$

zvaná „**absorbance**“. Transmittanci i absorbanci přímo měří přístroj.



Spektrofotometrické metody: absorpce záření



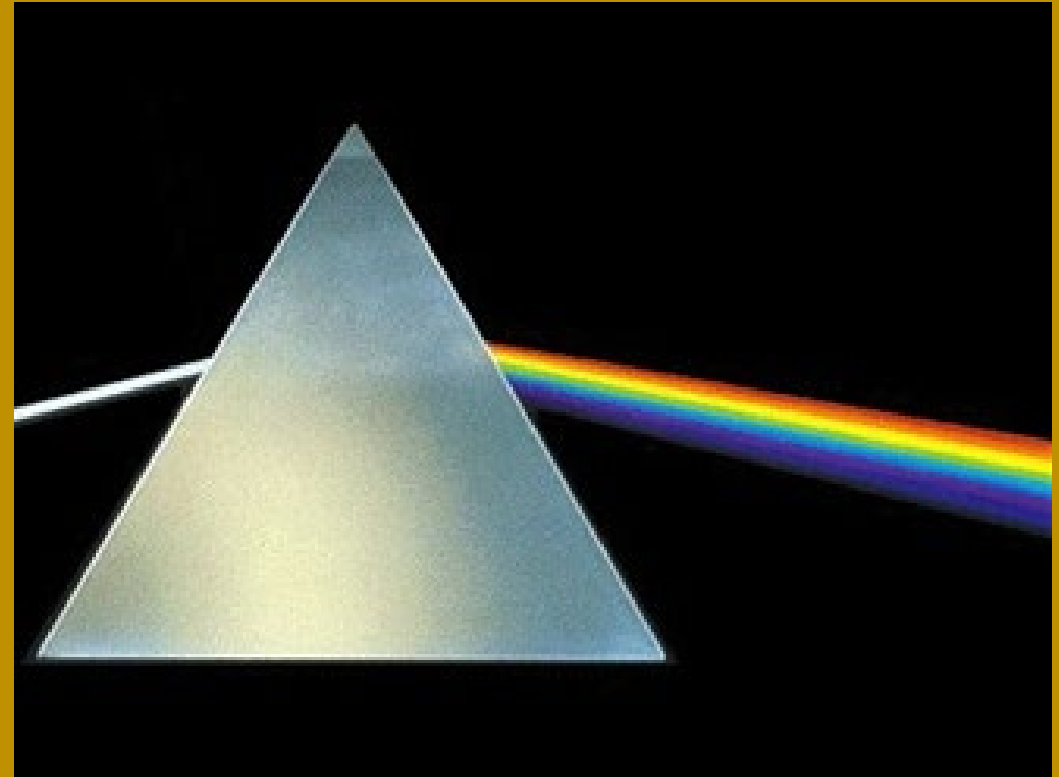
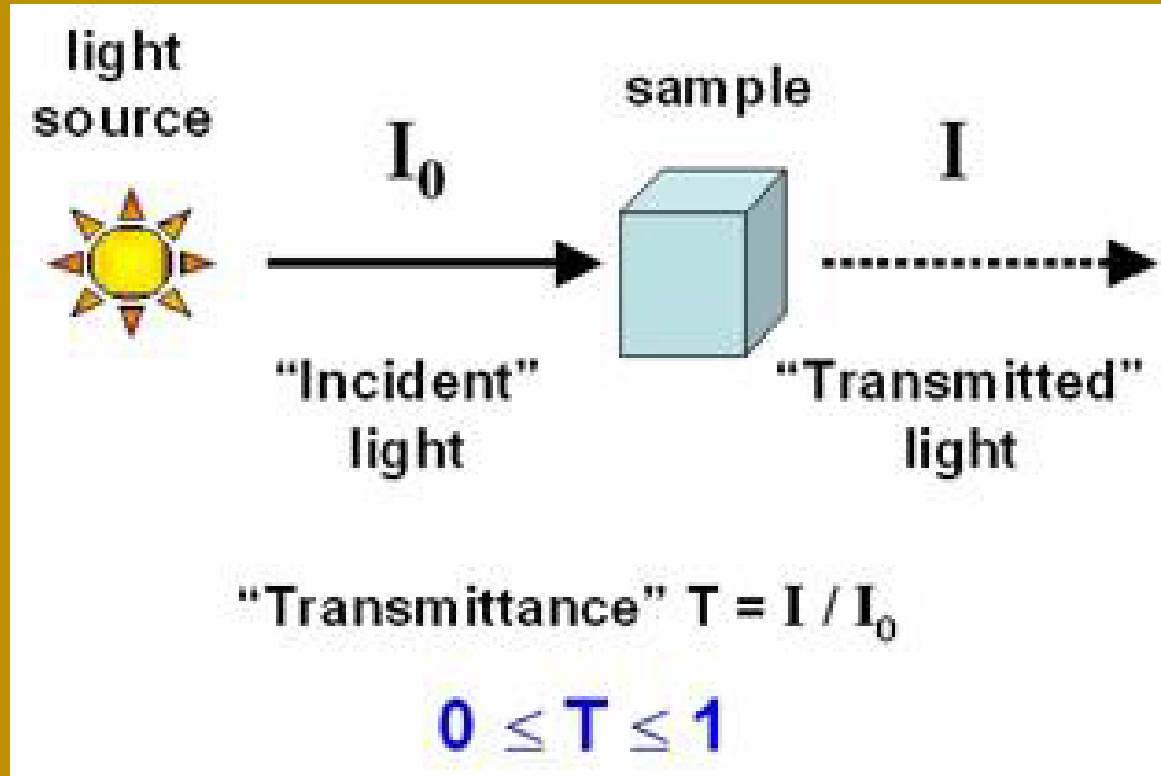
Signál získáme i v případě zakalených roztoků

Měření „stupně zákalu“ ve směru procházejícího paprsku – turbidimetrie

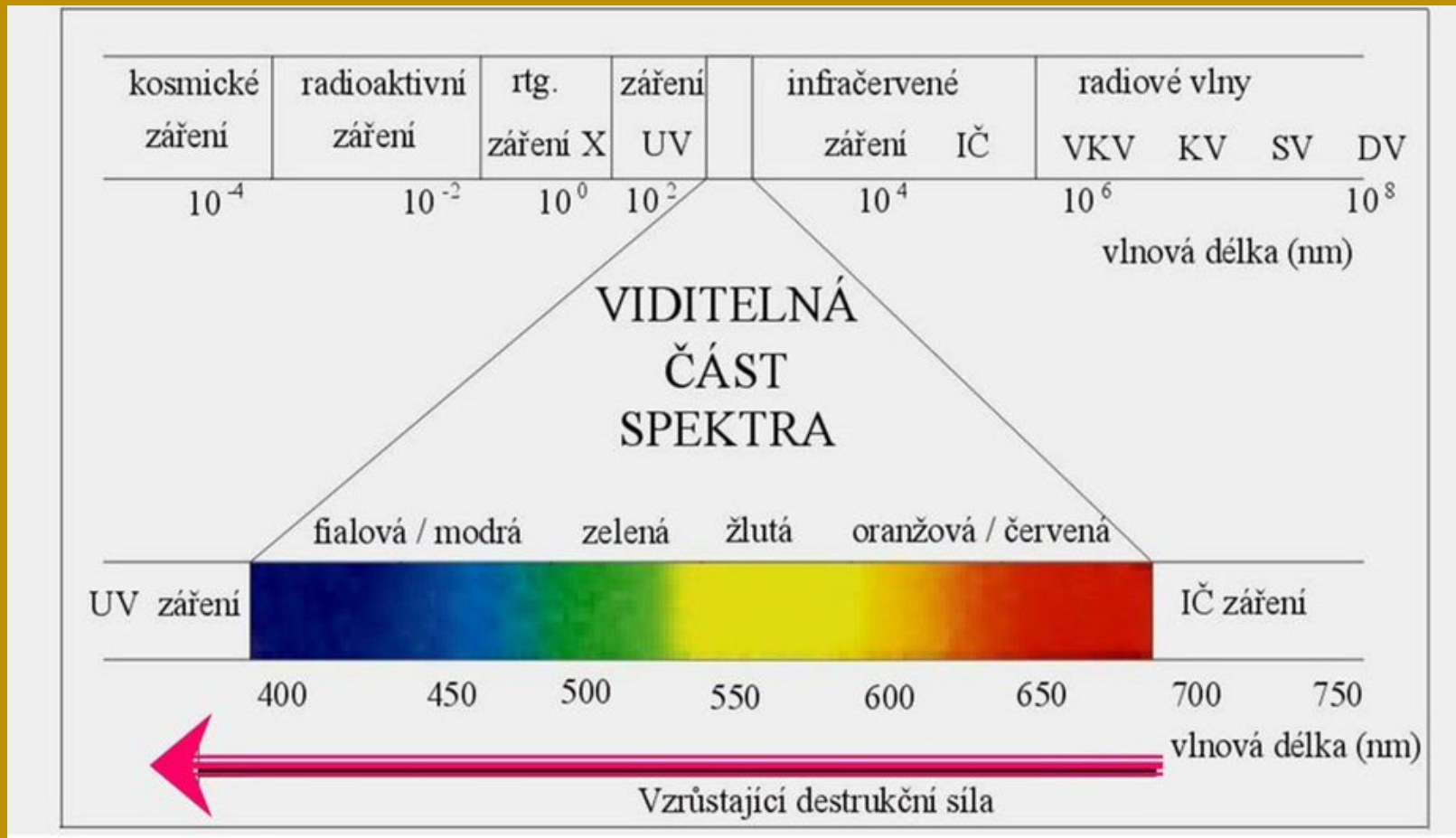
Měření v jiném směru - nefelometrie

O.D. – optická densita: použití při stanovení „koncentrace“ bakterií/mikroorganismů či jiných suspenzí

Spektrofotometrické metody: absorpce záření

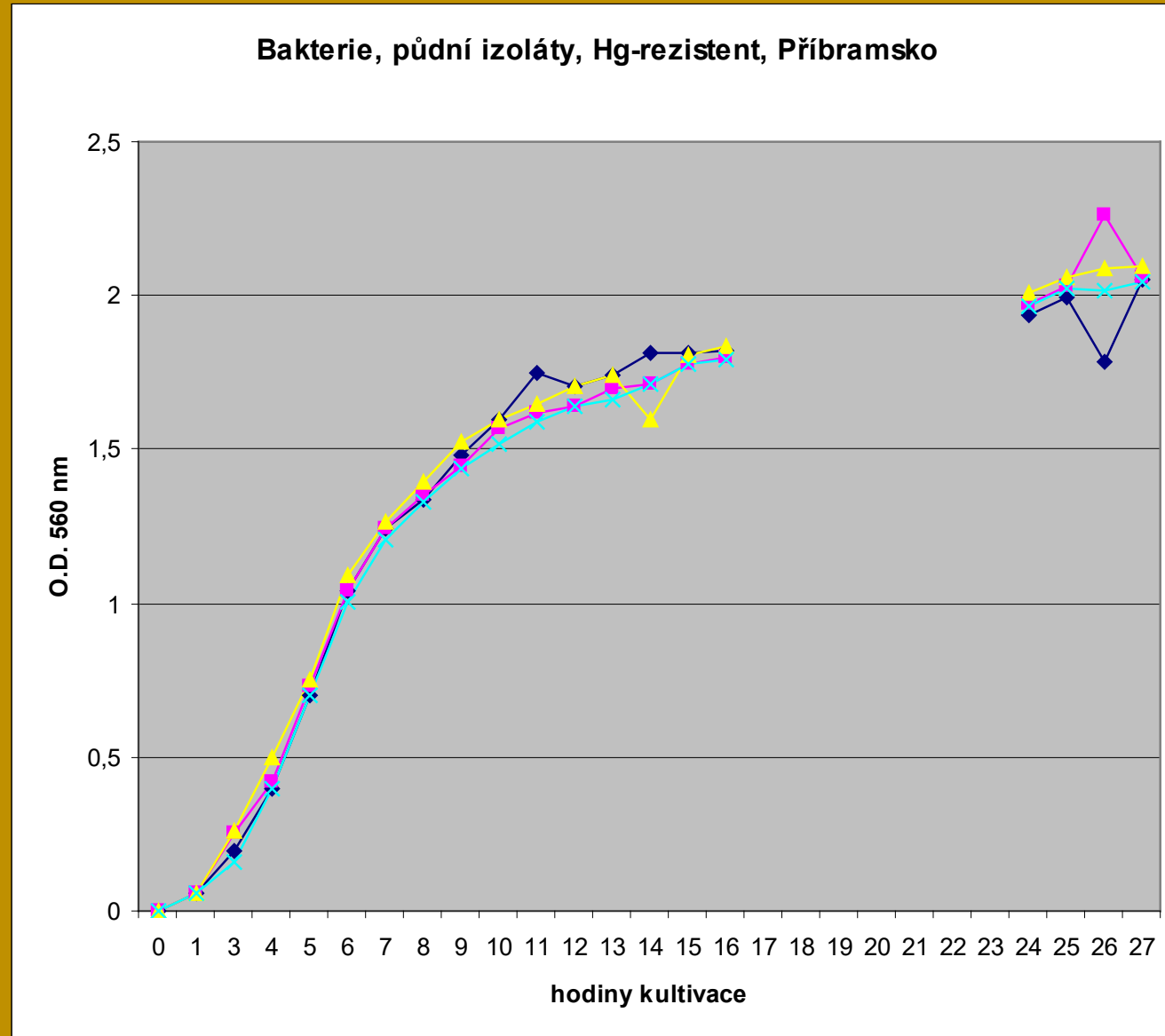


Vždy se používá monochromatické záření,
tj. světelný paprsek o definované vlnové délce (nm)



Oblast zájmu „UV-VIS“ - tedy vlnové délky jsou v nanometrech

Optická densita (A_{560}) – charakteristika množství bakterií v roztoku



Spektrofotometrické metody: absorpce záření

Kvantitativní vztah mezi koncentrací pohlcující látky c a měřitelným světelným tokem Φ při vlnové délce λ vystihuje Lambert-Beerův zákon, známý ve formě vztahu

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

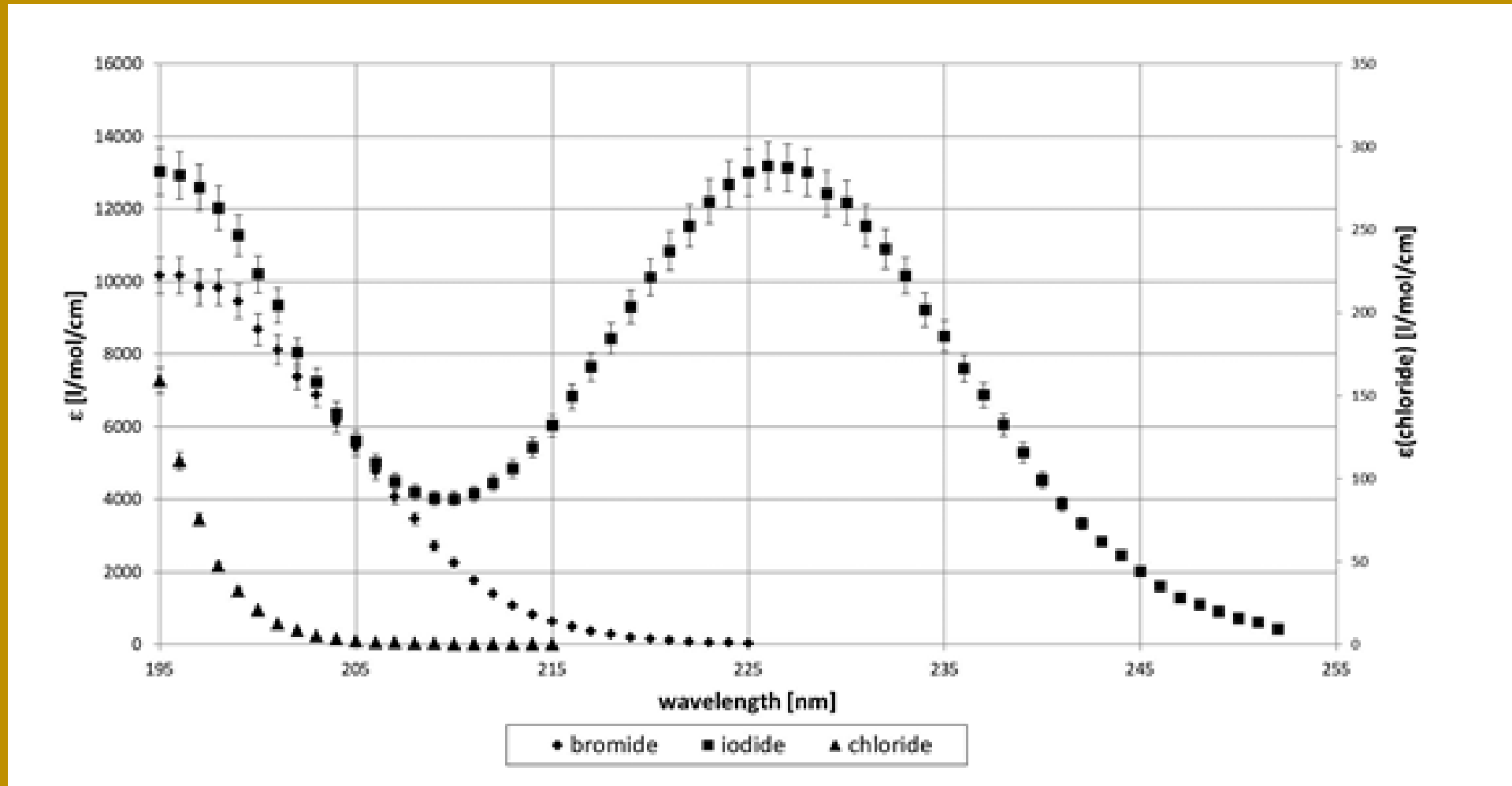
c = koncentrace látky (v mol/l)

l = délka prostředí, tj. měrné kyvety v cm a

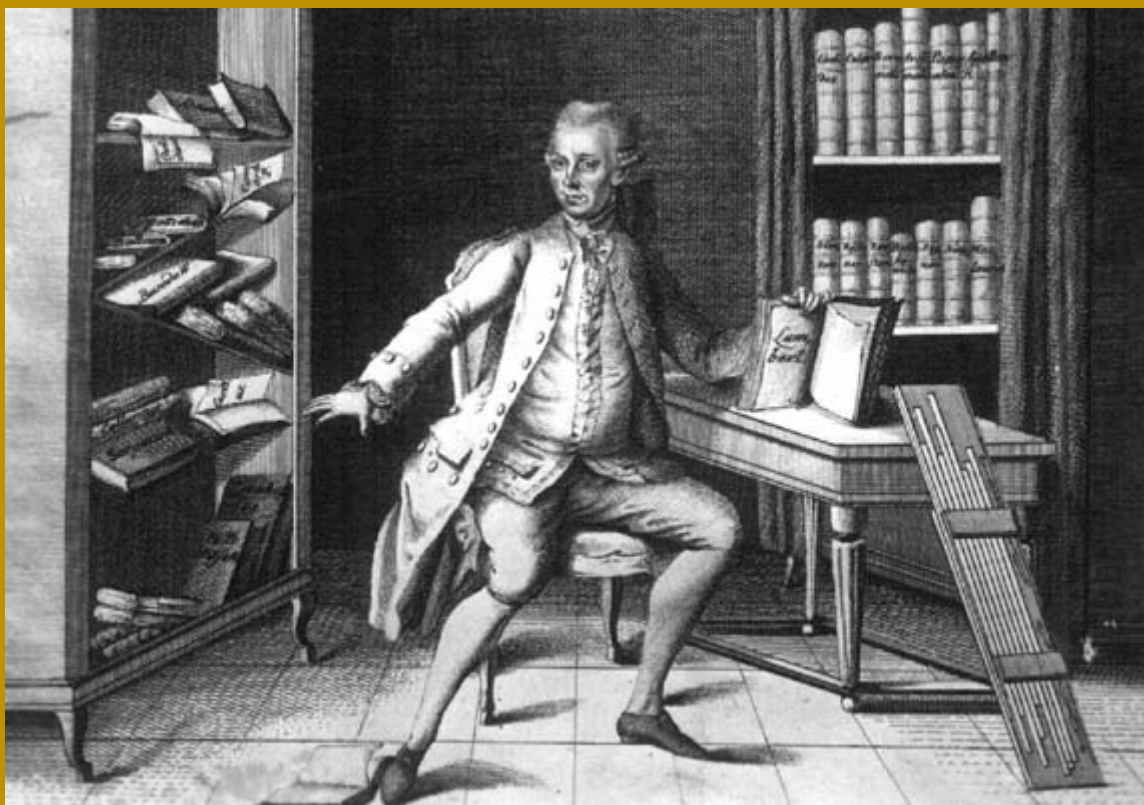
ε_{λ} je tzv. lineární molární absorpční koeficient, závislý na vlnové délce

... ϵ_λ je tzv. lineární molární absorpční koeficient, závislý na vlnové délce λ .

PŘÍKLADY- halogenidy



Birkman J. et al. (2018) UV spectroscopic properties of principal inorganic ionic species in natural waters. *Water Practice and Technology* (2018) 13 (4): 879–892. <https://doi.org/10.2166/wpt.2018.097>



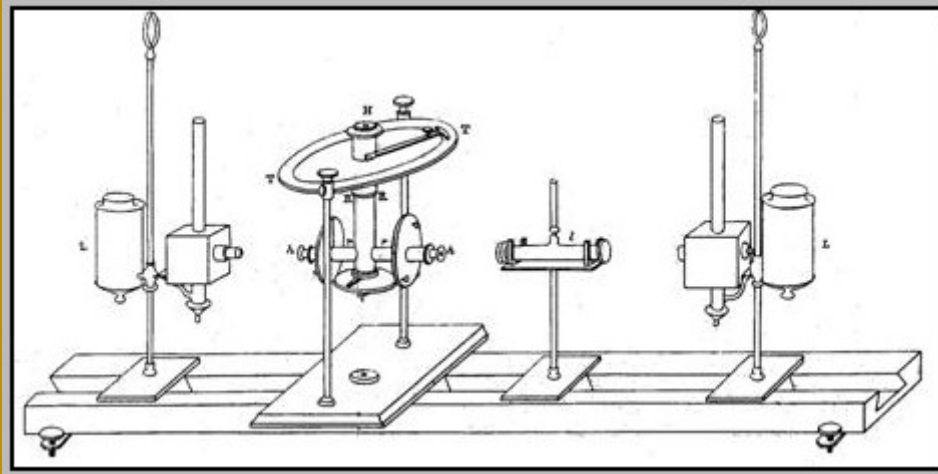
Johan Heinrich Lambert (1728 – 1777)
Photometria, 1760

I. H. LAMBERT
ACADEMIAE SCIENTIARVM ELECTO-
RALIS BOICAE, ET SOCIETATIS PHYSICO-ME-
DICAE BASILIENSIS MEMBRI, REGIAE SOCIETATI
SCIENTIARVM GOETINGENSI COMMERCIO
LITERARIO ADIVNCTI

PHOTOMETRIA
SIVE
DE
MENSURA ET GRADIBVS
LUMINIS,
COLORVM ET VMBRAE.

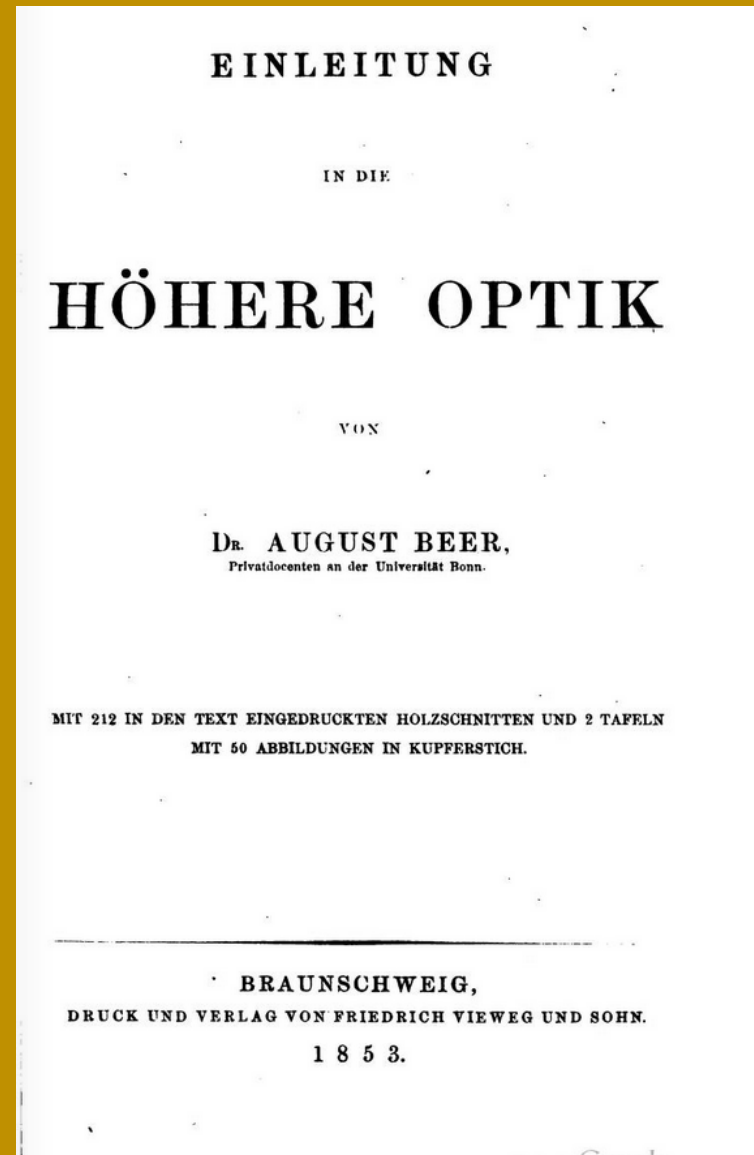


AUGUSTAE VINDELICORVM,
Sumptibus VIDVAE EBERHARDI KLETT
Typis CHRISTOPHORI PETRI DETLEFFSEN.
MDCCLX.



Fotometr navržený Beerem

August Beer (1825 – 1863)
Einleitung in die höhere Optik
(1854)



$$A = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l$$

- 16 ~~17~~ Napište rovnici Lambert-Beerova zákona a vysvětlete význam jednotlivých symbolů.
(2 body)

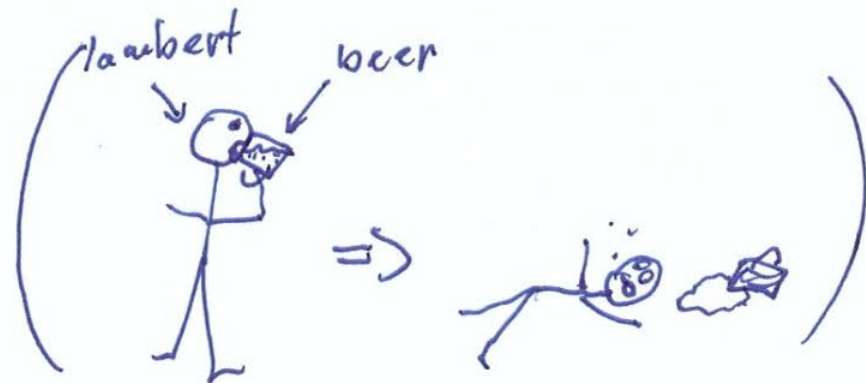
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A ... absorbance

c ... koncentrace absorbující látky

l ... délka absorbující vrstvy (průhledí) / hvězdy

ϵ ... molární absorpční koeficient



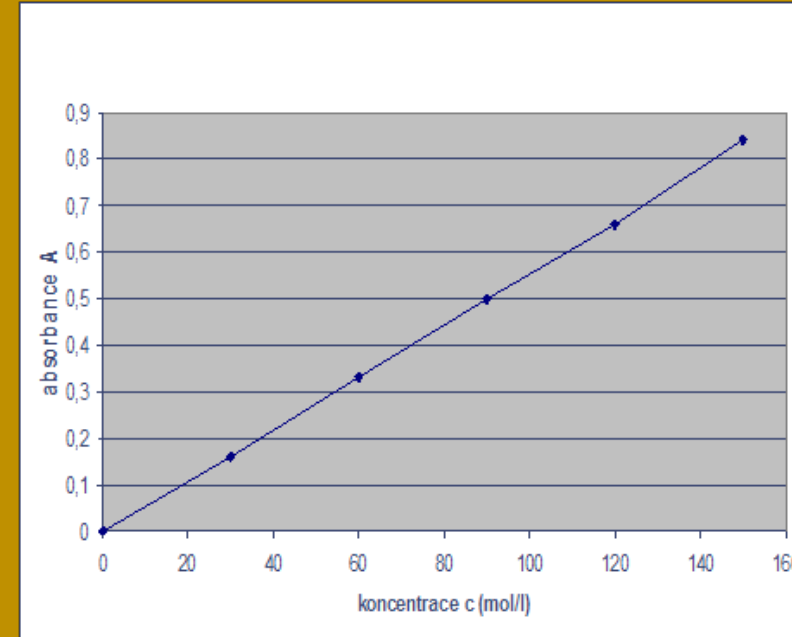
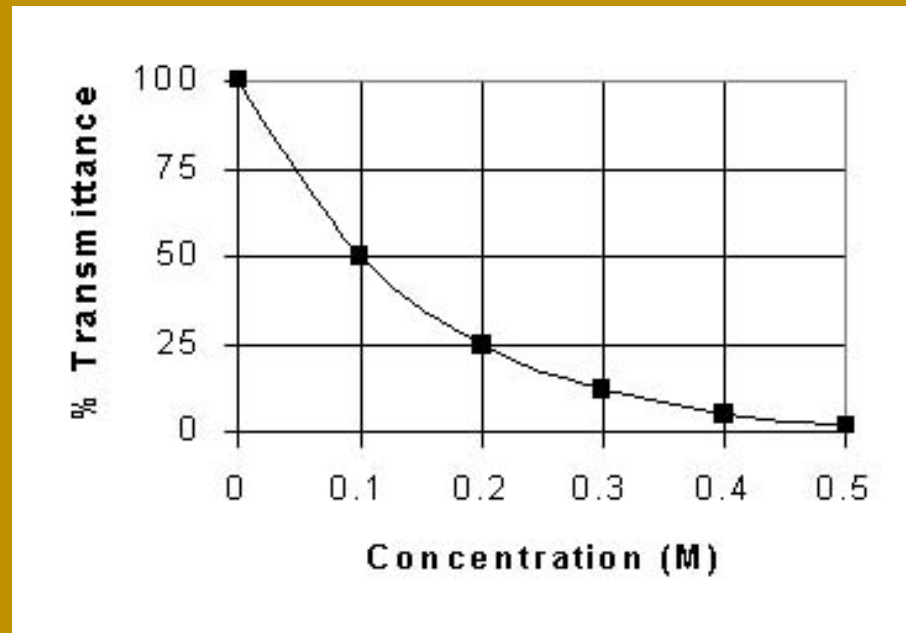
Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti

Absorpce UV/VIS záření je výsledkem interakce
záření – molekula.

Nejběžnější jsou excitace $\pi - \pi^*$
přechody $\sigma - \sigma^*$ nejsou tak časté.

Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti

Linearita Lambert-Beerova zákona (tj. závislost A na c) se musí vždy v daném rozsahu koncentrací experimentálně ověřit pomocí kalibrace standardním roztokem.



Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti

Spektrofotometrie v UV-VIS oblasti, tj v oblasti vlnových délek
190 – 400 nm (UV) a 400 – 800 nm (VIS).



Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti



Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti



Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti



Kyvety – různý objem: 2 ml, 0,5 ml ...

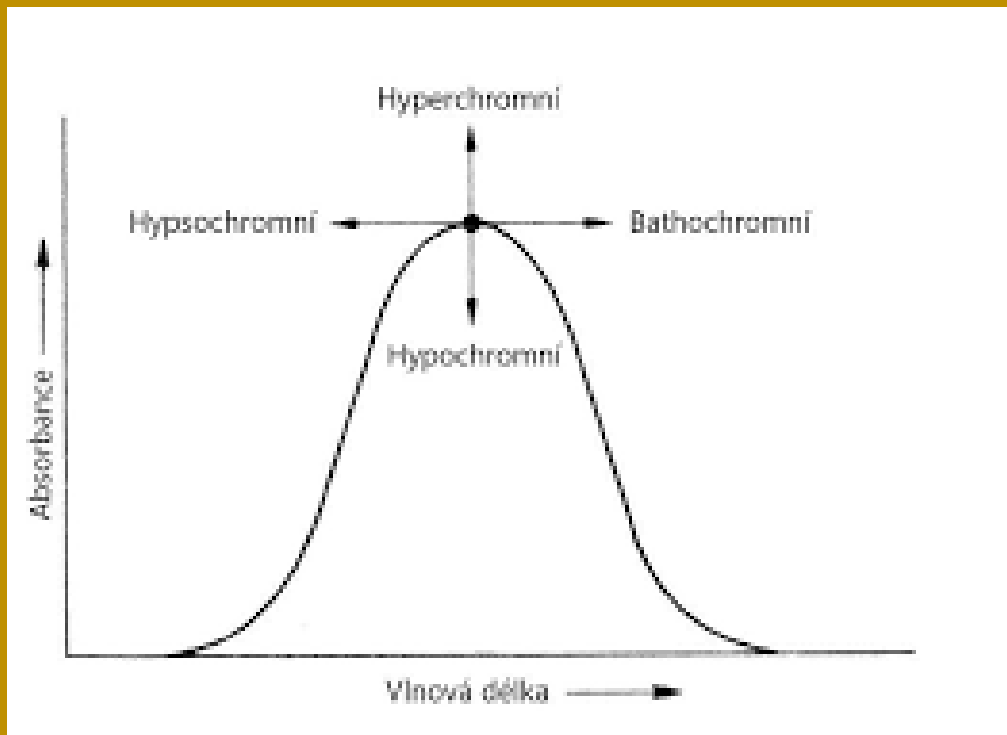
Kyvety – různý materiál: plastik (jednorázové), sklo, křemenné sklo



Nanodrop: měření UV/VIS spekter
nebo absorbance v objemech
cca 1-2 μl

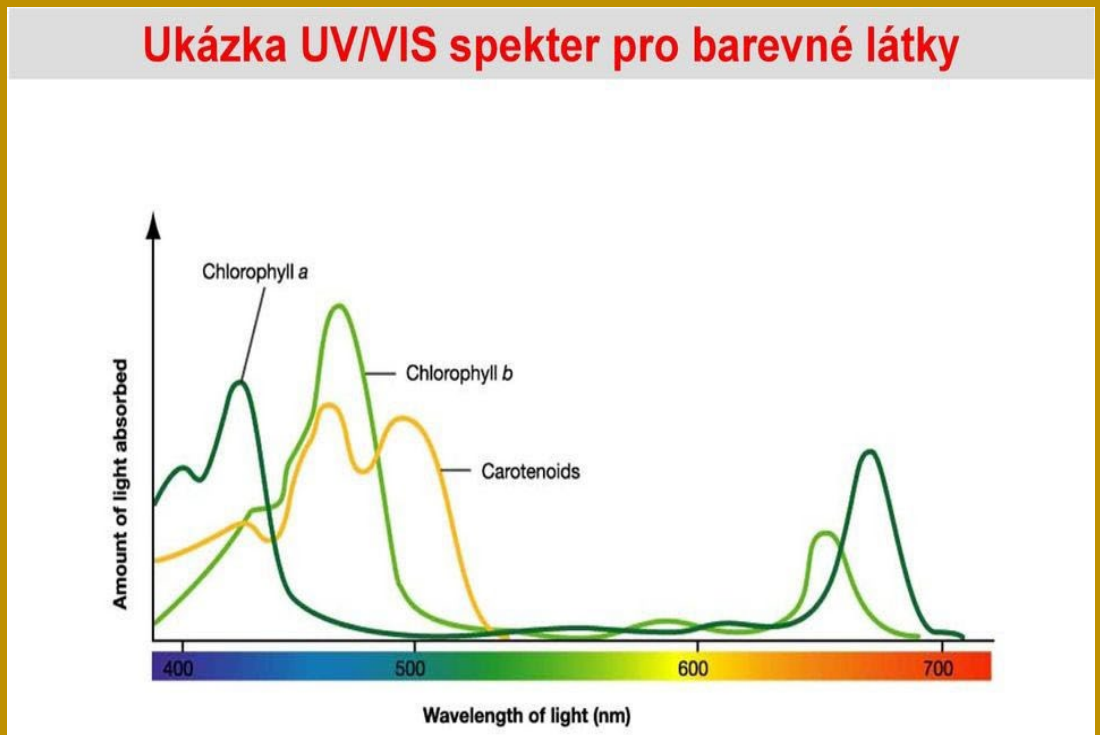
UV/VIS spektrum je závislost
Absorbance na vlnové délce;
je pro danou látku
vždy charakteristické





Vlevo terminologie pozorovaných posunů maxima vlnové délky od očekávaného.

Vlnová délka = charakteristika kvality (co to je)
 Integrál plochy pod píkem = kolik toho je



Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti

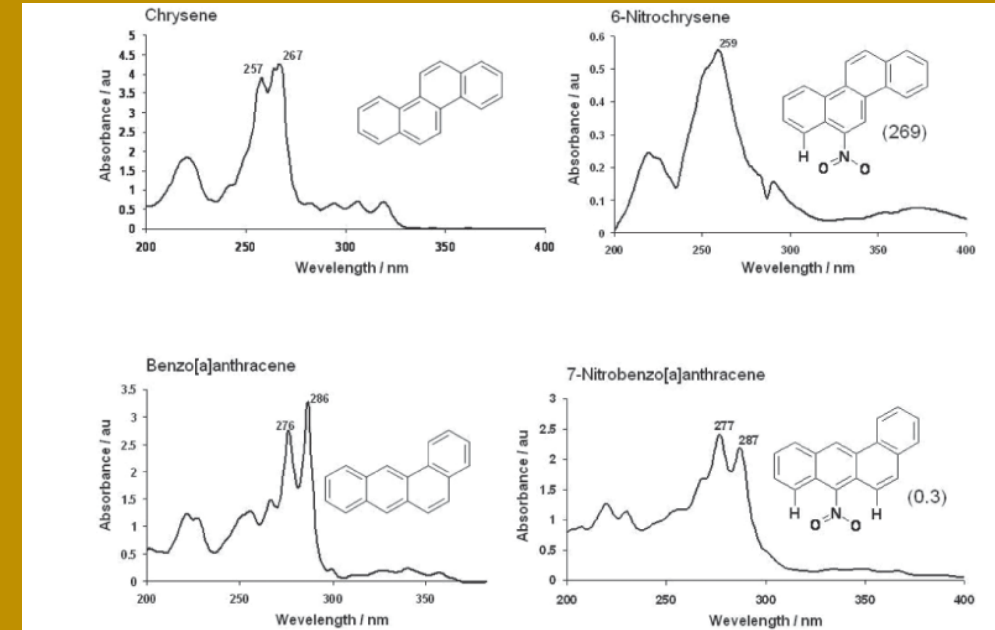
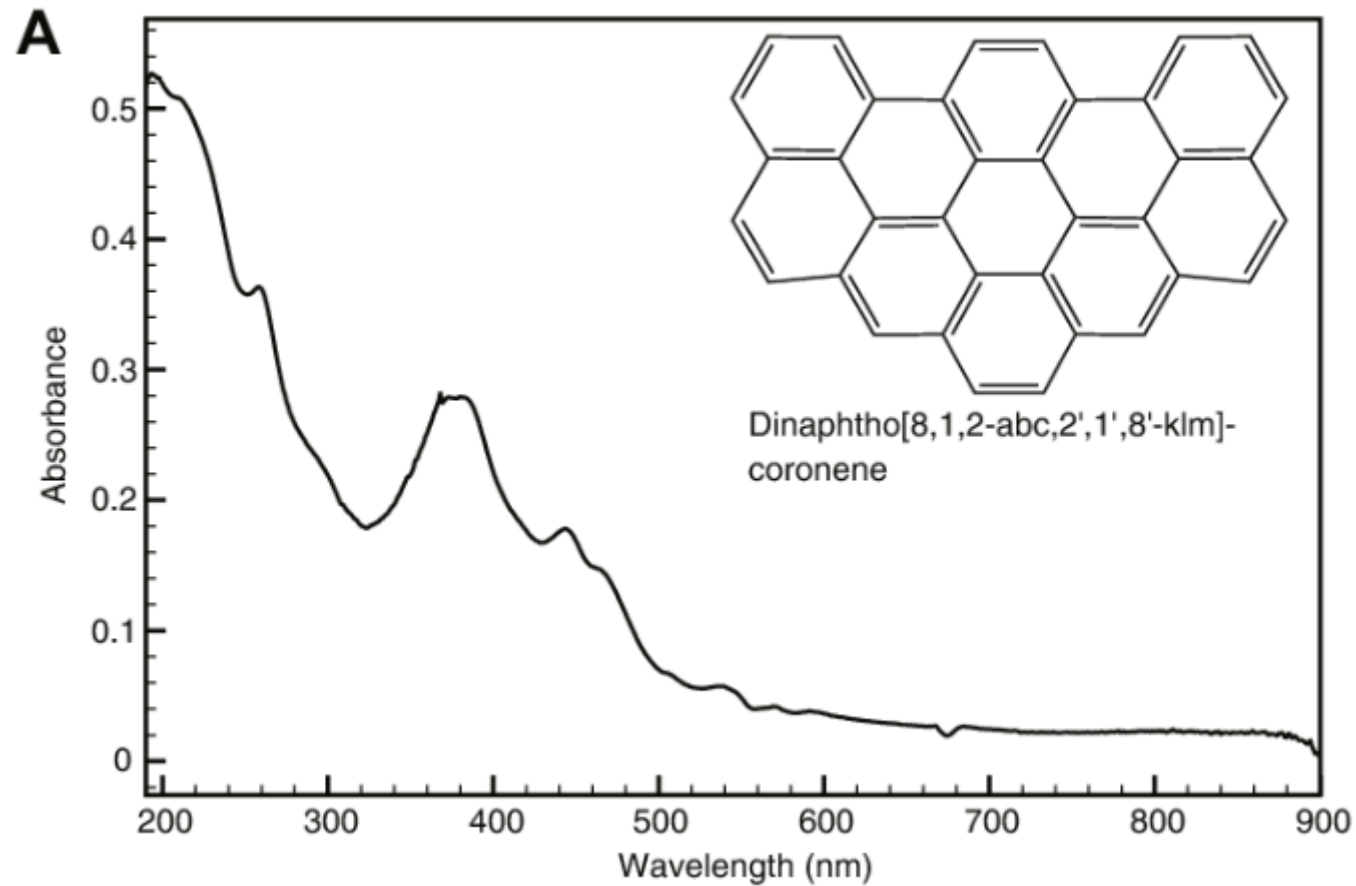
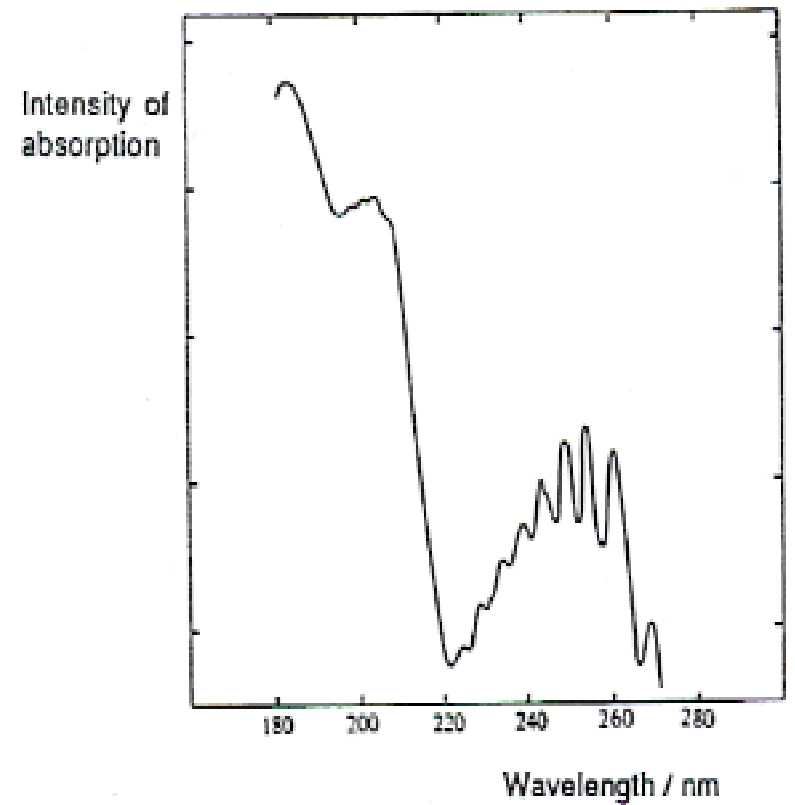
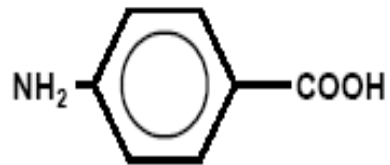
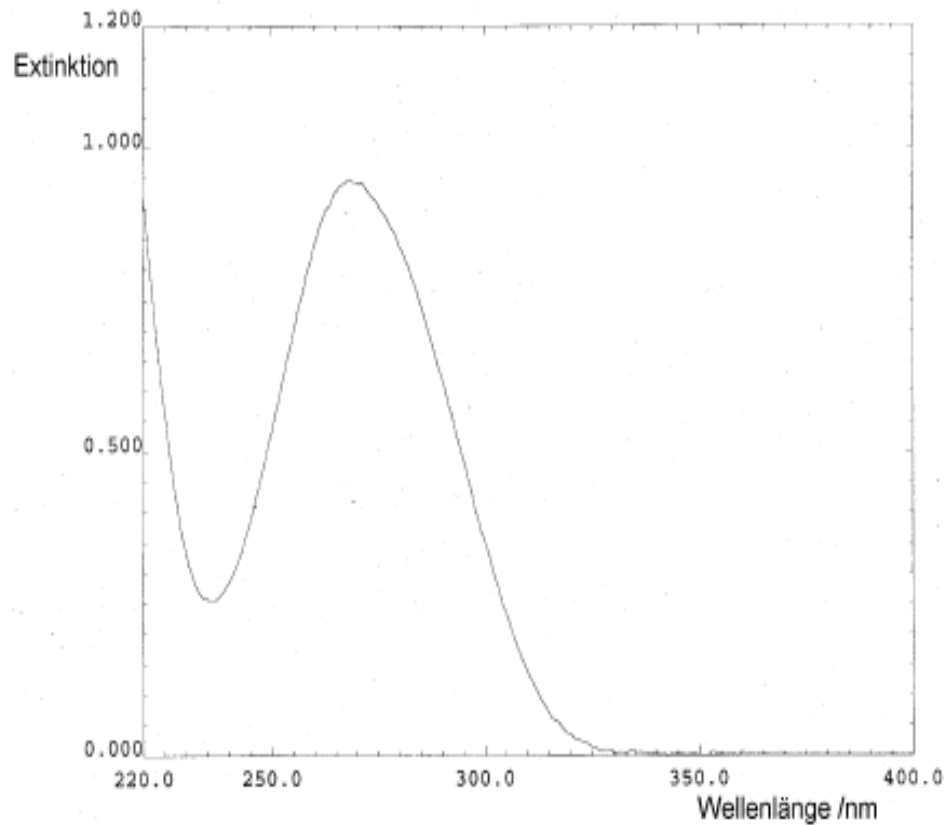


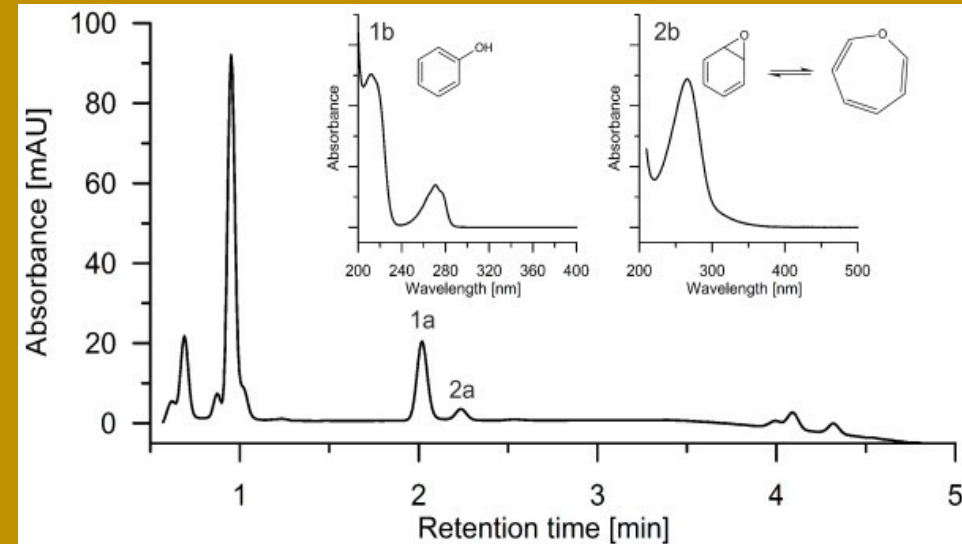
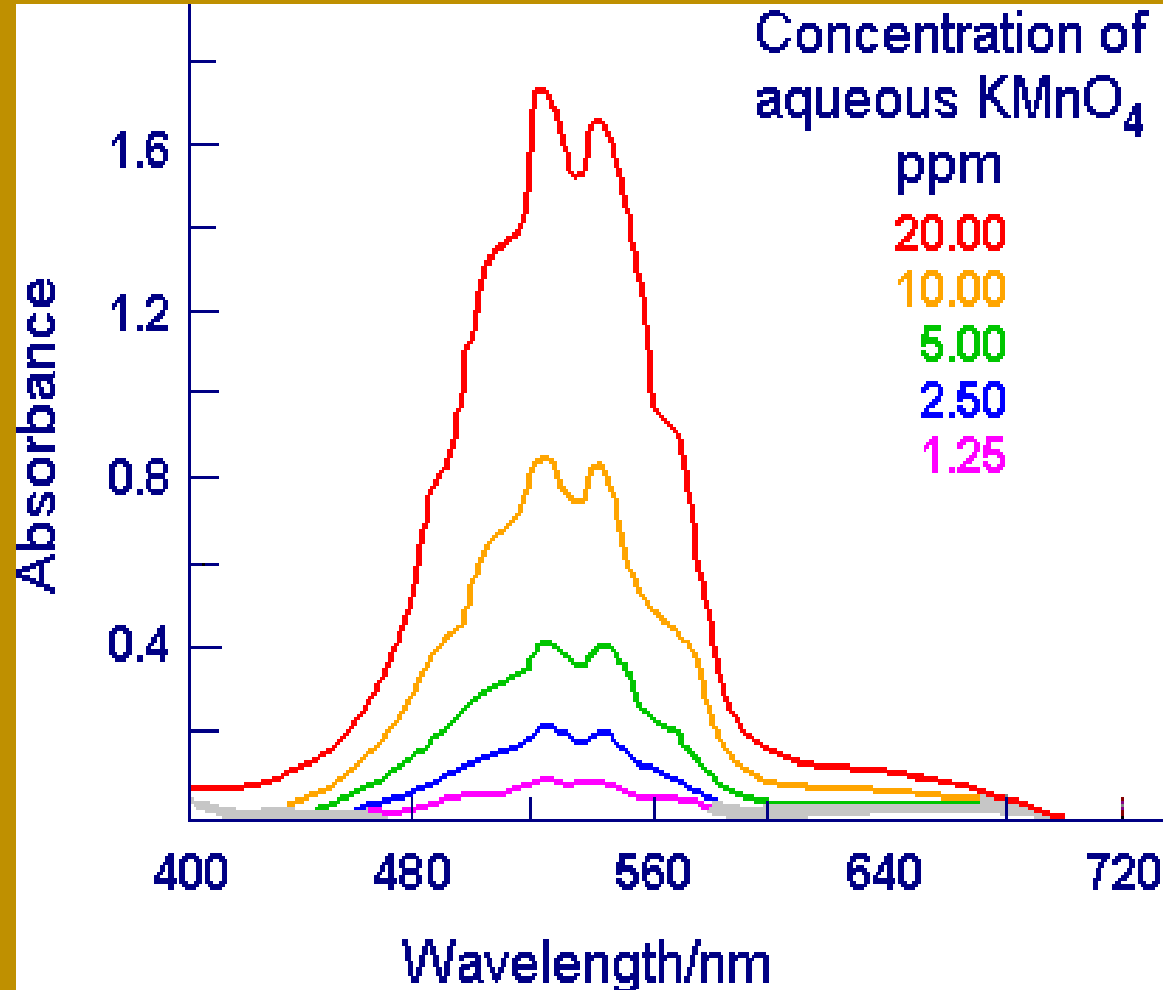
Figure 2. UV spectra of Chrysene, Benzo[a]anthracene, 6-Nitrochrysene and 7-Nitro-benzo[a]anthracene, and mutants per nmol (in parenthesis), from ref. 6, of 6-Nitrochrysene and 7-Nitro-benzo[a]anthracene.

Aromatické látky vždy vykazují absorpční maximum při 210 nm a 254 (\pm) nm.

Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti



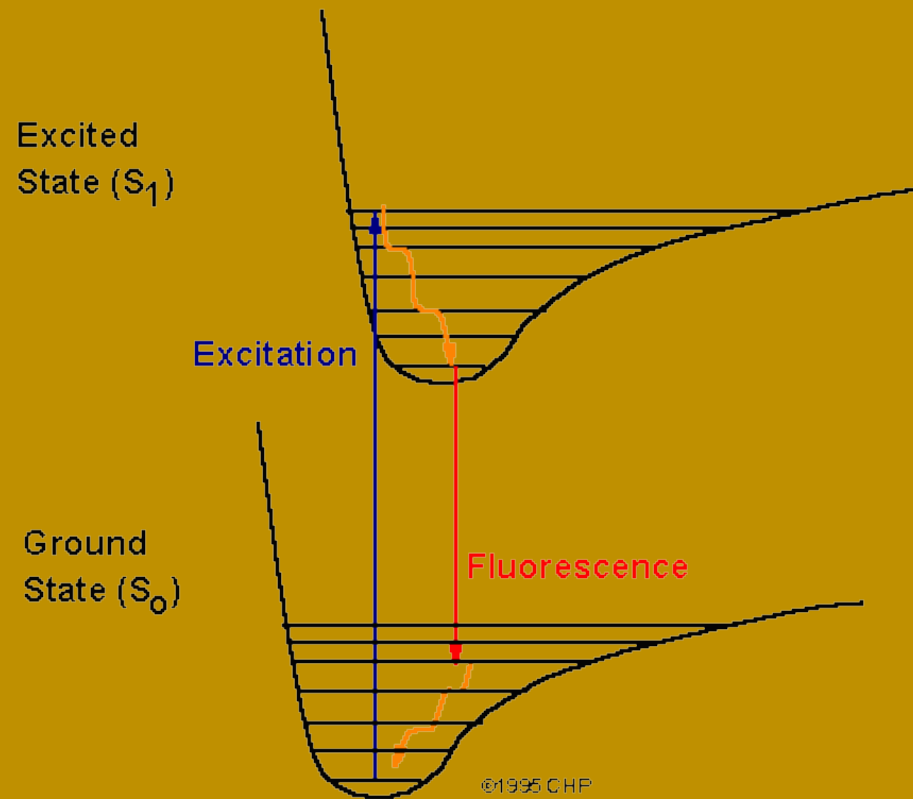
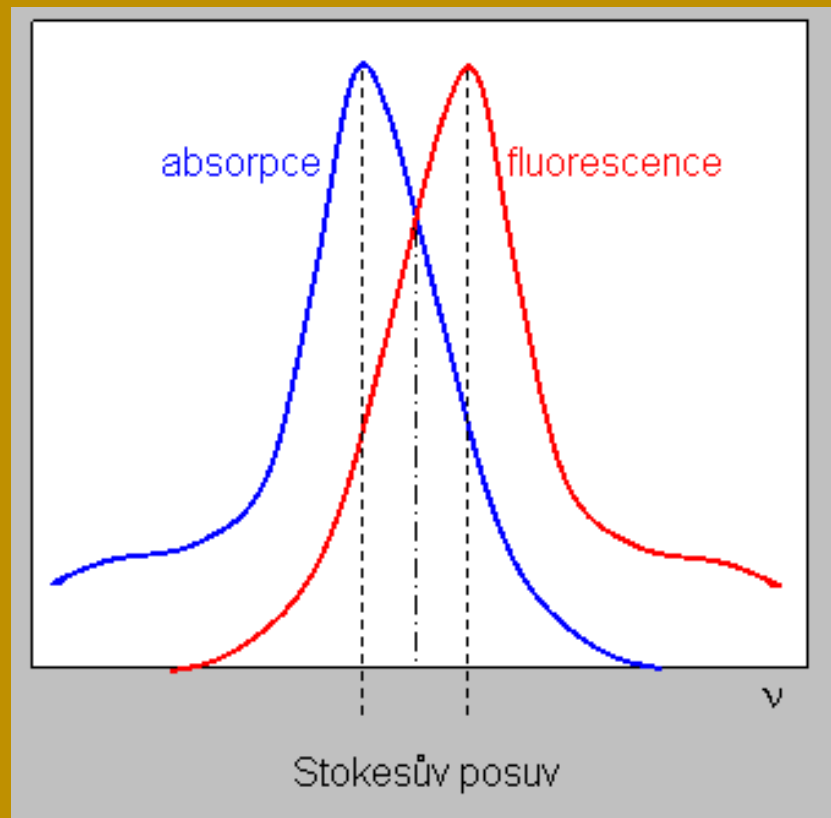
Spektrofotometrické metody: absorpce záření v UV/VIS oblasti



UV/VIS spektrofotometrie:

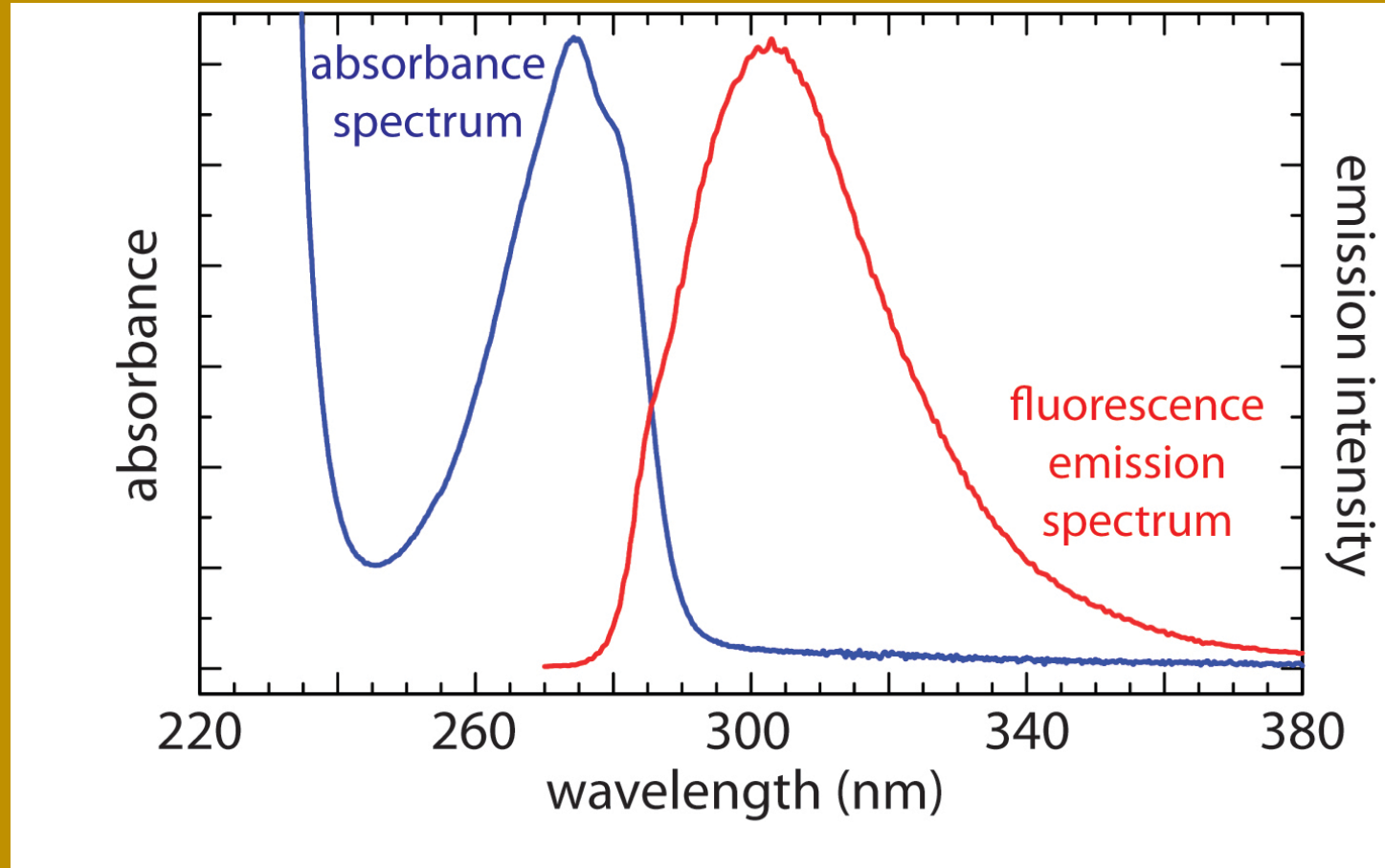
použití samostatné (UV/VIS) spektra, nebo jako detektor (DAD) v (HPLC) chromatografii

Spektrofotometrické metody: měření fluorescence v UV/VIS

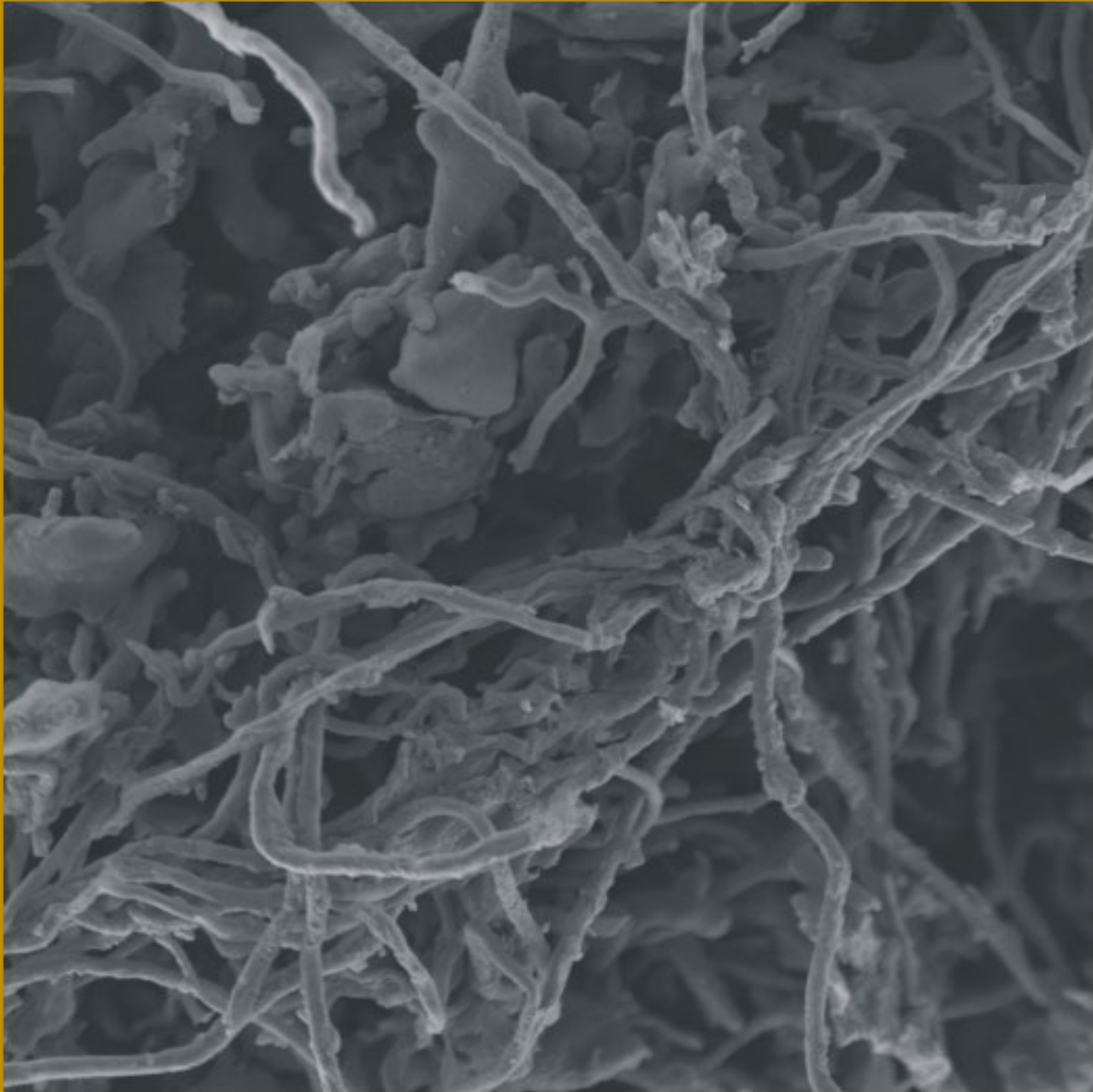


Citlivější metoda než UV/VIS spektrofotometrie, měří se signál po excitaci látky zářením (**kolmo** na původní paprsek)

Spektrofotometrické metody: měření fluorescence v UV/VIS



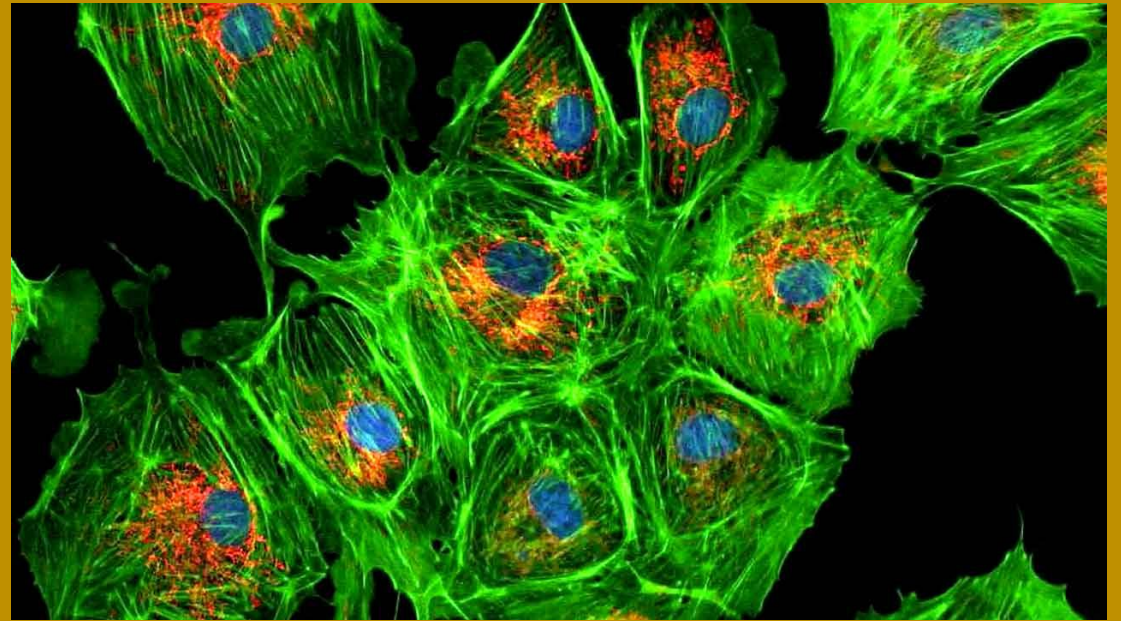
Citlivější metoda než UV/VIS spektrofotometrie, měří se signál po excitaci látky (kolmo na původní paprsek)



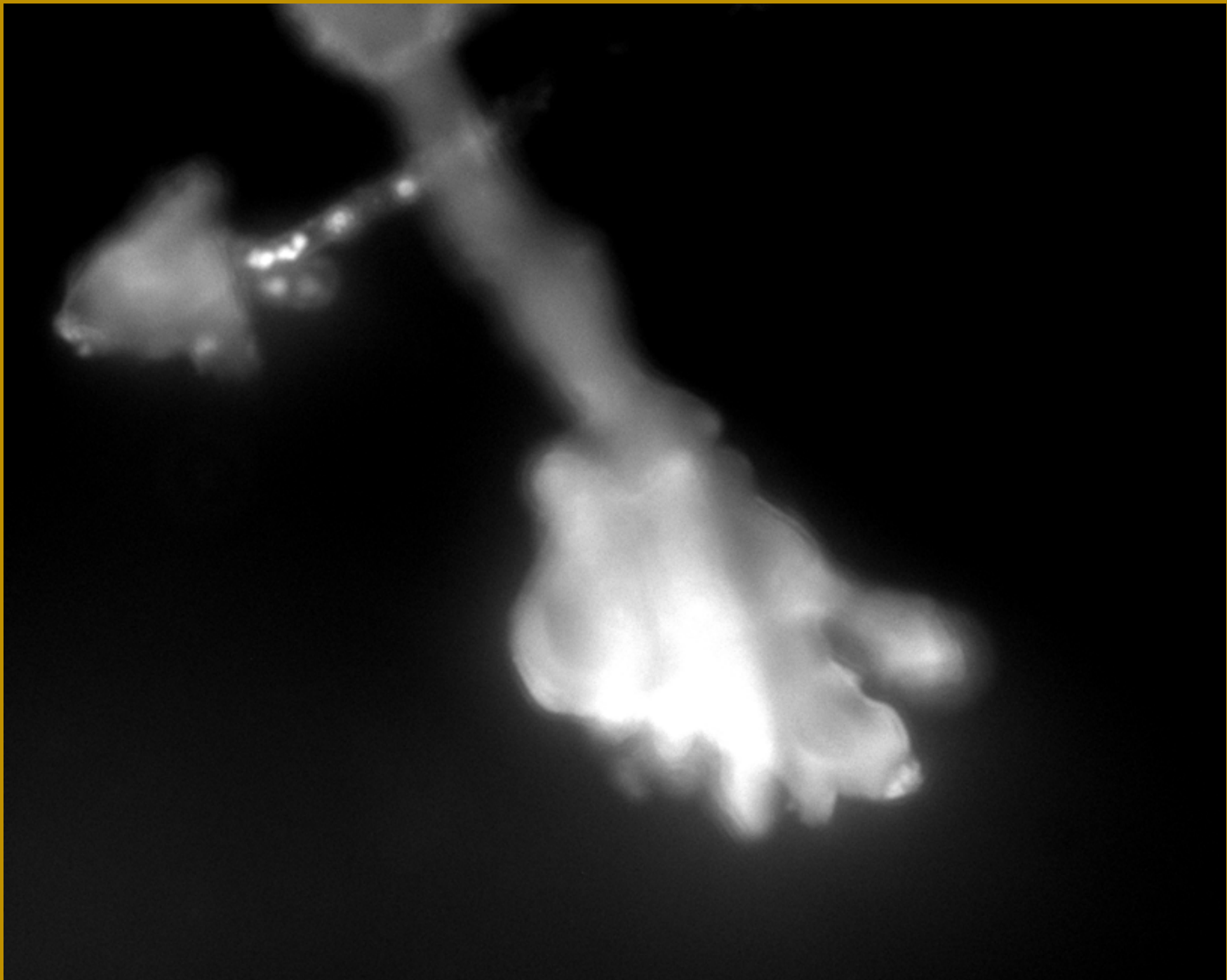
Fluorescence v přírodě

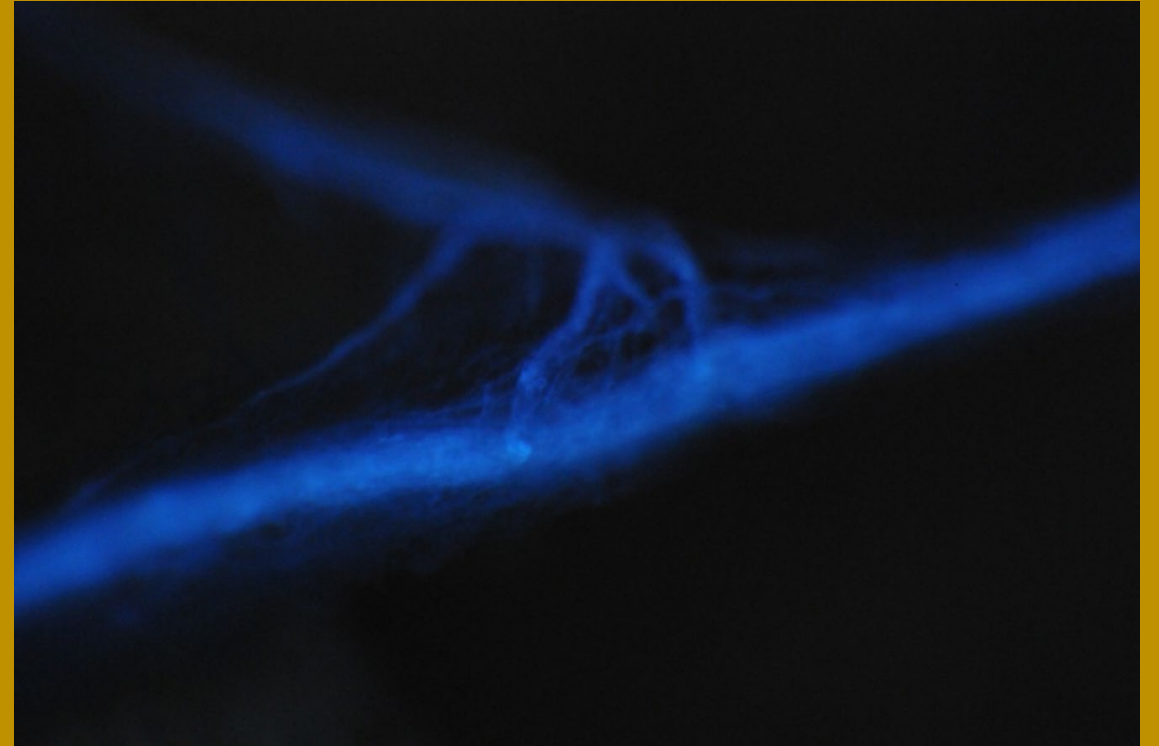
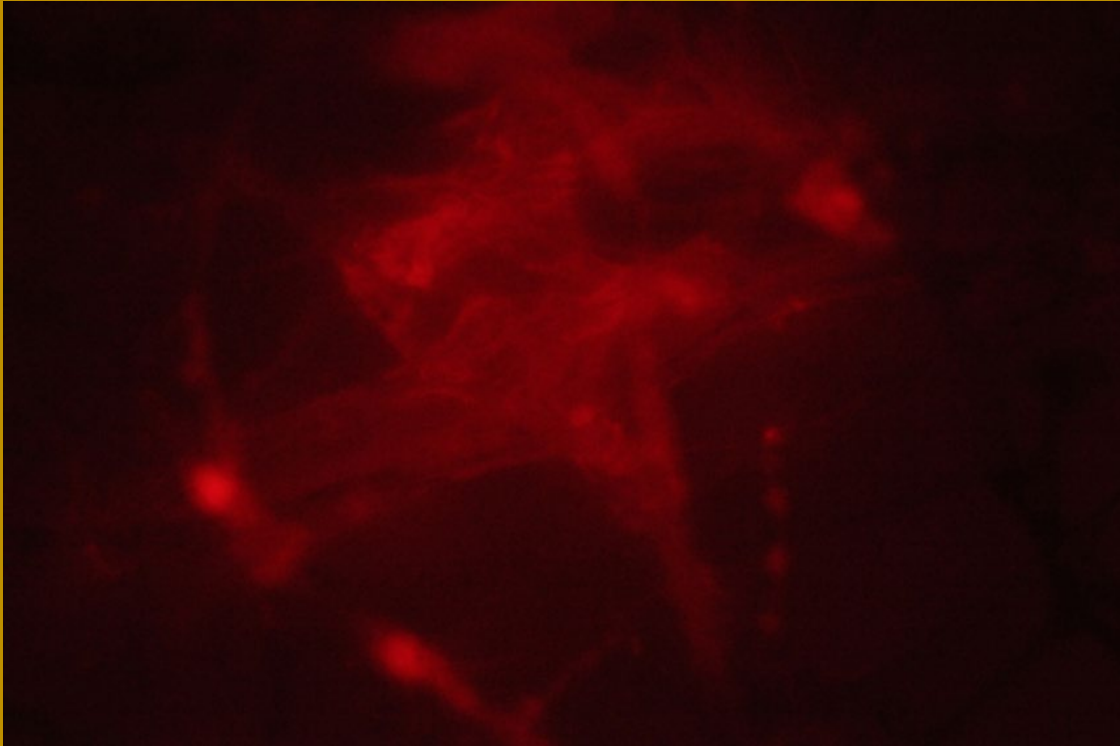
chlorofyl (zelená barva roztoku, červená fluorescence)

Různé organické radikály – zviditelnění pod mikroskopem GFP









Vlákna (mycelium) dřevomorky domácí (*S. lacrymans*) fluoreskující v přítomnosti různých kovových iontů.

Spektrofotometrické metody: absorpce záření

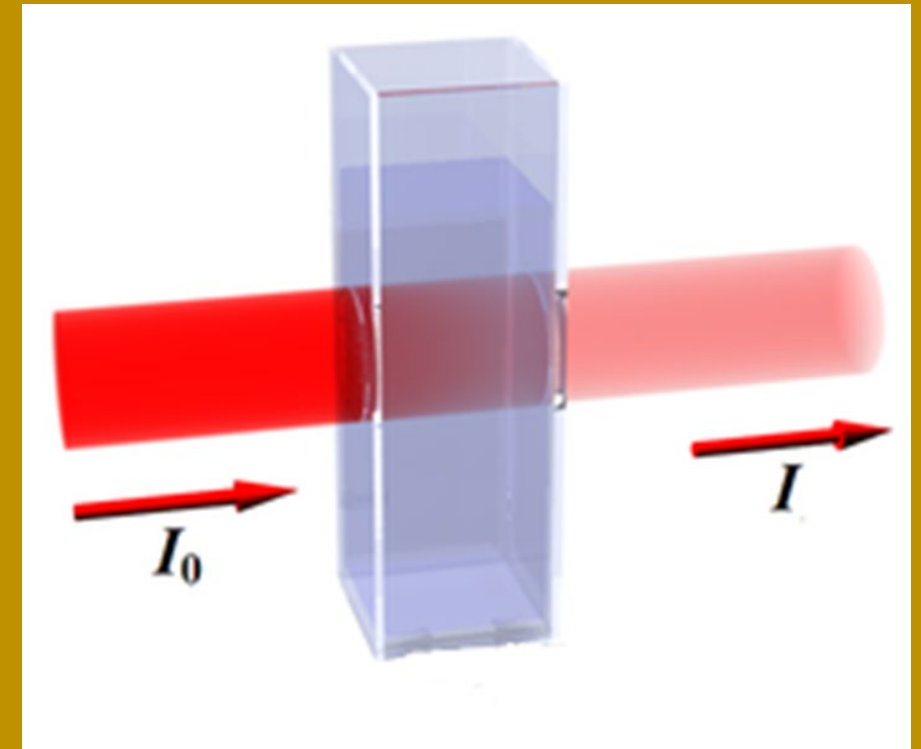
Poměr mezi Φ a Φ_0 je možné změřit. Veličina

$$\Phi/\Phi_0 = T$$

se nazývá „**transmittance**“. Pro praxi je významnější veličina

$$A = -\log T$$

zvaná „**absorbance**“. Transmittanci i absorbanci přímo měří přístroj.



Spektrofotometrické metody: absorpce záření

Poměr mezi Φ a Φ_0 je možné změřit. Veličina

$$\Phi/\Phi_0 = T$$

se nazývá „**transmittance**“. Pro praxi je významnější veličina

$$A = - \log T$$

zvaná „**absorbance**“. Transmittanci i absorbanci přímo měří přístroj.



Spektrofotometrické metody: atomová absorpční spektrometrie

Volné atomy v plynném stavu jsou schopny absorbovat záření těch vlnových délek, které samy vyzařují.

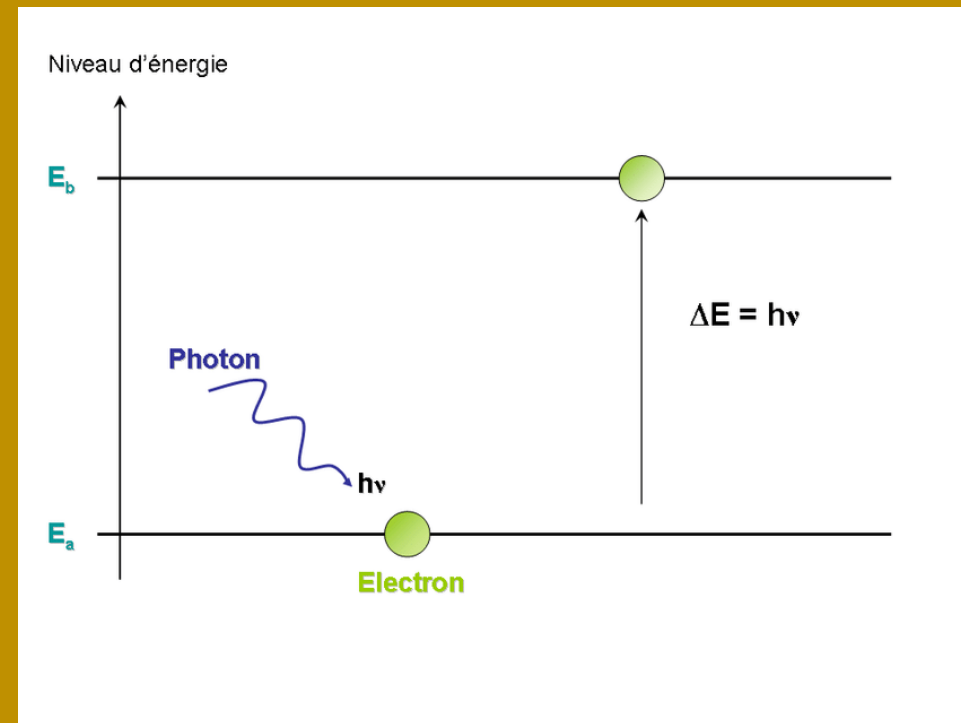
Je-li atom vystaven tomuto záření, přechází do excitovaného stavu a dochází k absorpci záření.

Aplikační možnosti AAS

stanovení téměř všech **kovů**, metaloidů a několika nekovů (B, Si, P)

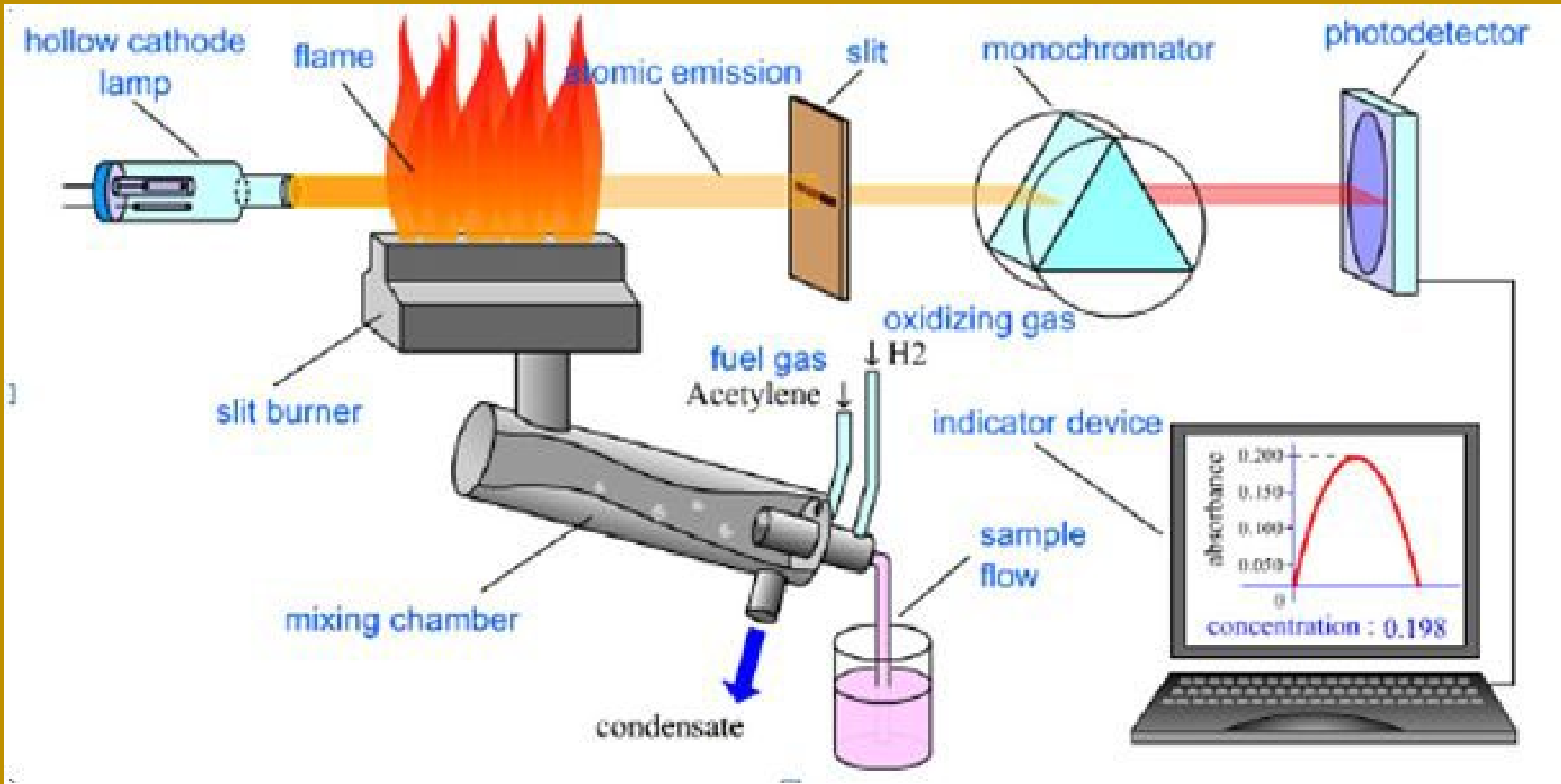
plamen acetylen - vzduch (t 2000-2300°C): pro snadno atomizovatelné prvky (alkalické kovy, Mg, Ca, Zn, Cu, Cd, Pb, Mn, Fe, případně Cr)

plamen acetylen - oxid dusný (t 2800-3000 °C): pro obtížně atomizovatelné prvky (Sr, Ba, V, Cr, Mo, Al, Si, B atd.); nebo prvky, které tvoří s matričními složkami (fosforečnany, křemičitany) termostabilní sloučeniny (Ca, Mg, Ni, Fe)



Využití v analýze anorganických látek

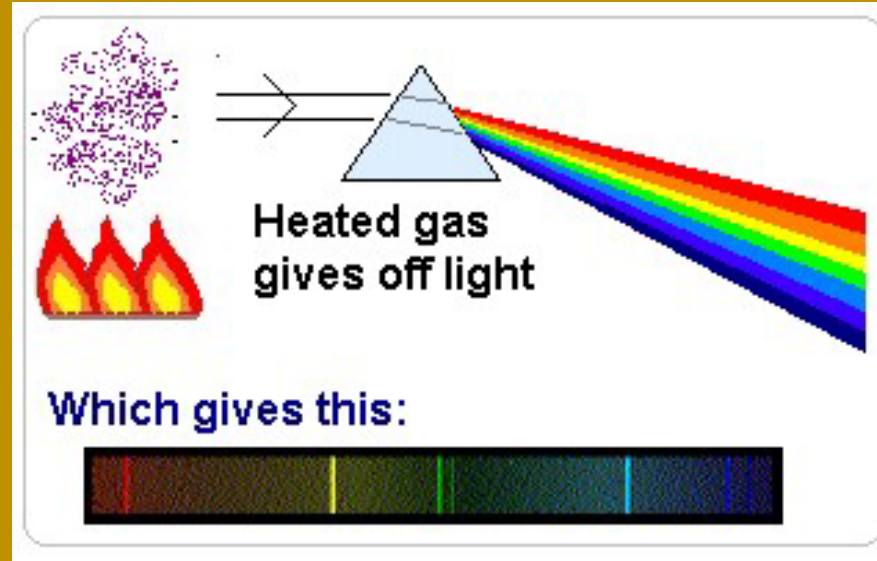
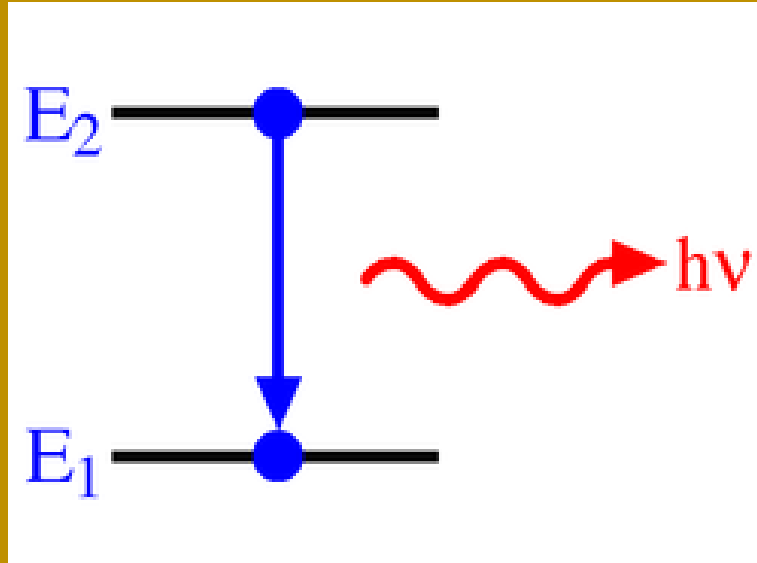
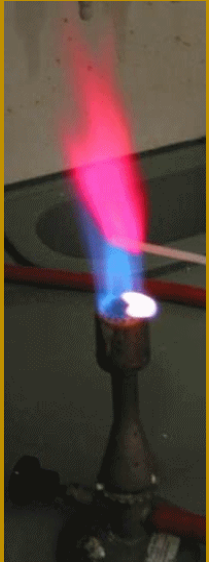
Princip AAS: snížení intenzity záření „charakteristické“ vlnové délky excitovanými atomy prvku
(kvantita: opět Lambert-Beerův zákon)



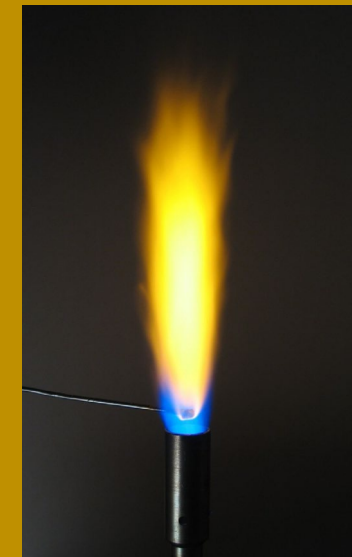
Spektrofotometrické metody: atomová absorpční spektrometrie



Instrumentální metody: atomová emisní spektrometrie



Emisní spektrum:
čárové, typické použití
v biologii: Na, K, Ca...
obecně pro prvky
s typickým zářením při
de-excitaci



Sodíkový dublet – dvojčára ve spektru Na: 589,0 a 589,6 nm

Citlivější než AAS je metoda ICP-MS

(hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem – využití v anorganické analýze prvků ve vzorku - *není tu Lambert-Beerův zákon!*)

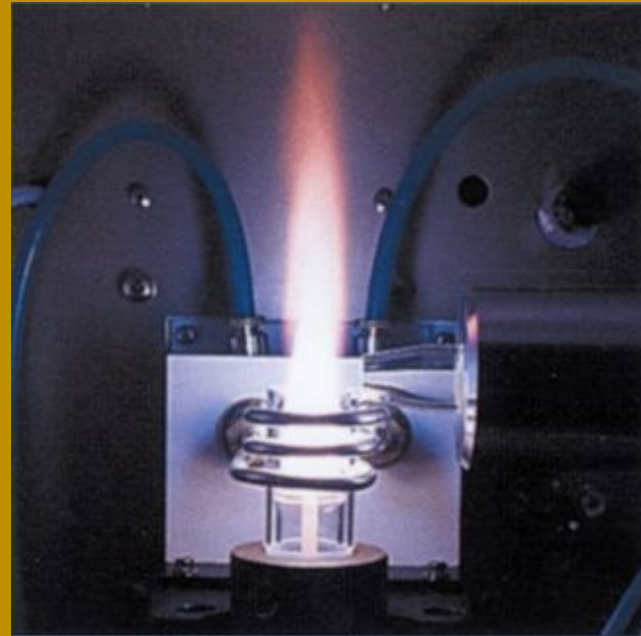
Roztok analytického vzorku je zmlžen a vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno **argonové plazma** o teplotě 6 000 – 10 000 K.

Za takových podmínek se rozpouštědlo okamžitě odpaří a zanikají chemické vazby v molekulách přítomných sloučenin. Jednotlivé volné atomy ve většině případů vytvoří jednu **kladně nabitě ionty Me^+** , které jsou dále unášeny do přechodové komory, kde je snížen tlak plynu na přibližně 0,01 Torru.

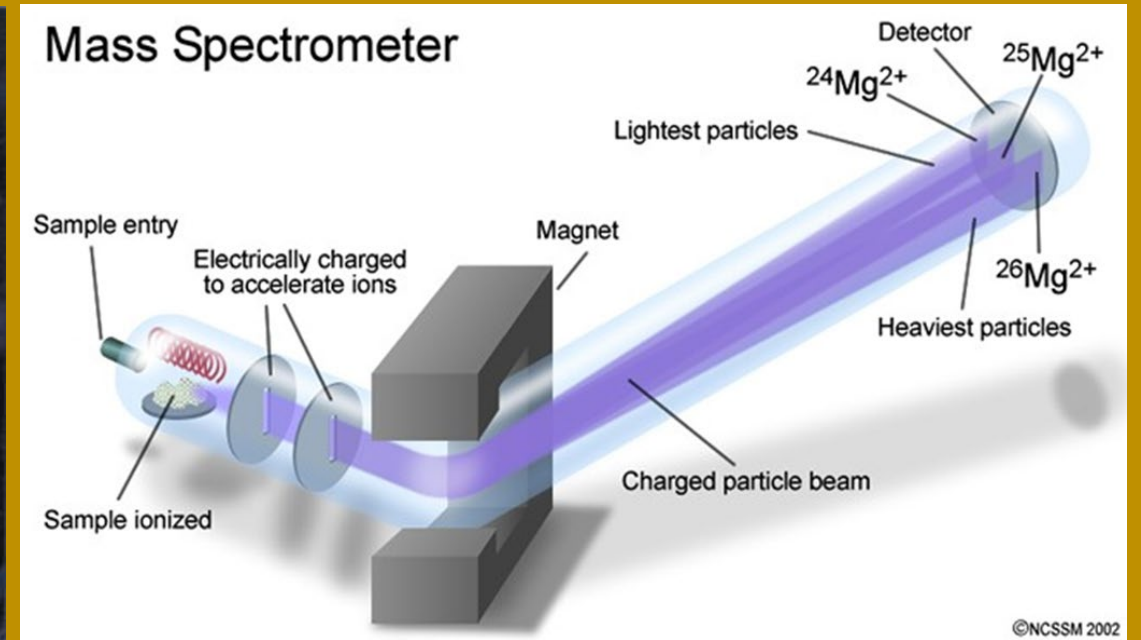
Po průchodu do vstupu k detektoru klesá tlak na řádově 10^{-5} Torru a ionty se systémem elektromagnetických čoček dostávají do kvadrupólového detektoru. Zde jsou analyzované **ionty vedeny takovým způsobem, aby na povrch zesilovače dopadly v daném časovém okamžiku pouze ionty se zvolenou hmotností.**

Instrumentální metody: ICP-MS

Inductively coupled plasma – mass spectrometry



Argonový hořák



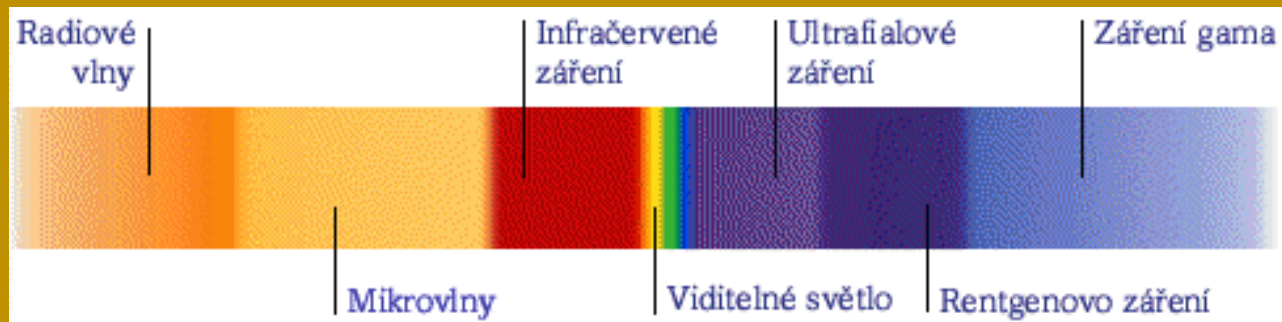
Hmotnostní detektor

Spektrofotometrické metody: absorpce tepelného záření – IČ (IR) spektrometrie

IČ („infrared“) spektrofotometrie je založena na interakci elektromagnetického záření o **vlnočtu** (ν), 10 až 10 000 cm^{-1} s měřeným vzorkem.

Záření o této vlnové délce ($\nu = 1/\lambda$), tj. tepelné záření, je absorbováno molekulami látky, přičemž dochází k vibračním resp. rotačním molekul.

Mluvíme o vibračně-rotačních molekulových spektrech.



Spektrofotometrické metody: absorpce tepelného záření – IČ (IR) spektrometrie

- IR spektra dají informace o přítomnosti funkčních skupin.
 - Lze je využít i pro identifikaci látky porovnáním jejich spekter se spektry standardu.
 - Pro kvantitativní účely lze využít Lambert-Beerův zákon.
-
- Vibrace valenční – ve směru vazby sem a tam
 - Vibrace deformační – mění se úhel vazby
 - Rotace – skupina či část molekuly se otáčí
 - Výsledek = součet všech překrývajících se vibrací, komplikovaná spektra

Spektrofotometrické metody: absorpce tepelného záření – IČ (IR) spektrometrie

- Zdroj záření: tuhé zářiče z polovodičů (karbid křemíku) + mřížka
- Měrná kyveta: okénka z NaCl (kapaliny, roztoky v CCl₄ nebo nujolu)
- slisovaná tableta KBr (pevné látky)
- Detektor: termočlánek



Spektrofotometrické metody: absorpce tepelného záření – IČ (IR) spektrometrie

IR spektrum je závislost transmitance (T, %) na vlnočtu (ν , cm^{-1})

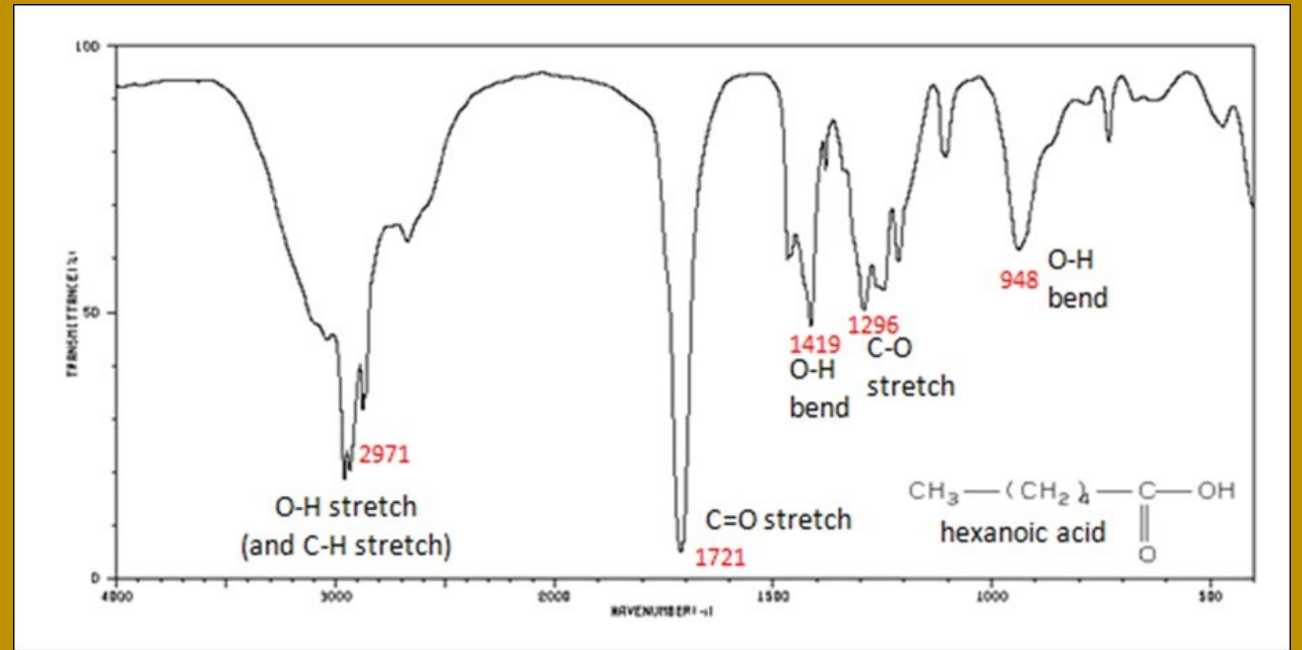
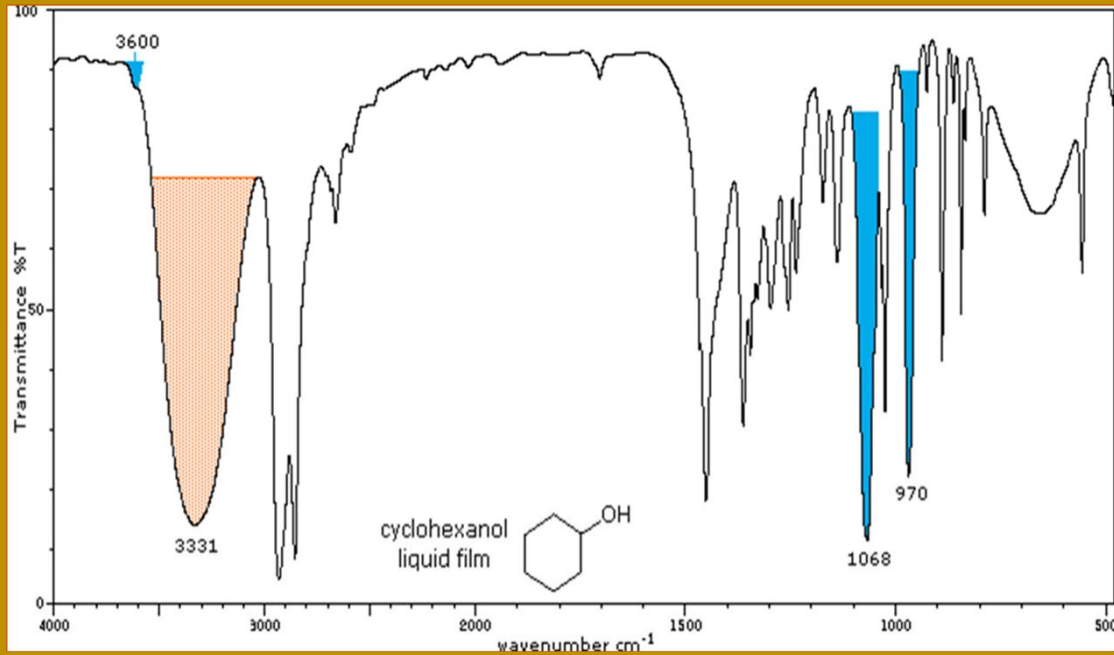
Reálně se měří v oblasti 400 – 4 000 cm^{-1}

Základem kvalitativní IR spektrofotometrie je přiřazení jednotlivých absorpčních pásů charakteristickým vibracím molekul.

Základem kvantitativní IR spektrofotometrie je Lambert-Beerův zákon (místo A se používá integrovaná plocha píku)

Skupina	ν , cm^{-1}
-OH	3600-3650
-NH ₂	3370-3420
-H aromat.	3000-3080
-SH	2580
C=O	1700-1770
-NH ₂	1590-1650
C=S	1100
C-Cl	600-800

Spektrofotometrické metody: absorpce tepelného záření – IČ (IR) spektrometrie



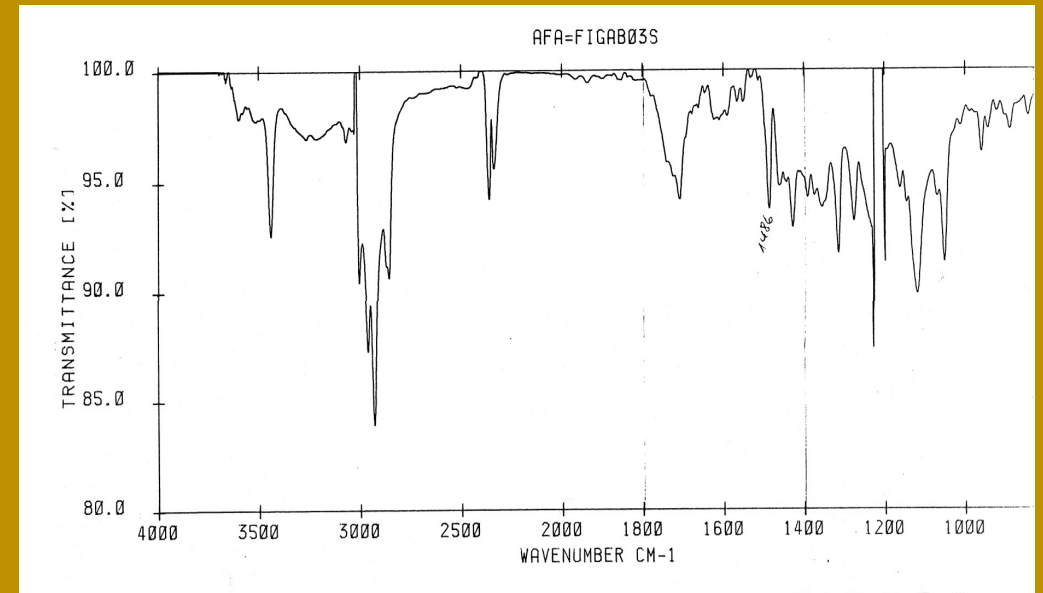
Oblast mezi 400 a 1000 cm^{-1} : valenční vibrace těžších atomů (C-X) a deformační vibrace C-H vazeb

Oblast mezi 1000 a 1350 cm^{-1} : valenční a deformační vibrace C-C, C-N a C-O vazeb (oblast otisku prstu)

Oblast mezi 1350 a 4000 cm^{-1} : valenční vibrace vodíku (Y-H)

Spektrofotometrické metody: absorpce tepelného záření – IČ (IR) spektrometrie

- Analýza otisků prstů
- Molecular Spectroscopy for Forensics
- Ruční spektrometry pro rychlou analýzu drog, výbušnin a prekurzorů jejich výroby
- Analýza inkoustů pomocí zobrazovací FT-IR ATR
- Stanovení koncentrace ozonu
- Identifikace Novičoku 4. generace
- Evidence stop na místě činu (vlákna, laky, textil, atd.)
- Analýza padělků různých typů (pigmenty, barviva, gemologie, atd.)



Tolik na rozloučenou s IR spektrometrií a teď z tepla do zimy!

Instrumentální techniky analýzy chemických látek

Spektrofotometrie v UV a VIS

Atomová absorpční a emisní spektrometrie

ICP-MS

Infračervená spektrofotometrie

PIXE

Nukleární magnetická rezonance

Hmotnostní spektrometrie

Elektronová mikroskopie spojená s analýzou EDAX

Základní elektrochemické techniky

Chromatografie

Instrumentální metody: PIXE

Metoda PIXE je prakticky nedestruktivní citlivá metoda studia prvkového složení látek.

Měření probíhá nejčastěji ve vakuové komoře. Vzorek je

bombardován **svazkem** urychlených iontů, nejčastěji **protonů**.

Princip metody spočívá v tom, že při průletu iontu vzorkem je z některé vnitřní energetické hladiny (K nebo L) některého atomu

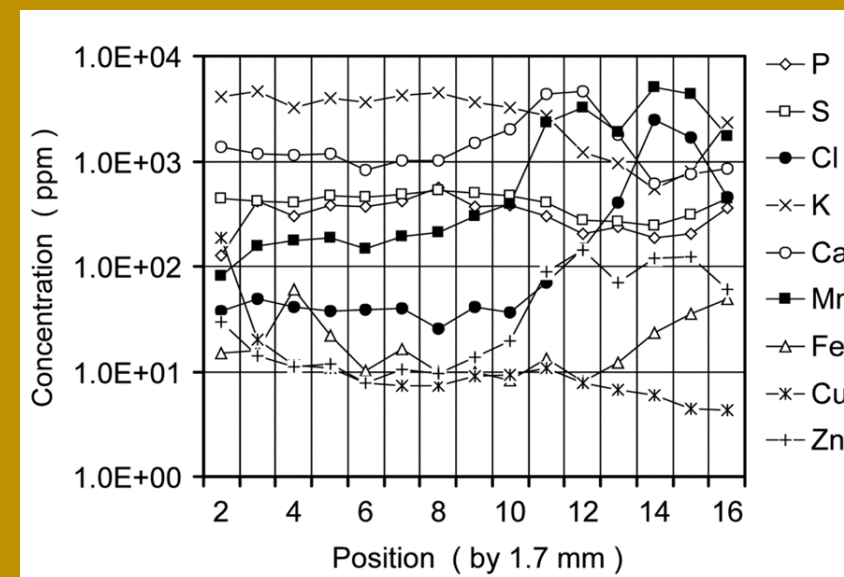
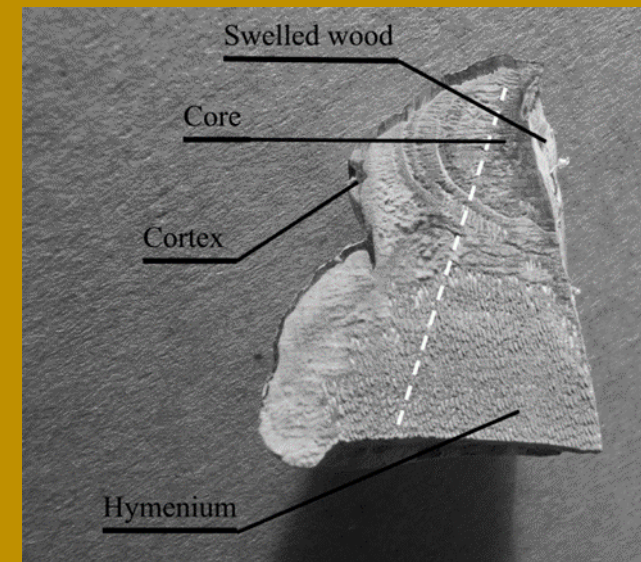
vyražen elektron a na jeho místo "přeskakuje" jiný elektron z

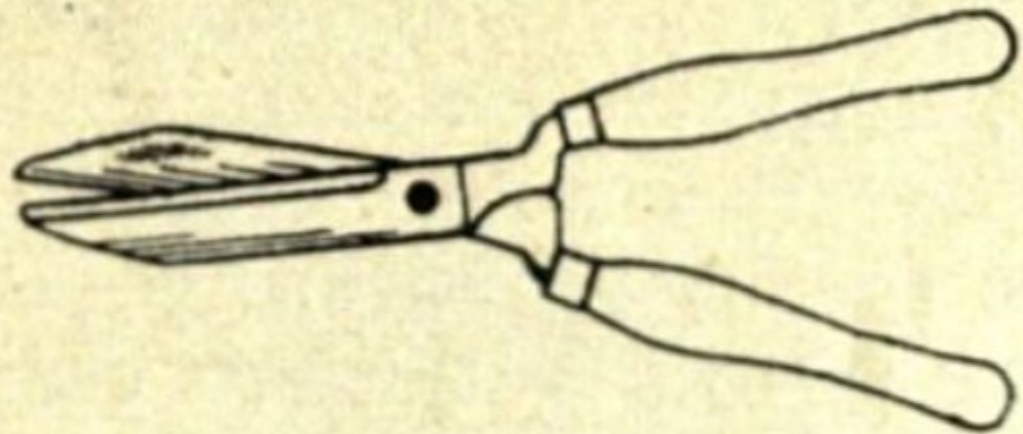
hladiny vyšší. Při tomto "přeskoku" je s určitou pravděpodobností vyzářen foton o energii rovné rozdílu energií hladin, mezi kterými

došlo k přeskoku. Jelikož každý prvek má svoje vlastní charakteristické uspořádání energetických hladin, dá se z

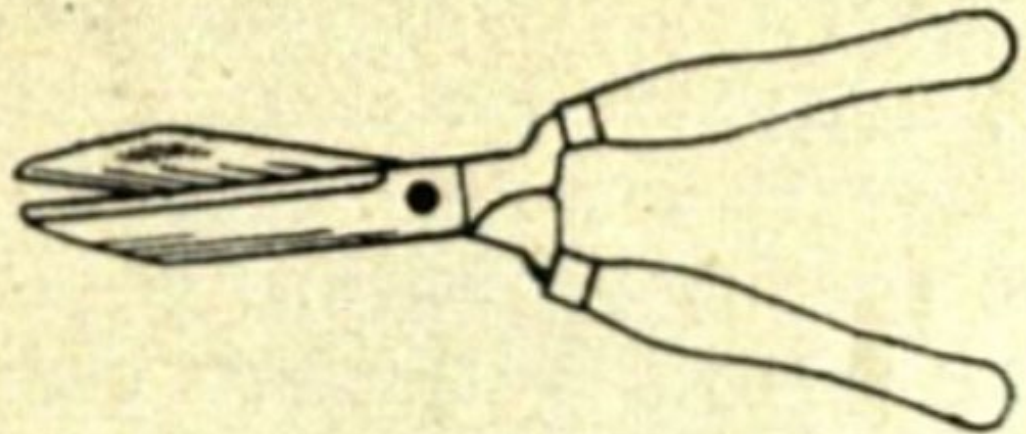
naměřených energií takto vzniklých fotonů **zjistit, z jakého prvku** fotony pocházejí.

Ale kde opatříme protony?



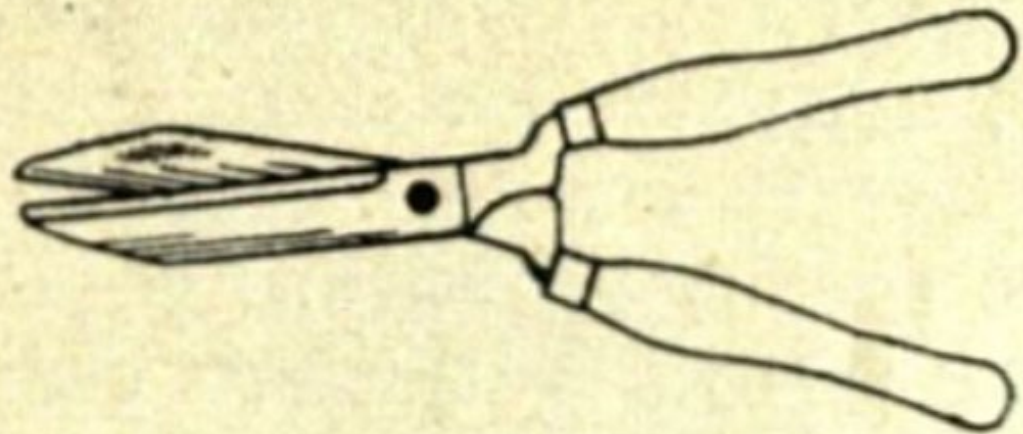


Č. 2916. Nůžky na křoví.



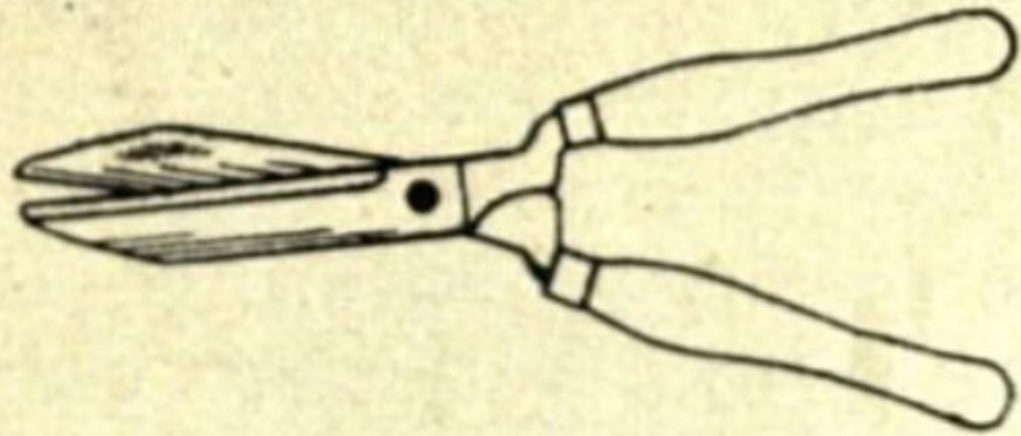
Č. 2916. Nůžky na křoví.





Č. 2916. Nůžky na křoví.



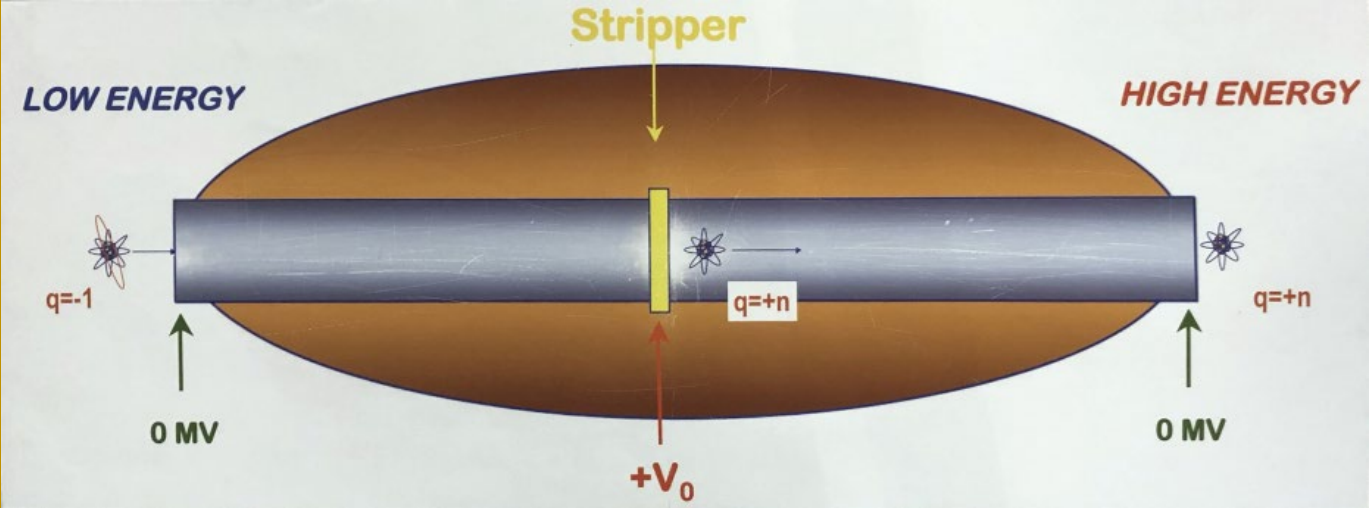


Č. 2916. Nůžky na křoví.

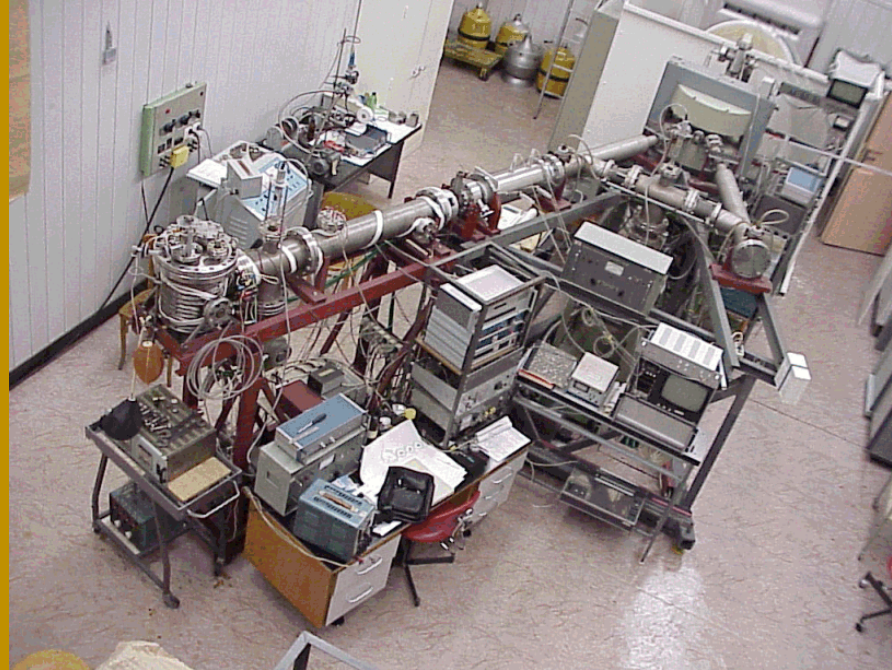
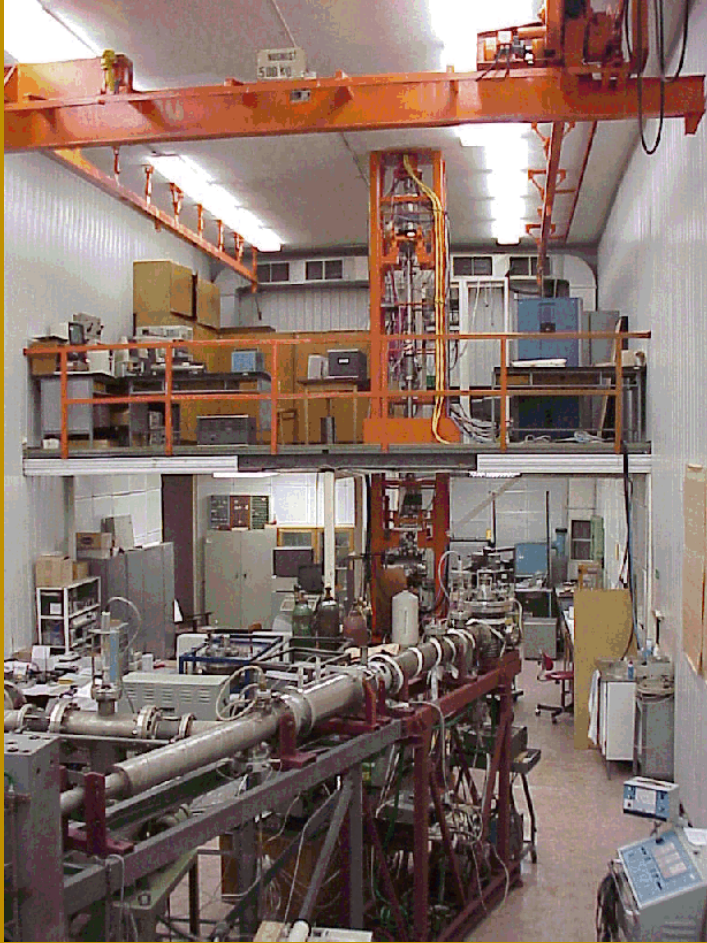


Ebonite or hard rubber is mainly made of natural rubber (NK) and sulphur (S). A mixture of natural rubber and sulphur is melted in a furnace. The molten mixture is then poured into a desired metal form and heated to approx. 200°C for approx. 15 minutes for vulcanization. To improve the cross-linking of the materials being used, the mould is removed and the semi-finished product is subjected to further cycles of heating and cooling. Thereby ebonite receives its high density and resistance.

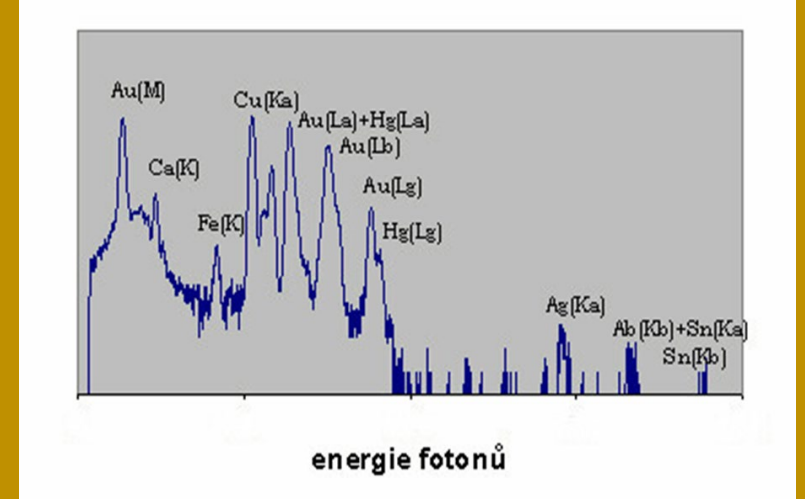
Van de Graafův generátor vysokého napětí statické elektřiny



Instrumentální metody: PIXE (proton induced X-ray emission)



měřicí aparatura



měřicí komora

Spektra NMR nukleární magnetická rezonance

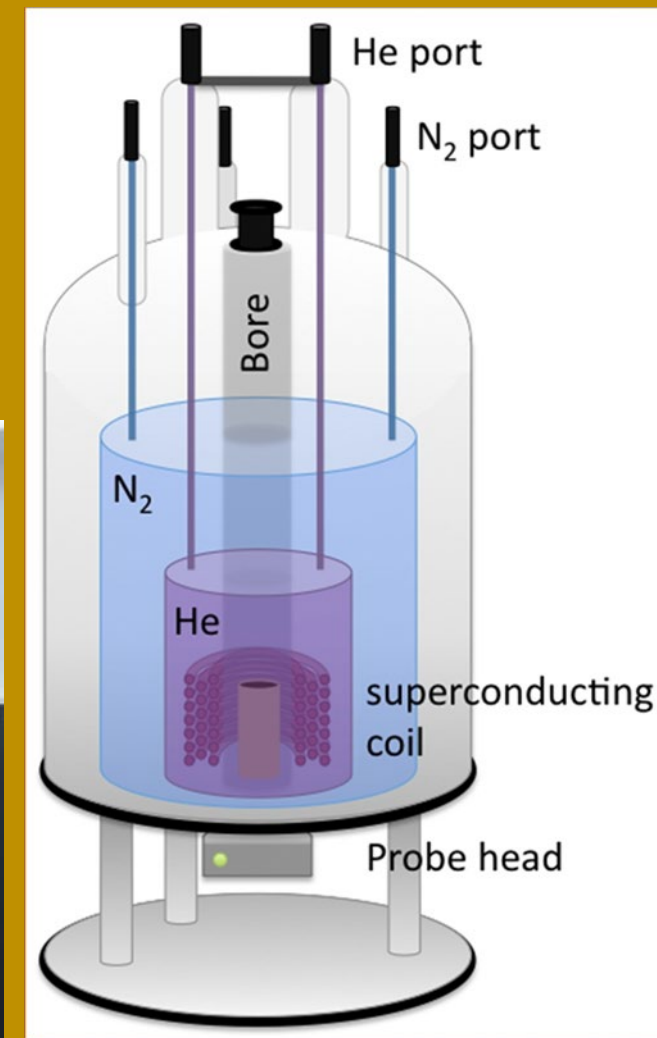
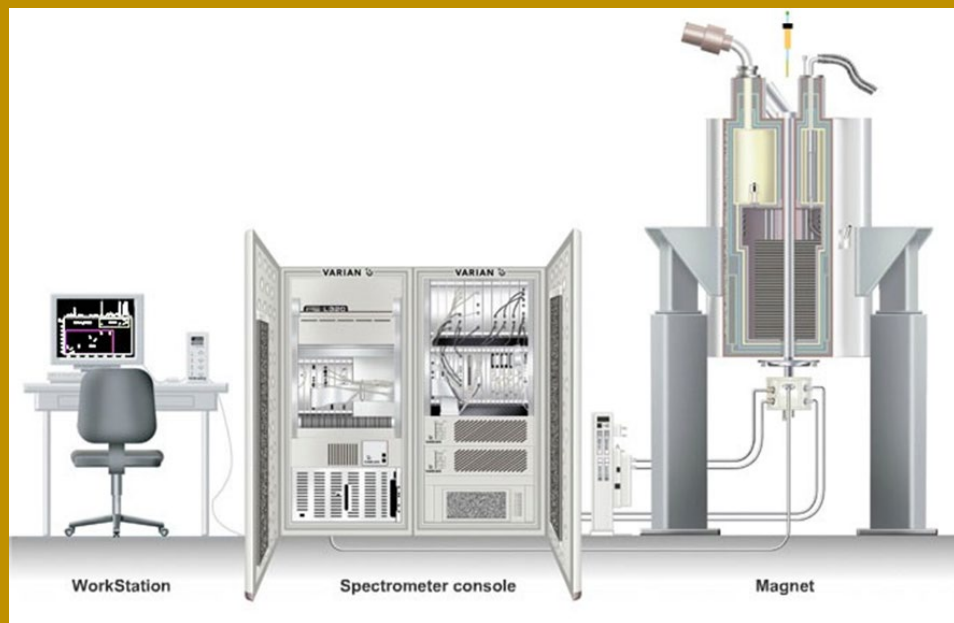
Metoda NMR využívá chování některých atomových jader umístěných v silném magnetickém poli při interakci s vysokofrekvenčním elmag zářením. Výsledkem je elmag signál v oblasti spektra rádiových vln (MHz).



Spektra NMR nukleární magnetická rezonance

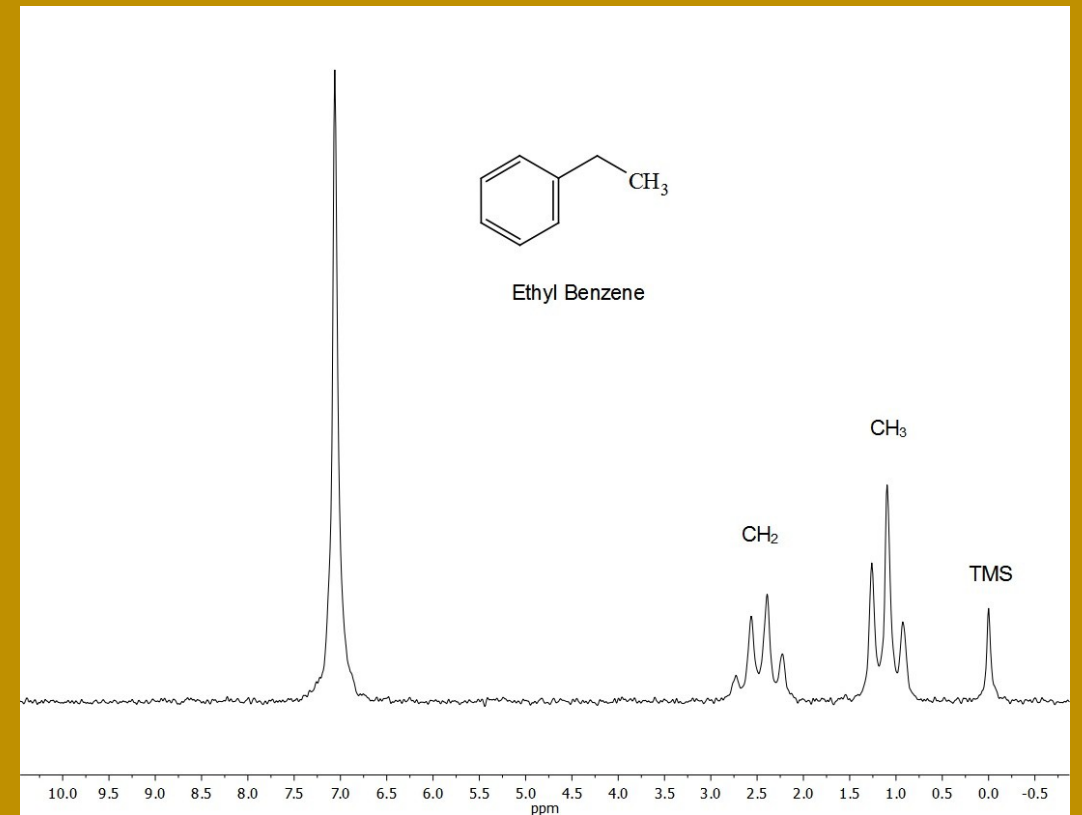
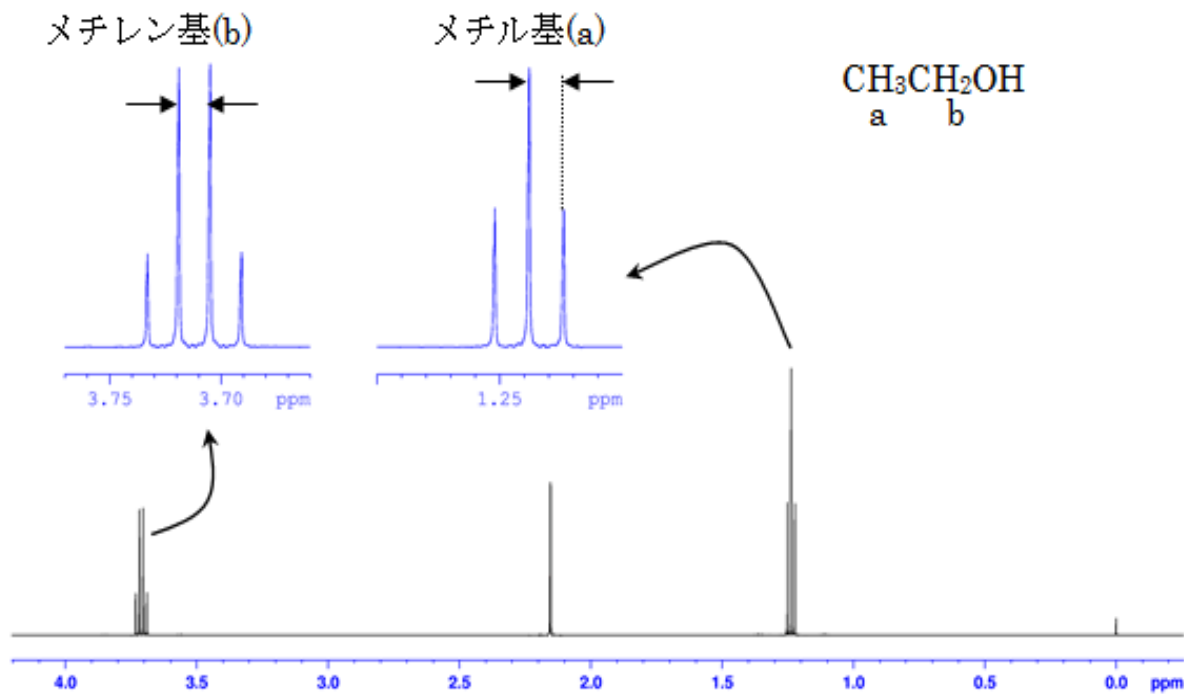
Lze ji použít pro měření látek s atomovými jádry s lichým hmotnostním nebo atomovým číslem.

Nejběžnější a největší význam pro strukturní analýzu mají ^1H a ^{13}C – tedy v analýze organických látek.



Spektra NMR nukleární magnetická rezonance

スピン結合定数 (7.1 Hz, 矢印間)



Informace o umístění protonů v molekule (včetně konformace)
Informace o umístění uhlíkových atomů v molekule (včetně konformace)
Informace o přítomnosti a počtu funkčních skupin

Hmotnostní spektrometrie – MS

Princip: z elektroneutrálních molekul se v ionizační komoře vytvoří **molekulární ionty**, které se mohou dále při přebytku energie rozpadat. Směs fragmentů je v silném elektrickém poli urychlena a je dále vedena do homogenního magnetického pole. V něm dochází k **zakřivení drah** jednotlivých částic podle svých efektivních hmotností (m/e)

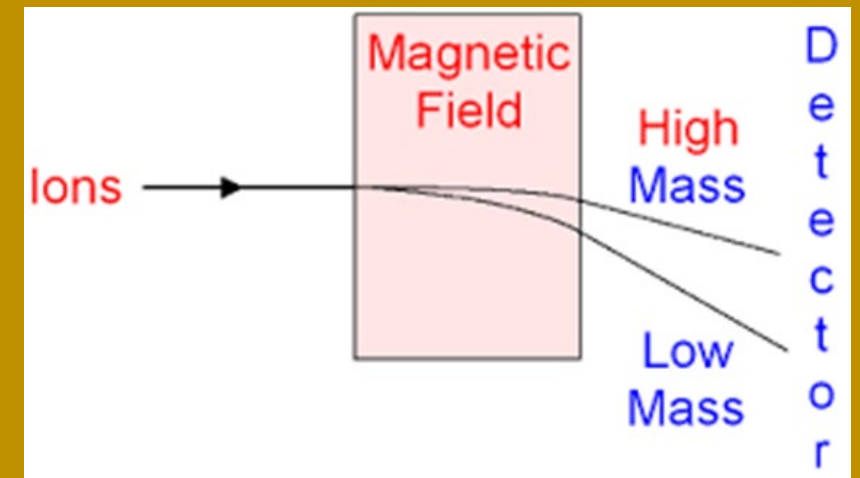
m hmotnost částice e elementární náboj

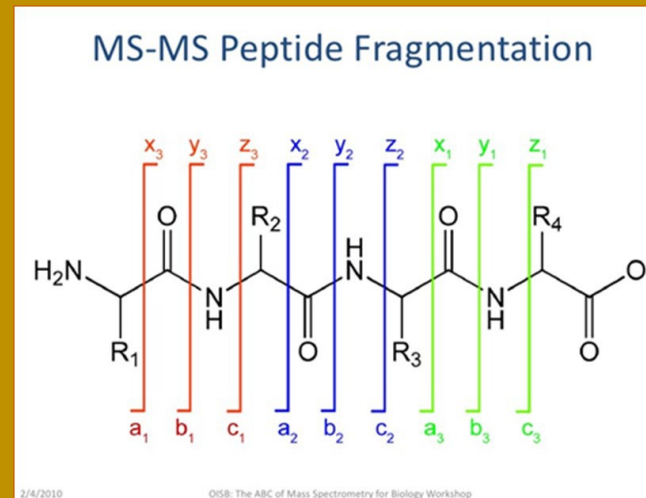
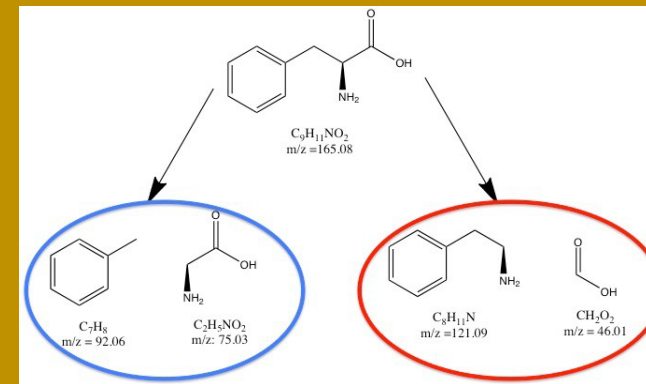
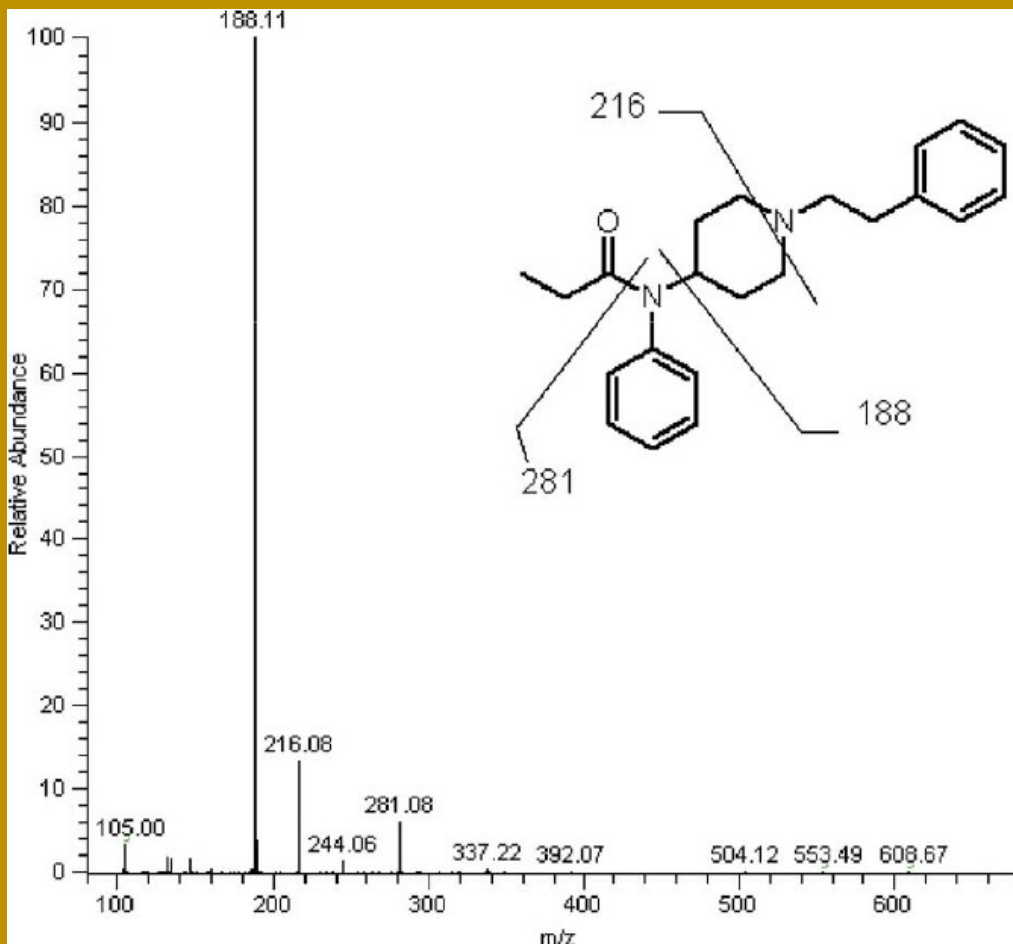
Částice dopadají na detektory, intenzita signálu je úměrná počtu dopadlých částic.

MS spektrum: intenzita signálu (%) vs. m/e

Způsoby ionizace:

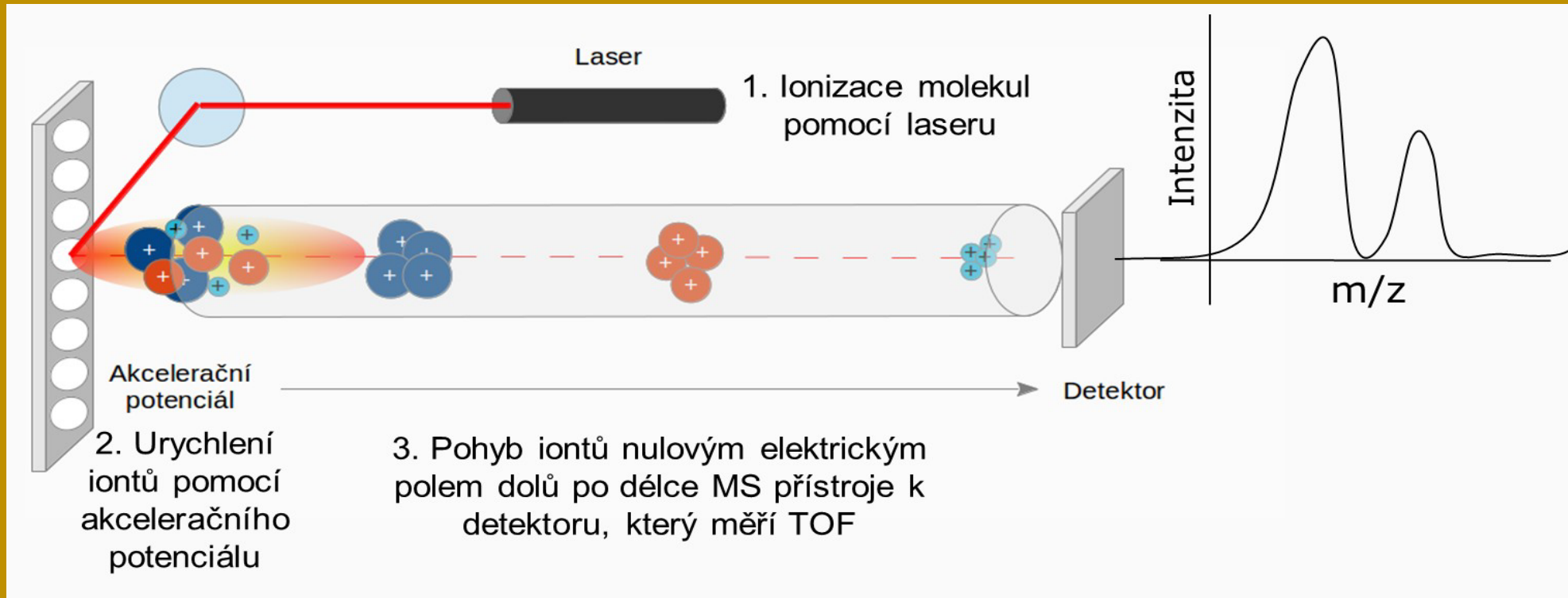
- nárazem elektronů (EI)
- ionizace elektrostatickým polem
- chemická ionizace (CI)
- laserová desorpce (MALDI)





Příklady fragmentace malých molekul a makromolekul; MS technikou lze detekovat molekuly až o velikosti 1 milionu m/z (např. dokonce celé virové částice)

Hmotnostní spektrometrie – MS



Hmotnostní spektroskopie MALDI byla původně vyvinuta pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, avšak nyní se využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Výhodou je vysoká citlivost a rychlost měření. Při analýze se vzorek nerozpadá, což umožňuje měření složitějších směsí, zanedbatelný je i vliv pozadí.

Hmotnostní spektrometrie – MS

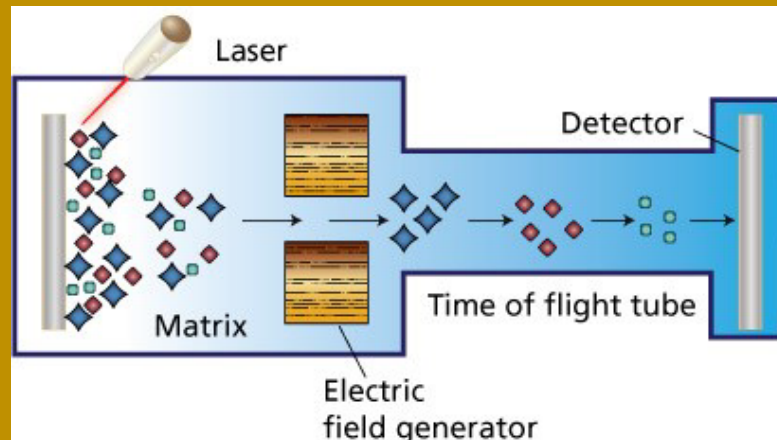
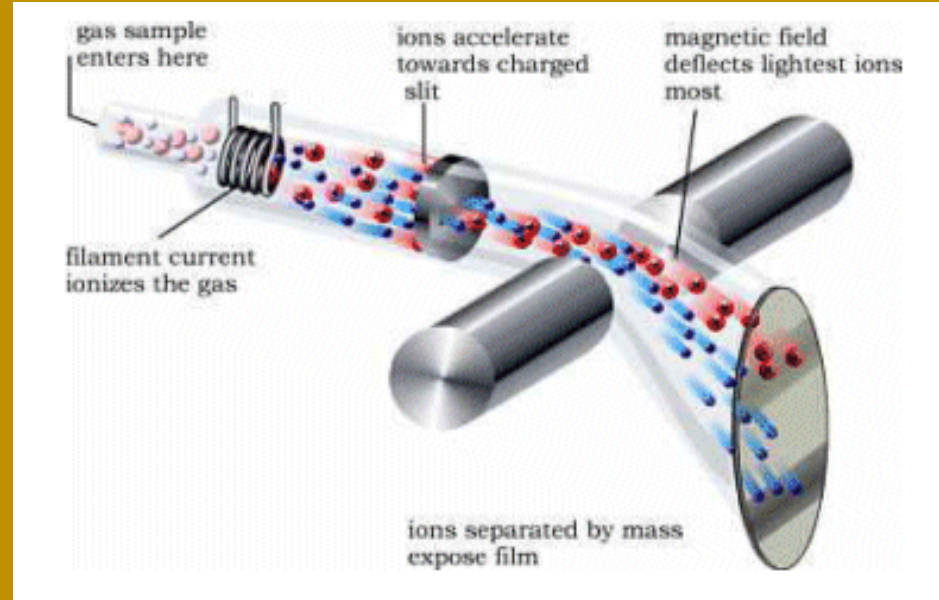
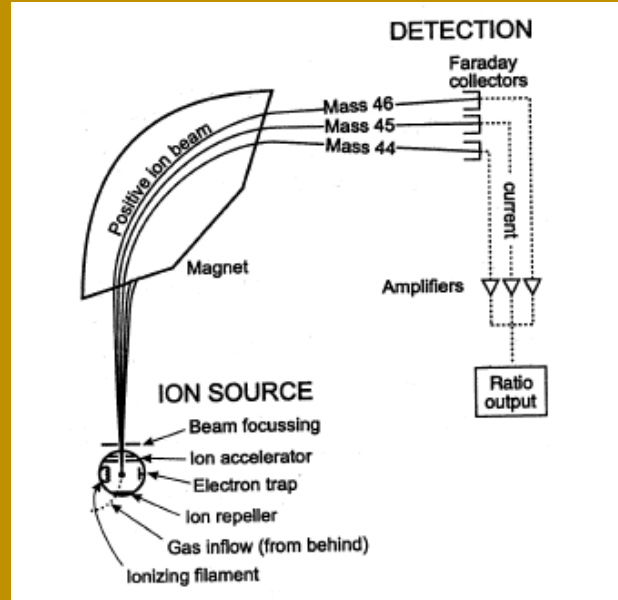


Schéma klasického MS spektrometru (nahore) a MS spektrometru „MALDI-TOF“ (dole vlevo)
Pro proteiny: matrice obsahuje kyselinu skořicovou

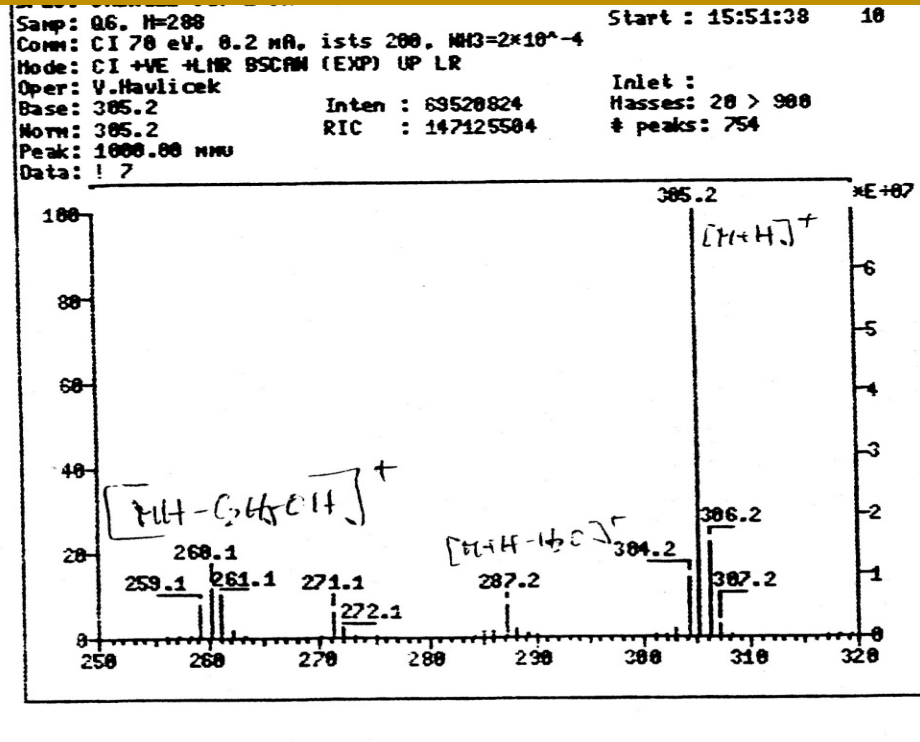
Hmotnostní spektrometrie – MS

Příklad spektra (Q6), MW 304

Molekulový ion (M+H) 305 Molekulový ion – H₂O

$$305 - 18 = 287$$

Molekulový ion – CH₃CH₂OH 305 - 46 = 259



EDAX – prvková analýza pod elektronovým mikroskopem



První československý elektronový mikroskop (1950)



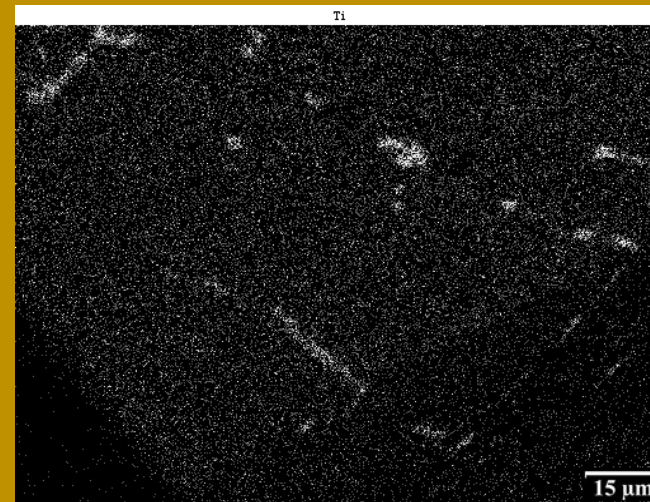
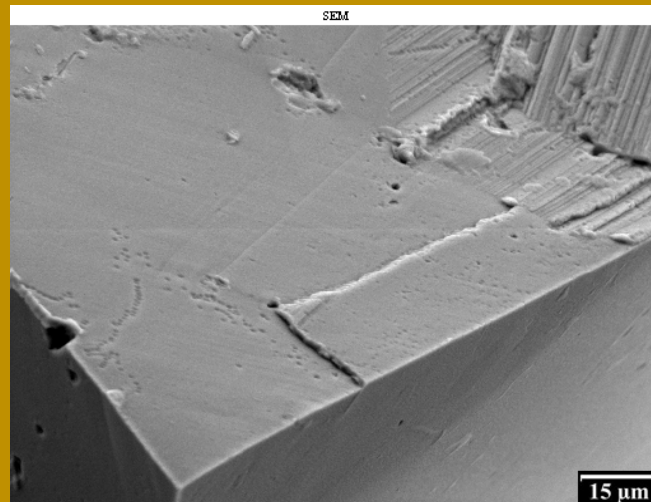
Experimentální prozařovací elektronový mikroskop
– 100 kV (L. Zobač, V. Drahoš, J. Speciální a sedící A. Delong) 1954

EDAX – prvková analýza pod elektronovým mikroskopem



EDAX – prvková analýza pod elektronovým mikroskopem

Jde o spojení elektronové mikroskopie a „energie disperzního analyzátoru“



Lopatka leteckého motoru, rozdělení titanu

<http://fyzport.fjfi.cvut.cz/Akce/FT/03/sbpdf/matvyzk.pdf>

Tento materiál je určen pouze pro výuku studentů.

This presentation has been scheduled for educational purposes only.

Pokud má někdo dojem, že použité obrázky (jiné než moje vlastní) jsou kryty copyrightem, necht' mi dá vědět.

If somebody believes, that pictures or figures in this presentation are covered by copyright, please let me know.

Jiří Gabriel (gabriel@biomed.cas.cz)