

Analizne metode v karakterizaciji materialov in bioloških sistemov

Optične spektroskopske tehnike

H. Prosen, FKKT UL

Optične spektroskopske tehnike

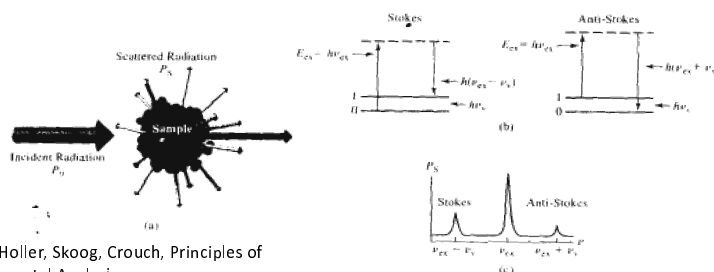
- atomska absorpcijska spektroskopija (AAS)
- atomska emisijska spektroskopija (AES)
- rentgenska (X-žarkovna) fluorescenca (XRF)
- molekulska absorpcija v UV/Vis (MAS)
- molekulska luminiscenca v UV/Vis
- infrardeča spektroskopija (IR)
- Ramanska spektroskopija ✓
- jedrska magnetna resonanca (NMR)

- sklopitve spektroskopskih in separacijskih tehnik ✓

- nevtronska aktivacijska analiza (NAA) ✓

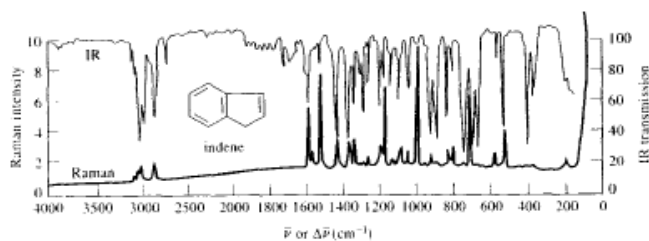
Ramanska spektroskopija v analitiki

- princip: neelastično sipanje svetlobe na delcih; v sipanega emv deloma enaka v vpadnega emv (Rayleighovo sipanje), deloma pri manjših ν (Stokesove črte), deloma pri večjih ν - manj intenzivne (anti-Stokesove črte)
- prehodi v območju 0,78-300 μm (vibracijska in rotacijska stanja)



Slika: Holler, Skoog, Crouch, Principles of Instrumental Analysis

- uporabno za identifikacijo spojin, komplementarno IR spektroskopiji
- dodatne informacije o strukturi iz depolarizacije sipane svetlobe (emv vira polarizirano – laser)
- prednosti pred IR: lahko uporabljamo vodo kot topilo, steklo in kvarc za dele inštrumenta



Primerjava IR in Ramanskega spektra za inden.

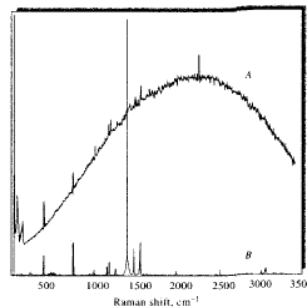
Slika: Holler, Skoog, Crouch, Principles of Instrumental Analysis

Kvantitativna analiza

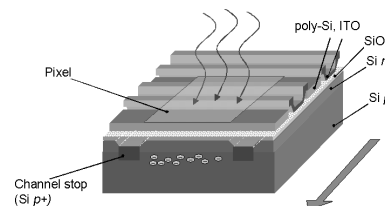
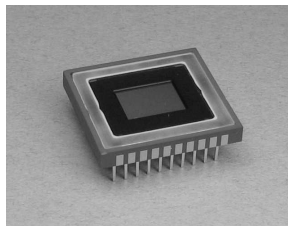
- v analitiki izhajamo iz izraza $I_{sc} = k \cdot c$
- I_{sc} majhne, $<0,001\% I_0 \Rightarrow$ potreben vir emv z veliko intenziteto in občutljiv detektor (npr. CCD)
- za koncentracije $>0,1$ M
- vir svetlobe: laser (polarizirana svetloba) – Ar (488,0 in 514,5 nm), Kr (530,9 in 647,1 nm), He-Ne (632,8 nm), dioda (785 in 830 nm), Nd-YAG (1064 nm)

Ramanski spekter antracena pri uporabi Ar laserja (514,5 nm) – A; in Nd-YAG laserja (1064 nm) – B.

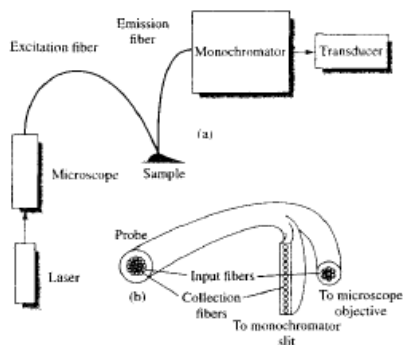
Slika: Holler, Skoog, Crouch, Principles of Instrumental Analysis



- CCD senzor (angl. *charge coupled device*) – izvedba fotodiode, ki lahko shranjuje naboj (e^-), zato višje razmerje S/N

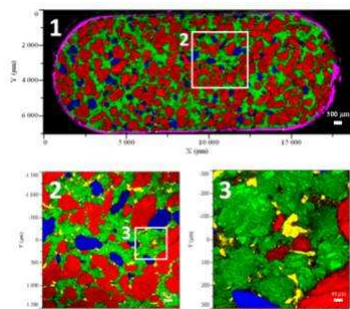


- vzorec: plinasti ali tekoči v celicah, trdni v KBr tabletah
- geometrija spektrometra: intenziteto sipane svetlobe merimo pravokotno na smer vzbujevalnega žarka



Ramanski spektrometer s probo iz optičnih vlaken za mikrovzorke.

Slika: Holler, Skoog, Crouch, Principles of Instrumental Analysis



Porazdelitev zdravilne učinkovine v tableti.

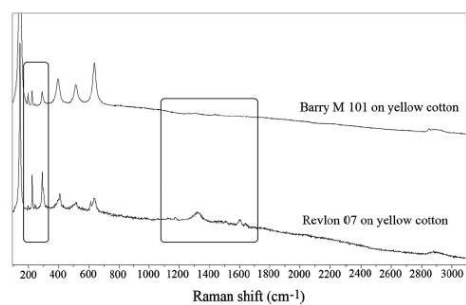


Fig. 7 Figure comparing the spectra of Barry M 101 and Revlon 07 on yellow cotton, analysed using the 633 nm (red) laser. The main points of difference between the two spectra are marked.

Detekcija različnih vrst rdečila za ustnice na tekstilu.

Vir: Salahioglu *et al.*, *Anal. Methods* 5 (2013) 5392.

Drugi tipi Ramanske spektroskopije:

- resonančna Ramanska spektroskopija: λ_{exc} je zelo blizu elektronskemu prehodu analita \Rightarrow Ramanske črte bolj simetričnih vibracij se ojačijo za faktor 10^2 - 10^6 , možno zaznati veliko nižje koncentracije (do 10^{-8} M)
- površinsko ojačana Ramanska spektroskopija (angl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS): pri adsorpciji vzorca na koloidne kovinske delce se intenziteta Ramanskih črt poveča za faktor 10^3 - 10^6
- nelinearna Ramanska spektroskopija

Sklopitve separacijskih in spektroskopskih tehnik

- sklopitev (angl. *hyphenation*, iz *hyphen*, vezaj (-)): povezava dveh različnih analiznih tehnik preko ustreznega vmesnika (angl. *interface*)
- namen: hitrejša, bolj učinkovita analiza
- večinoma povezava separacijske tehnike s spektroskopsko tehniko
- GC-MS, LC-MS, CE-MS, TLC-MS, (MS/MS)...
- dvodimenzionalna separacija: GCxGC, LCxLC, GCxLC...
- GC-IR, GC-AED, LC-IR, LC-NMR...

GC-IR

Prednosti:

- analitov med analizo ne uničimo
- dobro ločuje med strukturnimi izomerami
- daje direktne informacije o funkcionalnih skupinah

Slabosti:

- disperzijski IR (uklonski element) preveč počasni in premalo občutljivi za sklopitev z GC; danes samo FTIR
- zaradi višjih mej zaznave manj primerni za analizo sledov
- slabša identifikacija homologov

Uveljavlja se tudi GC-MS-FTIR: zaporedna vezava ali paralelna (cepitev eluenta iz GC: 90-99 % v IR).

Vmesniki za GC-IR

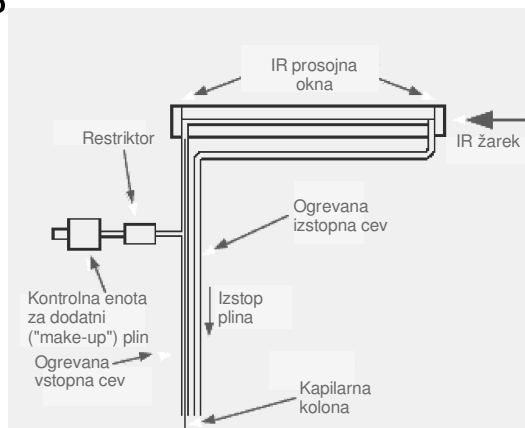
- v srednjem IR območju (λ 2,5-50 μm oz. $\bar{\nu}$ 200-4000 cm^{-1}) so nosilni plini za GC (He, N₂, H₂) transparentni; če jih odstranimo, je to z namenom koncentriranja analitov

Vmesnik na pretočno celico

(angl. *flow-through cell* ali *lightpipe*): okna iz KBr ali ZnSe, dimenzije 10-20 cm x 1 mm (V 50-200 μL) za kapilarne kolone.

Prednosti: "real-time"

Slabosti: spektri v plinski fazi, slabe LOD





Moderni GC-FTIR inštrument s pretočno celico.

Vmesnik s hladno pastjo (angl. *cold trap*) – redkeje v uporabi;
depozicija eluiranih spojin iz GC kolone na ZnSe ploščo, hlajeno s
tekočim dušikom (77 K), ki se pomika v IR žarek majhnega
premera ($\approx 100 \mu\text{m}$)

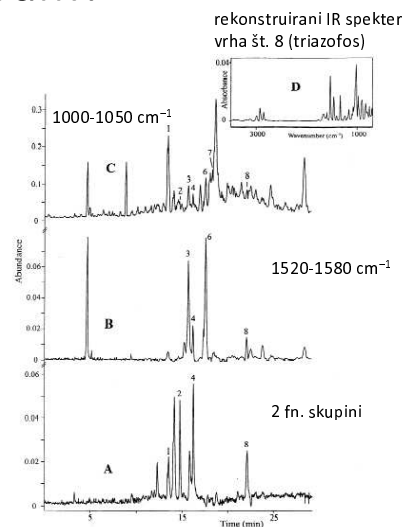
Prednosti: IR spektri spojin v kondenzirani fazi; občutljivost
primerljiva z GC-MS

Slabosti: zelo hlapne spojine ne kondenzirajo; približno “real-time”

Kako pretvoriti IR odziv (spekter) v kromatogram?

Gram-Schmidt (GS) algoritem:
upošteva absorpcijo v celotnem
izbranem IR območju –
detektiramo praktično vse
analite, a z različno občutljivostjo;
GS kromatogrami

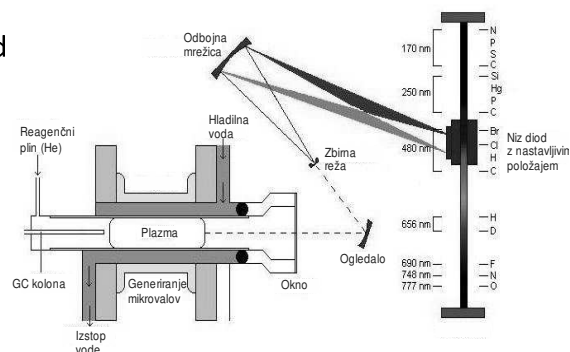
Intenziteta absorpcije le v določenih
spektralnih področjih, značilnih
za neke funkcionalne skupine –
bolj selektivno; FG (*functional
group*) kromatogrami



GC-FTIR kromatogram onesnaževal v vodi.
Vir: Vreuls *et al.*, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 279.

GC-AED (*atomic emission detection*)

- eluent iz GC uvajamo v plazmo: ICP, pogosteje MP s helijem
- za analite potekajo različne rkc: ionizacija, atomizacija (pri $T > 3000\text{ K}$ 100 %)
- vzbujeni atomi, ioni, molekule sevajo emv pri karakterističnih λ
- uporaba polikromatorja in detektorja na niz diod
⇒ tridimenzionalni kromatogram (t_R, λ, I)

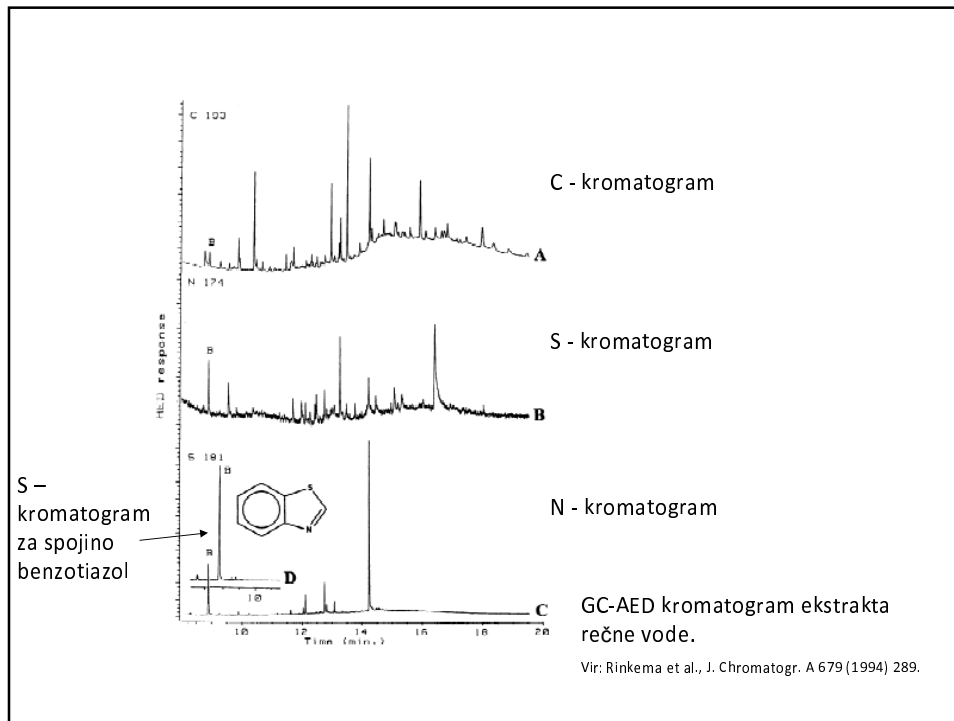


Prednosti:

- elementno specifična detekcija ⇒ kalibracija neodvisna od spojine; lahko določimo elementno sestavo spojine (spekter pri nekem t_R)
- izjemna selektivnost in občutljivost za heteroelemente nasproti C ($>10^3$)
- določimo lahko skoraj vse elemente in nekatere stabilne izotope (^2D , ^{13}C , ^{15}N ...)

Slabosti:

- plazma ne prenese večjih količin C-spojnin ⇒ potreben ventil za preusmeritev eluata topila
- LOD zelo odvisne od elementa, slabše za halogene, kisik, Ga
- obvezno He kot nosilni plin za GC
- hkrati lahko spremljamo le elemente z emisijskimi črtami blizu skupaj ($\approx 25\text{ nm}$)



LC-(FT)IR

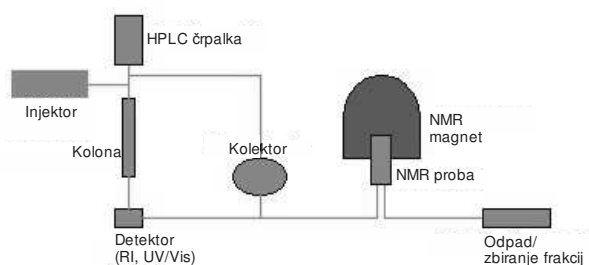
- zelo težavna sklopitev zaradi močne absorpcije mobilne faze v IR (zlasti pri RP LC) \Rightarrow gledamo samo izbrane dele spektra ali pa potrebno odstraniti MF
- vmesnik na pretočno celico: preprost in cenen; a zelo slabi LOD (0,1-1 μ g); neuporaben za spektralno območje absorpcije MF; samo izokratska elucija; "real-time" snemanje kromatogramov ni možno, rekonstrukcija z odštevanjem spektra MF
- odstranjevanje MF: eluent nanašamo na KBr prašek (v posodicah ali na tekočem traku, odparimo MF pod tokom plina, snemamo IR spekter z difuzno reflektanco

SFC-FTIR: enostavna odstranitev MF (odparitev v restriktorju)

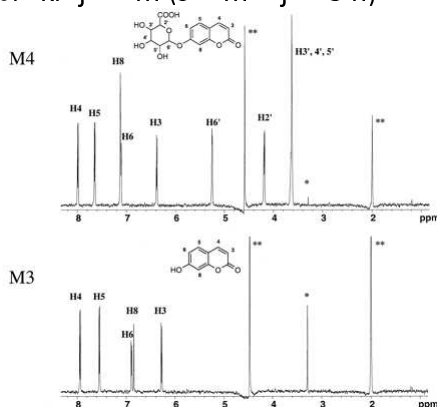
CE-FTIR: majhni pretoki MF \Rightarrow lažja odstranitev

LC-NMR

- problemi sklopitve: za NMR potrebne večje količine spojine; običajna LC topila neuporabna; NMR "počasna"
- NMR proba: pretočna celica 2-4 mm i.d.
- dodatni detektor za zaznavo spojin: zlasti pri "stop-flow" načinu
- trije načini snemanja: stalni pretok (potrebna velika količina analita), prekinjeni pretok (*stop-flow*) – daljši čas snemanja, manjša količina analita, zbiranje frakcij v kapilarne zanke v kolektorju

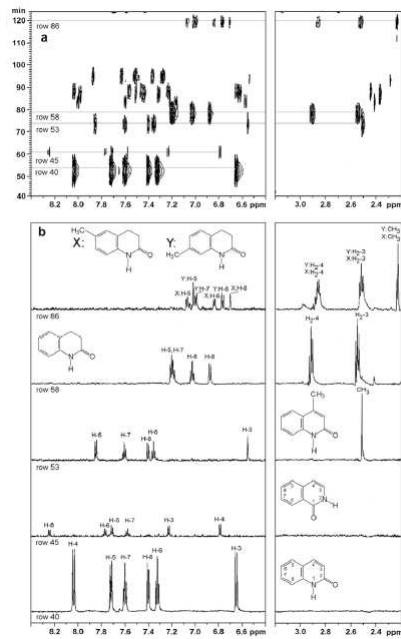


- topila: uporaba aprotičnih topil (za ^1H NMR), npr. Freoni, D_2O ; supresija signala za topilo v modernih inštrumentih z adaptivno ekstrapolacijo na podlagi predhodnega zajema spektra
- tipične LOD (^1H): 1-10 μg pri stalnem pretoku, 0,2-1 μg pri prekinjenem (snemanje ≈ 3 h)



Primer: LC-NMR karakterizacija dveh metabolitov spojine 7-etoksikumarina v jetih.

Vir: Fisher *et al.*, *Drug Metab. Disp.* 30 (2002) 270-275.



N-heterocikli iz podtalnice,
 onesnažene s katranskim oljem z LC-
 $(^1\text{H})\text{NMR}$
 Vir: Reineke *et al.*, *Chemosphere* 70 (2008)
 2118-2126.

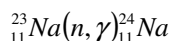
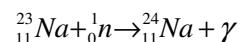


Moderni LC-SPE-NMR/MS inštrument proizvajalca Bruker.

Nevtronska aktivacijska analiza (NAA)

- princip: merimo radioaktivnost, ki smo jo inducirali v vzorcih z nevtroni (n^0) ali nabitimi delci (H^+ , D^+ , ${}^3He^+$)
- najbolj običajna uporaba termičnih (počasnih) n^0 : pridobimo z upočasnitvijo (termalizacijo) visokoenergetskih n^0 iz vira z moderatorjem (H_2O , D_2O , parafin)
- za aktivacijo lažjih elementov (N, O, F, Si) potrebni hitri n^0 iz pospeševalnikov (14 MeV)
- n^0 nestabilni, $t_{1/2}$ 12,5 min, razpadejo na p^+ in e^-
- zajem nevtrona: nastane nov izotop v visoko vzbujenem stanju (~ 8 MeV), ki se relaksira z emisijo γ -žarka ali delca; primer:

kar zapišemo:



Hitrost rdkd razpada

- za posamezno jedro ne moremo napovedati, kdaj bo razpadlo (slučajen proces). Pri velikem številu jeder velja kinetika 1. reda:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda \cdot t$$

N ... število jeder

t ... čas

λ ... konstanta razpada za nek izotop

- z integracijo po času ($t = 0 - t$) dobimo: $N = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$

- definiramo še razpolovni čas (razpolovna doba): $t_{1/2} = \tau = \frac{\ln 2}{\lambda}$

- aktivnost A radionuklida definiramo kot hitrost razpada: $A = -\frac{dN}{dt} = \lambda \cdot t$
enota: s^{-1} ali Bq (becquerel); stara enota Ci (curie) – aktivnost 1 g ${}^{226}Ra$
1 Ci = $3,70 \cdot 10^{10}$ Bq

- namesto aktivnosti običajno merimo hitrost štetja R :

$$R = c \cdot A = c \cdot \lambda \cdot N \quad R = R_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

c ... koeficient detekcije

Aktivacija z nevtroni:

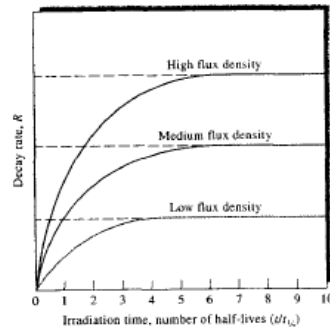
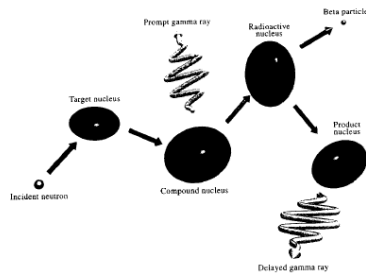
- hitrost nastajanja rdkd izotopa: $\frac{dN^*}{dt} = N \cdot \Phi \cdot \sigma$
- hitrost razpada nastalega izotopa: $-\frac{dN^*}{dt} = \lambda \cdot N^*$
- skupna hitrost nastajanja: $\frac{dN^*}{dt} = N \cdot \Phi \cdot \sigma - \lambda \cdot N^*$
- po integriranju: $N^* = \frac{N \cdot \Phi \cdot \sigma}{\lambda} \left[1 - e^{-\frac{t \cdot \ln 2}{t_{1/2}}} \right]$
- izrazimo aktivnost: $A = \lambda \cdot N^* = N \cdot \Phi \cdot \sigma \left[1 - e^{-\frac{t \cdot \ln 2}{t_{1/2}}} \right] = N \cdot \Phi \cdot \sigma \cdot S$
- oziroma zapišemo kot hitrost štetja: $R = N \cdot \Phi \cdot \sigma \cdot c \cdot S$

Φ ... tok n^0 v $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$
 σ ... zajemni presek v cm^2/atom ali b (barn; $1 \text{ b} = 10^{-24} \text{ cm}^2/\text{atom}$)

N^* ... štev. aktiviranih atomov analita
 N ... število stabilnih atomov analita
 S ... saturacijski faktor

- če je vzorec dovolj dolgo izpostavljen toku n^0 ($t \approx (3-5) \cdot t_{1/2}$), dosežemo saturacijo, R postane konstanten in N je direktno sorazmerno R
- pri kvantitativni analizi hkrati aktiviramo standard z znano količino analita in vzorec (izpostavimo toku n^0 za točno enak t) in preračunamo:

$$w_{vz} = \frac{R_{vz}}{R_{st}} \cdot w_{st}$$



Sliki: Holler, Skoog, Crouch, Principles of Instrumental Analysis

Inštrumentacija za NAA

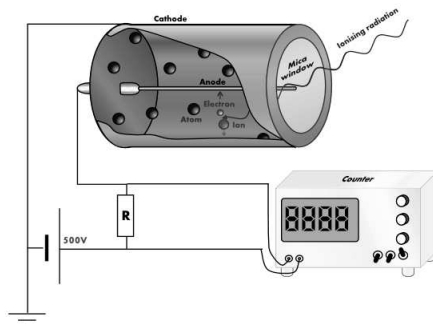
Vir hitrih nevtronov: jedrski reaktor ($\Phi = 10^{11}-10^{14} \text{ cm}^{-1}\text{s}^{-1}$); rdkt izotopi, npr. ^{252}Cf ($\Phi = 10^5-10^8 \text{ cm}^{-1}\text{s}^{-1}$); pospeševalniki: preko rkc $^2_1\text{H} + ^3_1\text{H} \rightarrow ^4_2\text{He} + ^1_0\text{n}$ dobimo hitre n^0 (14 MeV) za aktivacijo lažjih elementov

Detektor rdkt delcev: plinski detektorji, npr. Geiger-Müllerjeva cev; scintilacijski števcji; polprevodniški detektorji iz Ge (HPG, najbolj pogosti)

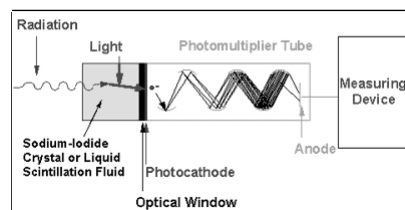
Detektor	Časovna ločljivost	Energijska ločljivost	Uporaba	Pomembnost
Polprevodniški koaksialen	2-10 ns	1,6-2,2 keV pri 1332 keV (0,12-0,17 %)	γ -žarkovna spektrometrija	visoka
Polprevodniški planaren	2-10 ns	0,55-0,8 keV pri 5,9 keV (9,3-13,6 %)	nizkoenergetska γ -ž. spektrom. in X-ž. spektrom.	srednja
Nal(Tl) scintilacijski	0,25 μs	50-75 keV pri 1332 keV (4,5-5,5 %)	γ -štetje	nizka
tekočinski scintilacijski	2-5 ns	5-8 %	β -štetje za vodne razt.	nizka
G.-M. cev	100 μs	ni	β -štetje za trdne vz.	zelo nizka

Detekcija radioaktivnih delcev:

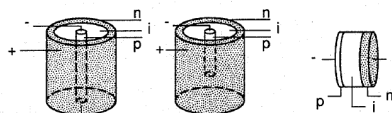
- plinski detektorji: α , β delec ali γ -žarek vstopi skozi okno iz prepustne snovi (Be, Al, sljuda...) in ionizira atom Ar v celici; nastane visokoenergetski fotoelektron, ki naprej ionizira Ar: na vsak delec/foton $10^2-10^{11} e^-$;
- trije tipi: ionizacijske celice, proporcionalni števcji, Geiger(-Müllerjeva) cev
problem: mrtvi čas (G. cev: 50-200 μs)



- scintilacijski števeci:
 - delec/žarek zadene ob fosforescentno snov (ZnS, NaI+Tl, stilben, antracen...) in sproži pulz fotonov, ki jih zazna fotopomnoževalka;
 - število nastalih fotonov v pulzu sorazmerno energiji zaznanega delca/žarka
 - mrtvi čas 0,01-0,25 μ s



- polprevodniški detektorji:
 - iz p -Ge in n -Ge; rdk žarek/delec sproži nastanek e^- , ki ustvarijo prevodni pas;
 - slabost: potrebno hladiti na zelo nizko temperaturo (≈ 77 K)



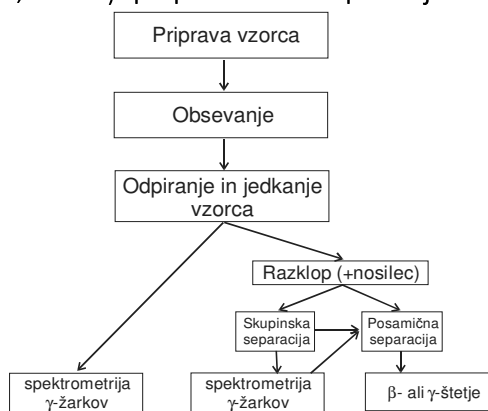
Levo: "pravi" koaksialni
 Sredina: koaksialni z zaprtim koncem
 Desno: planarni
 i... intrinzično območje ali p - i - n stik



Detektor v Pb ščitju za odstranitev γ -žarkov iz ozadja.

Po aktivaciji vzorec in standard pustimo "hladiti" določen čas, nato določimo število razpadov:

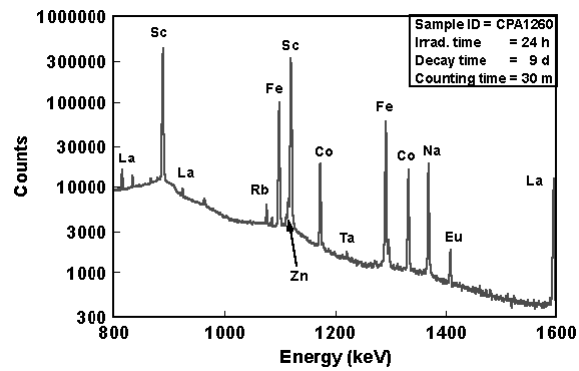
- nedestruktivno (instrumentalno, INAA): potrebna zadostna ločljivost γ -žarkovnega spektrometra, da loči signal za analit od ostalih
- destruktivno (radiokemijsko, RNAA): po predhodni separaciji analita





Generator nevtronov
proizvajalca Adelphi
Technology

γ -žarkovni spekter dolgoživih
elementov v arheološkem
vzorcju keramike. Čas obsevanja
24 h, čas hlajenja 9 dni, štetje
30 min s HPG detektorjem.



Ocena LOD pri $\Phi = 10^{13} \text{ cm}^{-1}\text{s}^{-1}$

LOD	Elementi
1 pg	Dy, Eu
1- 10 pg	In, Lu, Mn
10-100 pg	Au, Ho, Ir, Re, Sm, W
100-1000 pg	Ag, Ar, As, Br, Cl, Co, Cs, Cu, Er, Ga, Hf, I, La, Sb, Sc, Se, Ta, Tb, Th, Tm, U, V, Yb
1-10 ng	Al, Ba, Br, Cd, Ce, Cr, Hg, I, Kr, Gd, Ge, Mo, Na, Nd, Ni, Os, Pd, Rb, Rh, Ru, Sr, Te, Zn, Zr
10-100 ng	Bi, Ca, Cl, K, Mg, P, Pt, Si, Sn, Ti, Tl, Xe, Y
100-1000 ng	F, Fe, Nb, Ne
1-10 μg	Pb, S

NAA ni uporabna za H, He, Li, Be, B, C. N in O je možno aktivirati s hitrimi n⁰.
Uporabno tudi za nekatere žlahtne pline (Ne, Ar, Kr, Xe).

Prednosti:

- slepi vzorec ni potreben, ker ni možna kontaminacija (razen pri vzorcih, ki jih ni možno jedkati)
- z lahkoto odstranimo površinsko kontaminacijo
- visoka stopnja selektivnosti
- enostavna kalibracija
- univerzalnost (veliko število elementov)
- multielementna analiza
- nedestruktivna (INAA)

Slabosti:

- potrebna specialna oprema za obsevanje
- delo z radioaktivnimi materiali
- v nekaterih primerih dolg čas obsevanja in razpada