

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

PRAKTICKÉ APLIKACE A DIDAKTICKÉ VYUŽITÍ RAMANOVY

SPEKTROSKOPIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Ing. Marek Martinec

Učitelství pro střední školy, obor Ch-Fy

Vedoucí práce: Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.

Plzeň, 2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

Plzeň, 9. června 2014

.....
vlastnoruční podpis

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Ing. Marek MARTINEC
Osobní číslo: P12N0131P
Studijní program: N7504 Učitelství pro střední školy
Studijní obory: Učitelství chemie pro střední školy
Učitelství informatiky pro střední školy
Název tématu: Praktické aplikace a didaktické využití Ramanovy
spektroskopie
Zadávací katedra: Katedra chemie

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Nastudovat teorii Ramanovy spektroskopie.
2. Seznámit se s historií a současnou konstrukcí spektrometrů.
3. Seznámit se s aplikačními možnostmi Ramanovy spektroskopie.
4. Vytypovat vhodné začlenění metody do praktické výuky chemie na střední škole.
5. Možnosti využití Ramanovy spektroskopie na vysoké škole.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Zýka J. a kol.: Analytická příručka (2. díl). SNTL, Praha 1980.

Kalous V.: Jak moderní chemie zkoumá strukturu molekul. SNTL, Praha 1983.

Schrader B.: Infrared and Raman Spectroscopy: methods and applications.

1995. ISBN 3-527-26446-9.

Larkin P.: IR and Raman spectroscopy. 2011. ISBN 978-0-12-386984-5.

Vedoucí diplomové práce:

Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.

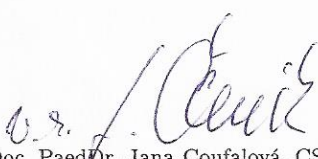
Katedra chemie

Datum zadání diplomové práce:

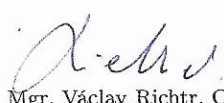
15. prosince 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

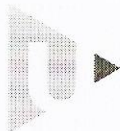
31. března 2014


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka




Doc. Mgr. Václav Richtr, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 2. ledna 2013



FAKULTA PEDAGOGICKÁ
ZÁPADČESKÉ
UNIVERZITY
V PLZNI

V Plzni dne 24. března 2014
č.j. ZČU-008114/2014/Vo

Rozhodnutí

Dle ust. čl. 55 odst. 3 Studijního a zkušebního řádu v platném znění (dále jen studijní a zkušební řád) rozhodla děkanka

takto:

Studentu **Marku Martincovi**, nar. 17. října 1984, bytem **Chynín E2**, studujícímu ve studijním programu **Učitelství pro střední školy**, studijní oborová kombinace **fyzika-chemie** se určuje náhradní termín odevzdání diplomové práce s názvem „Praktické aplikace a didaktické využití Ramanovy spektroskopie“ na **30. června 2014**.

Odůvodnění:

Student je povinen odevzdat kvalifikační práci dle jejího zadání nejpozději do 31. března 2014. Student, aniž by odevzdal kvalifikační práci, podal k děkance fakulty včas podle čl. 55 odst. 2 studijního a zkušebního řádu žádost o stanovení náhradního termínu odevzdání kvalifikační práce s odůvodněním, že do termínu původně určeného pro odevzdání diplomové práce není schopen práci z důvodu náročnosti zpracovávaného tématu zpracovat.

Děkanka s ohledem na důvody uvedené v žádosti vyhověla žádosti studenta a v souladu s ust. čl. 55 odst. 3 studijního a zkušebního řádu stanovila studentu náhradní termín pro odevzdání kvalifikační práce.

Poučení:

Proti tomuto rozhodnutí není opravného prostředku.


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.
děkanka FPE ZČU v Plzni

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část	2
2.1	Historie vibrační spektrometrie.....	2
2.2	Vývoj Ramanovy spektrometrie	3
2.3	Současný stav Ramanovy spektrometrie.....	6
2.3.1	Přenosné Ramanovy spektrometry Ahura FirstDefender	8
2.4	Praktické využití Ramanovy spektrometrie	9
2.5	Princip Ramanovy spektrometrie	11
2.5.1	Fluorescence	14
2.6	Princip infračervené spektrometrie	15
2.7	Porovnání Ramanovy spektrometrie s infračervenou spektrometrií.....	17
3	Praktická část	20
3.1	Ovládání Ramanova spektrometru	20
3.1.1	Bezpečnostní upozornění pro práci s Ramanovým spektrometrem.....	20
3.1.2	Postup analýzy vzorků přenosným Ramanovým spektrometrem.....	21
3.1.3	Detailní postup ovládání přístroje.....	25
3.2	Kalibrace Ramanova spektrometru	29
3.3	Stanovení složení alkoholických nápojů s využitím Ramanova spektrometru	30
3.4	Identifikace neznámých látek pomocí Ramanova spektrometru	32
3.5	Základní interpretace Ramanových spekter	34
4	Didaktická část.....	43
4.1	Didaktické využití Ramanovy spektrometrie ve výuce	43
4.2	Využití Ramanova spektrometru při výuce chemie	43
4.3	Představení Ramanovy spektrometrie žákům středních škol.....	44
4.3.1	Příklad výkladu Ramanovy spektrometrie žákům středních škol.....	45
4.4	Představení Ramanovy spektrometrie studentům vysokých škol	48
4.4.1	Příklad výkladu Ramanovy spektrometrie studentům vysokých škol	48
5	Závěr	54
6	Seznam použité literatury	56
7	Cizojazyčné resumé	60
8	Přílohy.....	61
8.1	Příloha č. 1 – Elektromagnetické spektrum	61
8.2	Příloha č. 2 – Parametry přenosného Ramanova spektrometru	62
8.3	Příloha č. 3 – SERS spektra organických a biologických látek	64
8.4	Příloha č. 4 – Analýza neznámých látek	66

1 Úvod

V dnešní době dochází stále rychleji k vývoji nových technologií, které nás až udivují. Rovněž z mnohých filmů a seriálů známe různé technologie, které spíše připomínají vědeckou fikci, nicméně ne vždy se může jednat o fiktivní vynálezy, ale mohou mít podstatu ve skutečných existujících technologiích. Aby si dnešní člověk mohl sám udělat názor na prezentované technologie a objevy, je nutné, aby byl informován o nových trendech a vývoji v oblastech vědy a techniky. Tuto informovanost mohou zajišťovat různé populárně vědecké pořady v televizi a akce pořádané vysokými školami. Nicméně je důležité, aby již žáci a studenti v průběhu vzdělávacího procesu na základních, střední a vysokých školách byli informováni o současném stavu poznání, o minulých a současných technologiích a možnostech jejich dalšího vývoje.

Jednou z těchto technik, která by měla být známá široké veřejnosti je bezesporu Ramanova spektrometrie, jejíž kořeny sahají do konce dvacátých let dvacátého století, nicméně hlavní využití a rozšíření zaznamenává tato technika zejména v posledních letech a to především díky rozvoji technologie polovodičů, laser a výpočetní techniky. Zejména pak instrumenty využívající tuto techniku se postupem času zmenšují a zpřesňují, čímž přestávají být jen doménou laboratoří, ale dostávají se tak do běžného života stále větší měrou a dosahují již kapesních velikostí. Jelikož se jedná o velice progresivní a robustní techniku schopnou velice rychlé analýzy velkého množství známých i neznámých přírodních a syntetických látek schopnou rozpoznat i velké množství nebezpečných látek (jedů a výbušnin), dá se předpokládat, že s dalším vývojem techniky bude tato technologie nalézat stále větší využití v každodenním životě i v případě laické veřejnosti zejména pro zajištění všeobecné bezpečnosti.

Tato práce je zaměřena na detailní popis této progresivní technologie, jejich možností využití, a také na způsob prezentace žákům středních škol a studentům vysokých škol.

2 Teoretická část

2.1 Historie vibrační spektrometrie

Již v roce 60 před naším letopočtem T. Lucretius Carus napsal:

*Forsitun et rosea sol alte lampade lucens possideat multum caecisfervorihus ignem circum se, nullo qui sit fulgore notatus, aestiferum ut tantum radiorum exaugeat ictum.*¹

(Možná že slunce, vysoko zářící jako růžová pochodeň, je obklopeno více ohněm s neviditelným teplem, které nelze rozpoznat jeho září, a tak zesiluje sílu paprsků přenášejících teplo (citace z Nonnenmachera, 1961)).¹

Již tento citát lze chápat jako prapůvod studia neviditelného záření přenášejícího teplo, tedy infračerveného záření. První využití pak infračervené záření získává až na počátku 19 století, kdy byl objeven a studován termoelektrický jev Seebeckem (1823). Infračerveného záření zejména využil Melloni, který v roce 1833 objevil propustnost chloridu sodného pro infračervené záření, čehož využil při konstrukci prvního infračerveného spektrometru ve střední infračervené oblasti v roce 1835. Tímto objevem začalo studium vibračních spekter s využitím infračerveného záření.¹

Nejprve byla studována zejména absorpce infračerveného záření, nicméně byl zaznamenán a studován i rozptyl tohoto záření. Nejdříve byl studován elastický rozptyl záření (Rayleighův rozptyl), nicméně byli mnohokrát popisovány určité anomálie zejména v případě fluorescence, kdy dochází k vyzáření záření o jiné vlnové délce, než bylo původní absorbované záření. Následně pak v roce 1923 byl předpovězen také rozptyl neelastický. Tuto předpověď učinil v roce 1923 Adolf Smekal, dále Kramers a Heisenberg (1925), Schrödinger (1926) a Dirac (1927). O pět let později od první předpovědi, tedy v roce 1928, byla skutečnost neelastického rozptylu potvrzena Ramanem.^{1,2}

Raman se snažil najít analog Comptonova jevu, což je fyzikální děj, při kterém se po srážce elektromagnetického záření s atomy pevné látky mění vlnová délka záření v důsledku předání části své energie atomům nebo jejich elektronům. Následně pak 7. února 1928 Raman a jeho spolupracovníci Kariamanickam Srinivasa Krishnan a Venkateswaran pozorovali „modifikovaný“ rozptyl slunečního světla, který Raman identifikoval jako Kramersův-Heisenbergův efekt. O tomto objevu pak Raman a

Krishnan informovali svět v krátkém vědeckém článku „A New Type of Secondary Radiation“ zaslaném do redakce časopisu Nature 16. února 1928.^{cit. 1}

Tento objev nezůstal bez povšimnutí. Ve Francii v témže roce (1928) Rocard okamžitě přisoudil tento nový efekt optické modulace oscilaci molekul. Dále také Cabannes v témže roce popsal nový efekt jako „optické bití“ a předpověděl existenci čistě rotačního Ramanova rozptylu v anizotropních molekulách. Stejný jev nezávisle na Ramanovy pozorovali také v tehdejší sovětské svazu v Moskvě Grigory Landsberg a Leonid Mandelstam v krystalech křemenu, kde popsali linie, které byly odlišné od těch, které byly očekávané dle Debyeho teorie. Tento jev pak vysvětlily jako neelastický rozptyl světelných kvant. Také ve Spojených státech amerických si Woods v roce 1928 uvědomil, že také již pozoroval a zaznamenal Ramanovy linie na fotografické desky, když zkoumal rezonanční fluorescenci. Rovněž představil termín „anti Stokes“ pro rozptýlené světlo, jehož kvantum má větší energii, než mělo původní excitační záření.¹

Jelikož však byl Raman prvním, kdo publikoval spektra rozptýleného záření obsahující linie posunutých frekvencí, byla mu pak následně 11. prosince 1930 udělena Nobelova cena za fyziku za jeho práci na difuzi světla a objevu jevu, jež nese jeho jméno.¹

Jak již bylo zmíněno, tak základy teorie Ramanova jevu byly položeny již před jeho vlastním potvrzením. Nicméně však numerické výpočty intenzity Ramanových linií nebyly v této době možné, jelikož je k tomu zapotřebí informací o všech stavech rozptýleného systému. Tyto výpočty pak umožnily až práce z roků 1930 - 1934, které vytvořil československý fyzik Georg Placzek (narozen v Brně 1905). Placzek ve své práci z roku 1934 představil semi-klasický přístup ve formě teorie polarizace. Toto poskytlo základ pro mnoho teoretických a experimentálních teorií. Od této doby si fyzikové a chemici z celého světa uvědomili důležitost a začali využívat Ramanova jevu jakožto nástroje pro kvalitativní a kvantitativní analýzu a určování struktury látek.¹

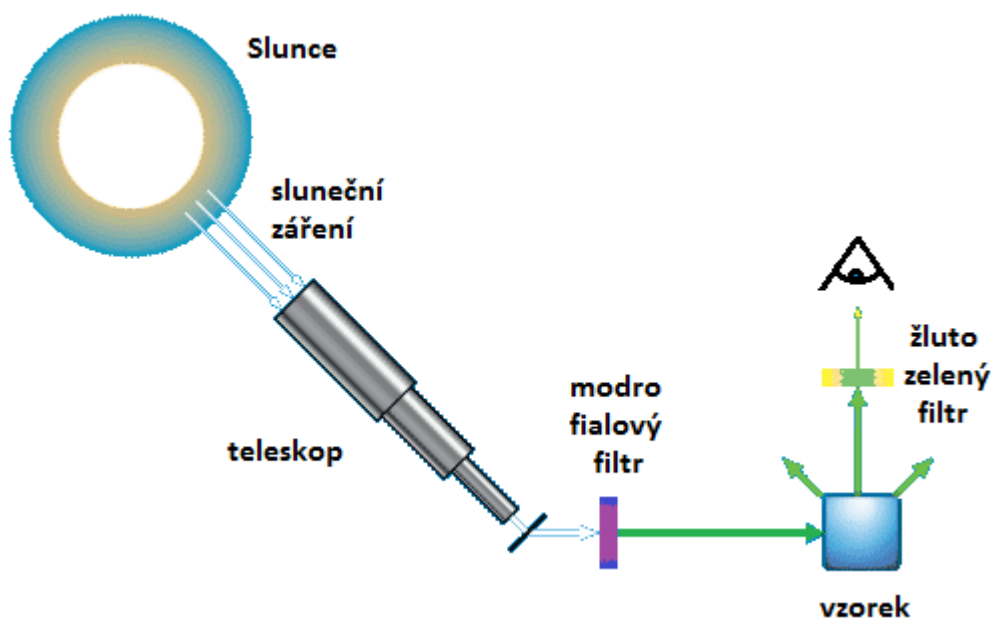
2.2 Vývoj Ramanovy spektrometrie

Ač byla infračervená spektrometrie a infračervené spektrometry používány již od počátku 19 století, začala se Ramanova spektrometrie a Ramanovy spektrometry konstruovat až po vlastním Ramanově objevu.³ Vůbec první Ramanův spektrometr viz Obr. 1, na němž Raman pozoroval neelastický rozptyl, využíval slunečního záření zaostřeného teleskopem. Následoval modrofialový filtr, za kterým byla cela s měřeným

vzorkem. Za vzorkem byl opět umístěn filtr, tentokrát žluto zelený. V případě kdyby nedocházelo k neelastickému rozptylu, nepronikalo by přes druhý filtr žádné záření, nicméně díky neelastickému rozptylu na vzorku došlo ke změně vlnové délky světla a bylo možné pozorovat záření jak je patrné z Obr. 2.^{cit. 4} V této době tak byli Raman s jeho kolegy schopni využitím tohoto přístroje detekovat Ramanovy linie pro přibližně 60 kapalin a plynů.⁵



Obr. 1 První Ramanův spektrometr⁵



Obr. 2 Schéma principu prvního Ramanova spektrometru⁵

Po tomto objevu se tak brzy ukázalo, že Ramanova spektrometrie není jen náhražkou infračervené spektrometrie, která byla ve třicátých letech 20 století mnohem náročnější technikou než Ramanova spektrometrie, ale začala být využívána jako doplňková metoda k infračervené spektrometrii (Schaefer a Matossi, 1930). Následně v letech (1931, 1938, a 1943) popsal Kohlrausch vztah mezi Ramanovým spektrem a strukturou molekul. Nicméně přibližně do roku 1950 byla Ramanova spektroskopie používána mnohem častěji, než infračervená spektrometrie a jen zřídka byli spektra z obou těchto metod hodnoceny společně. Toto se změnilo po roce 1950, kdy byly na trh uvedeny infračervené spektrometry s automatickým záznamem a infračervená spektrometrie se tak stala součástí rutinní analýzy běžně prováděné v laboratořích, což vedlo k vytlačování používání Ramanovy spektroskopie.¹

Nejdůležitějším stimulem pro rozvoj Ramanovy spektroskopie se stal vynález laseru, který vynalezl Maiman v roce 1960. Během krátké doby tak byli dříve využívané výbojky se rtuťovým obloukem nahrazeny opravdu monochromatickým a silným zdrojem záření, kterým byli lasery. Ve stejné době byla detekce Ramanových spekter pomocí fotografických desek nahrazena fotonásobiči a skenovací mřížkové spektrometry nahradili dříve používané hranolové spektrometry. Také zavedení dvojitých a trojitých monochromátorů a propracování techniky vzorkování a také pozdější využití diodového pole a CCD čipů (charge-coupled devices) výrazně přispělo k rozvoji Ramanovy spektrometrie.⁵

Nicméně hlavní překážky k zavedení Ramanovy spektrometrie jako rutinní analytické chemické metody nebylo možné odstranit až do pozdních 80 let 20 století. Těmito překážkami byla zejména fluorescence způsobená nečistotami přítomnými v běžných vzorcích. Takto vybuzené záření zejména ve viditelné či UV oblasti elektromagnetického spektra je až o několik řádů silnější nežli Ramanův jev.⁶

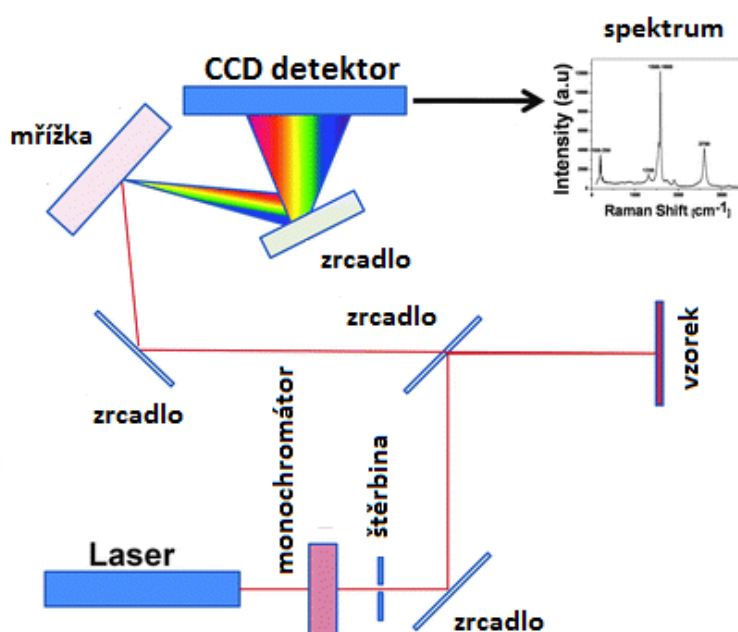
Kromě faktu, že neustálý vývoj techniky umožnil zlepšení kvality měřených spekter a jejich pohodlný záznam, byl tento přínos narušen vyšší cenou těchto přístrojů. Toto má v důsledku za následek stále nižší zastoupení Ramanových spektrometrů a jejich nasazení v praxi je tak pouze zlomkem počtu infračervených spektrometrů. Šanci na změnu tohoto nepříznivého poměru přinášejí Ramanovy spektrometry využívající záření v blízké infračervené oblasti⁷, které je realizováno pomocí relativně levných diodových laserů, a také zavedení záznamu pouze interferogramů, které jsou následně převáděny Fourierovou transformací na klasické spektrum. Tato technika se nazývá Ramanova spektrometrie s Fourierovou transformací v blízké infračervené oblasti

(NIR-FT Raman)⁸, jež umožňuje získání spekter většiny vzorků bez rušení fluorescencí. Rovněž zavedení disperzních spektrometrů s multikanálovými detektory a vývoj mnoha různých forem Ramanovy spektrometrie, umožňuje kombinovat Ramanovu spektroskopii s infračervenou, což rozšiřuje možnosti analýzy u obou těchto analytických technik.⁹

2.3 Současný stav Ramanovy spektrometrie

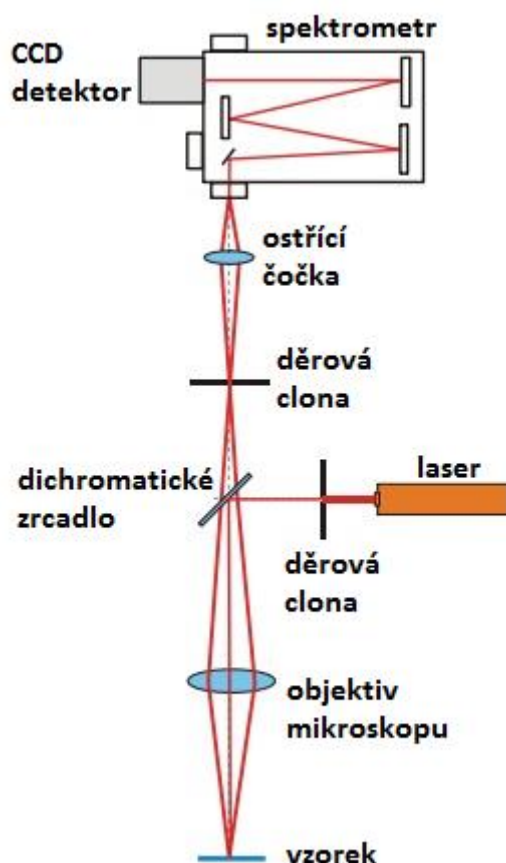
V současné době jsou komerčně nabízeny Ramanovy spektrometry v různých rozmanitých variantách. Tyto spektrometry jsou vyráběny jako laboratorní nepřenosná zařízení, ale také existují přenosná zařízení, takřka kapesních rozměrů. Přenosné Ramanovy spektrometry jsou dokonce modifikovány takovým způsobem, aby byly odolné i při hrubém zacházení v nepříznivých povětrnostních podmínkách.¹⁰

Konstrukčně jsou dnešní Ramanovy spektrometry sestaveny ze zdroje monochromatického záření, kterým je zejména laser se stabilizovanou vlnovou délkou. Do dráhy laseru je umístěn měřený vzorek. Záření rozptýlené vzorkem je sběrnou a přenosovou optikou dopravováno přes monochromátor odstraňující záření o stejné vlnové délce, jakou měl použitý laser (Rayleighův rozptyl). Většinou následuje difrakční mřížka pevná či rotující, dělicí rozptýlené záření podle vlnové délky. Vlastní detekci zajišťuje CCD čip, detekující intenzitu dopadajícího záření pro konkrétní vlnové délky. Z naměřených hodnot vlnočtů (převrácených hodnot vlnových délek) a jím odpovídajících intenzit je sestaveno výsledné spektrum viz Obr. 3.^{cit. 11}



Obr. 3 Schéma optické dráhy Ramanova spektrometru⁵

Pokud se jedná o laboratorní systémy, pak jsou dodávány systémy s možností změny vlnové délky používaného laseru, nejběžnější používané vlnové délky jsou 1064 nm, 830 nm, 785 nm, 632 nm, nebo 532 nm. Rovněž je možné měnit intenzitu použitého laseru, která se běžně pohybuje v rozmezí 300 mW – 450 mW. Tyto přístroje jsou zejména schopny měřit vlnočty v rozmezí 4000 cm^{-1} – 40 cm^{-1} tudíž se jedná o střední až vzdálenou infračervenou oblast se spektrálním rozlišením 3 cm^{-1} – 5 cm^{-1} .¹² Rovněž jsou u laboratorních Ramanových spektrometrů připojeny automatické vzorkovače, umožňující automatickou analýzu velkého množství vzorků. U laboratorních Ramanových spektrometrů bývá součástí přenosové optiky také mikroskop, umožňující zaostření ohniska na konkrétní místo povrchu vzorku a provedení analýzy v tomto místě viz Obr. 4. Další variantou jsou 3D mikroskopy, které jsou schopny postupně zmapovat celý povrch vzorků v relativně krátkém čase. Ramanovy spektrometry s mikroskopem dosahují rozlišení $0,5\text{ }\mu\text{m}$ i nižší.¹³



Obr. 4 Schéma Ramanova spektrometru s mikroskopem²

Pokud se jedná konkrétně o přenosné Ramanovy spektrometry, ty využívající nejčastěji vlnovou délku laseru 785 nm, méně pak 532 nm či 1064 nm. Tyto přístroje jsou schopny měřit zejména ve střední infračervené oblasti, tudíž jsou zaznamenávány vlnočty v rozmezí $200\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$ se spektrálním rozlišením $7\text{ cm}^{-1} - 15\text{ cm}^{-1}$ (v závislosti na výrobci). Tyto ruční přístroje jsou zejména určeny k rychlým terénním analýzám pro různé „bílé prášky“, drogy, výbušniny, chemikálie a podobně, čímž získávají své uplatnění zejména u složek integrovaného záchranného systému, tedy policie a hasičů.¹⁴

2.3.1 Přenosné Ramanovy spektrometry Ahura FirstDefender

Během této práce bylo využíváno přenosného Ramanova spektrometru Ahura FirstDefender ve verzi z roku 2007. Tento přenosný spektrometr je primárně určen pro využití v terénu, z čehož plyne značná robustnost jeho konstrukce a to i při zachování kompaktních rozměrů. Tento přístroj nalézá své uplatnění zejména pro analýzu látek v pevném a kapalném skupenství. Databáze tohoto přístroje obsahuje k prosinci roku 2013 celkem 11500 položek. Nespornou výhodou tohoto přístroje je nejen možnost aktualizace databáze, ale také umožňuje přidávání nových látek a sloučenin do databáze, což nachází uplatnění při rozšiřování schopností analýzy přístroje v případě chemicky čistých látek i směsí. Tohoto lze využít pro kalibraci přístroje ke kvantitativnímu stanovení různých obsahů látek ve směsi.¹⁴

Hlavní využití nacházejí tyto přístroje jako první obraná linie při identifikaci chemických zbraní, v energetice, při analýze bílých prášků, narkotik, pašovaného zboží a různých nebezpečných látek a toxických látek.¹⁴

Přenosné Ramanovy spektrometry jsou v podstatě bezúdržbová zařízení a jsou dodávány v ochranném kufru s veškerým příslušenstvím. Podrobnější specifikace Ramanova spektrometru jsou uvedeny v Příloha č. 2 – Parametry přenosného Ramanova spektrometru.¹⁴



Obr. 5 Ramanův spektrometr Ahura FirstDefender verze 2007 (vlevo), verze 2012 (vpravo)¹⁴

2.4 Praktické využití Ramanovy spektrometrie

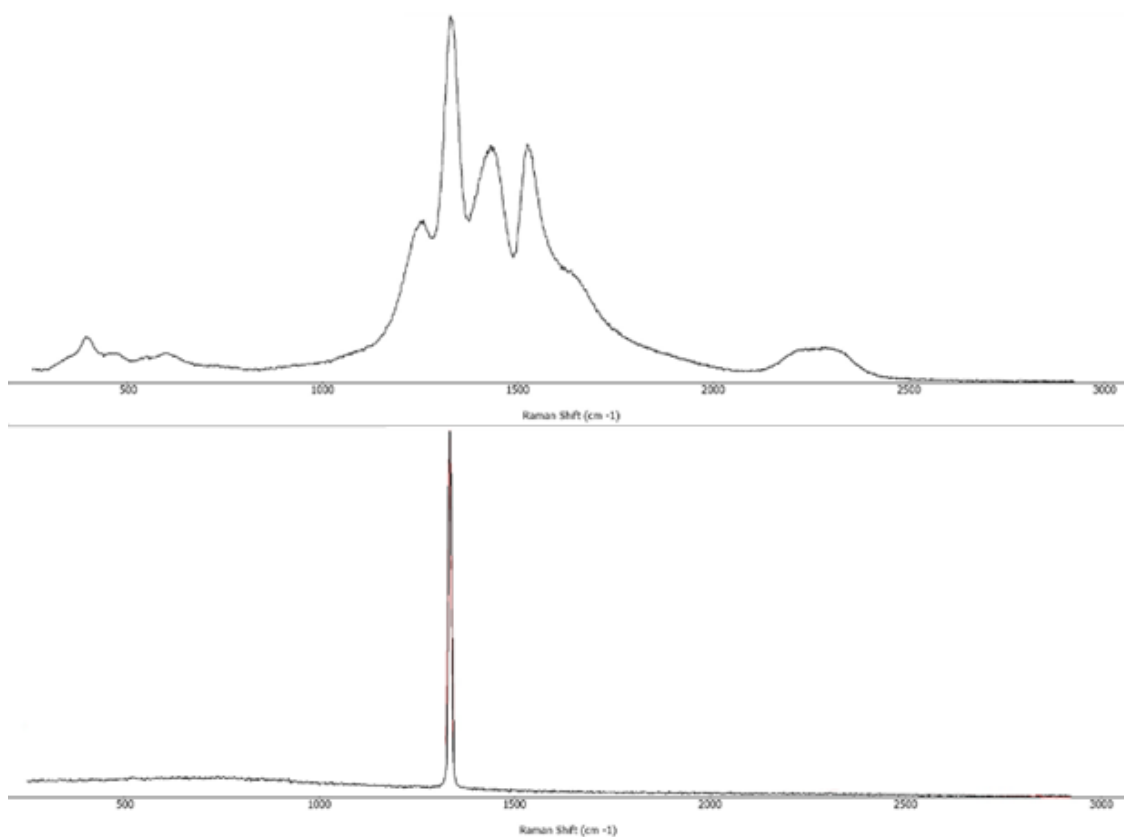
Ramanova spektrometrie získává v poslední době stále větší uplatnění jak v laboratorní praxi, tak v praktickém životě. Ramanovy spektrometry jsou hojně využívány státní policií a celní policií při určování pašovaných látek zejména pak drog, popřípadě k analýze bílých prášků pro ověření či vyloučení nebezpečnosti nalezené látky, zejména při teroristických útocích. Rovněž své uplatnění nalézají Ramanovy spektrometry při identifikaci podezřelých látek na letištích k rozpoznání, zda se jedná o výbušninu a také o jaký typ výbušných látek se jedná. Další široké využití nalézají Ramanovy spektrometry v rukou hasičů, kteří jsou schopni těmito přístroji rozpoznat povahu látek, které jsou nalezeny rozsypané či rozlité při různých haváriích či v nelegálních skladech.⁶

Určité modifikace Ramanových spektrometrů lze použít ke kontinuálnímu měření složení anestetického plynu při podávání anestezie pacientům v lékařství. Pro lékařské účely je také využívána Ramanova spektrometrie zejména v modifikaci SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy - povrchově zesílená Ramanova spektrometrie).¹⁵ S využitím této techniky je možné z větší části překonat silnou fluorescenci biologických materiálů a lze tak měřit spektra jednotlivých tkání. Rovněž tak lze touto technikou kupříkladu rozlišit nádorovou tkáň od zdravé tkáně viz Příloha č. 3 – SERS spektra organických a biologických látek.¹⁶ Těto metody je také využíváno pro studium virů, bakterií a jiných mikroskopických organismů. Pro účely lékařství je

důležité také využití při analýze složení léků, pro confirmaci, zda obsahují danou účinnou látku a také jaké další látky obsahují.¹⁷

Dalším speciálním využitím byla oblast ověření pravosti uměleckých děl. Kupříkladu se jednalo o ověření pravosti mapy Vinlandu, jež měla dokázat, že byla Amerika objevena Vikingy ještě před Kryštofem Kolumbem. Toto stanovení spočívalo v analýze inkoustu, jímž byla tato mapa zakreslena. Výhodou této metody je, že se jedná o nedestruktivní metodu, tudíž jí lze aplikovat i na vzácná umělecká díla a to bez rizika jejich poškození.¹⁸

Své využití nalézá Ramanova spektrometrie také při analýze drahých kamenů, zejména pak k rychlému rozlišení diamantu od zirkonu.¹⁸

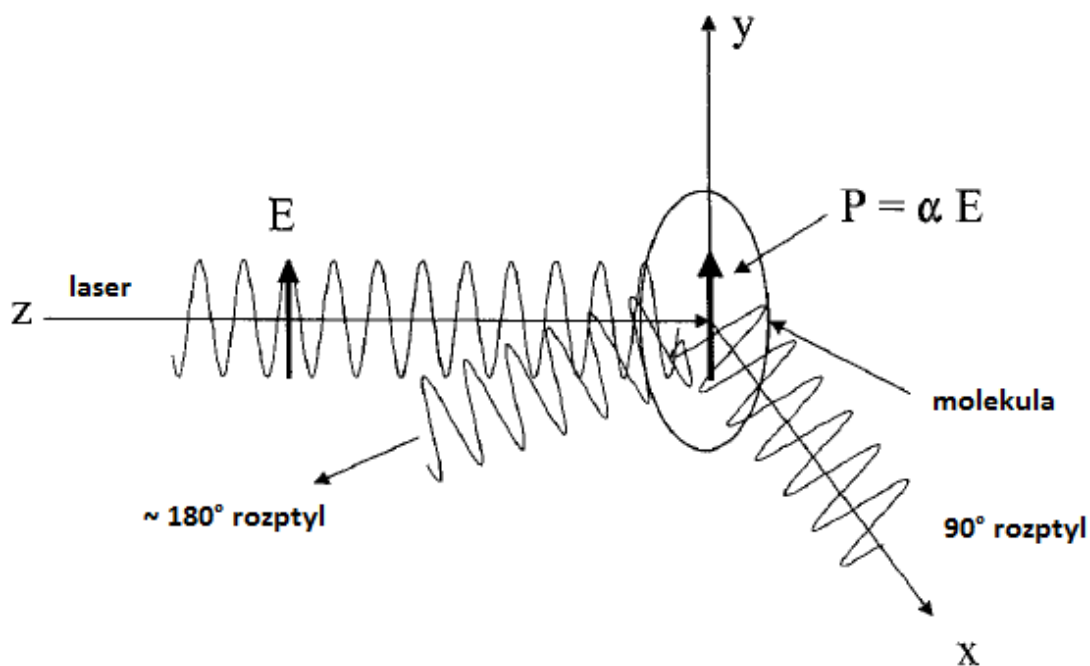


Obr. 6 Ramanovo spektrum zirkonu (nahore), diamantu (dole)

V neposlední řadě našla Ramanova spektrometrie a zejména pak přenosné Ramanovy spektrometry velké využití při rychlé analýze složení alkoholů, což bylo nápomocné při ověřování přítomnosti methanolu v alkoholech během období zvýšeného výskytu otrav způsobených nelegálně distribuovanými alkoholy v České republice na podzim roku 2012.

2.5 Princip Ramanovy spektrometrie

Hlavním principem, na němž je Ramanova spektrometrie založena, je neelastický rozptyl záření. Rozptyl záření se v tomto případě nazývá Ramanův rozptyl.¹⁹ Podstatou Ramanova rozptylu je vyvolání změny polarizace molekuly oscilací elektrického pole přichozího záření viz Obr. 7.^{cit. 20}



Obr. 7 Princip Ramanova rozptylu záření²⁰

Polarizace (P) indukovaná v elektronovém obalu molekuly dopadajícím optickým elektrickým polem (E). K rozptylu záření dochází v různých směrech, zde jsou zobrazeny příklady pro úhly rozptylu 90° a 180°

Takto indukovaný dipól následně vyzařuje rozptýlené záření, u něhož dochází či nedochází k výměně energie s vibračním stavem molekuly. Síla takto indukované polarizace P je úměrná polarizaci α a intenzitě dopadajícího elektrického pole E .²⁰

$$P = \alpha \cdot E \quad (1)$$

Jak klasický tak i kvantově mechanický přístup k řešení Ramanova rozptylu jsou založeny na rovnici (1) a toto řešení je velmi důležité pro pochopení tohoto jevu a interpretaci spekter.²⁰

Z teorie elektrodynamiky rovněž víme, že jakýkoliv pohyb molekuly, spojený se změnou elektrického momentu dipólu, vede k emisi nebo absorpci záření. Elektrický moment dipólu P se při vibracích dvouatomové molekuly mění v prvním přiblížení

podle rovnice (2). Kde P_0 je elektrický moment dipólu v rovnovážné poloze a $(\delta P/\delta r)_0$ se nazývá efektivní náboj P' .²¹

$$P = P_0 + \left(\frac{\partial P}{\partial r}\right)_0 r \quad (2)$$

Klasické řešení Ramanova rozptylu je založeno na vlivu vibrace molekuly na polarizovatelnost α v rovnici (1). Podmínky, jež jsou nutné k tomu, aby se objevili Ramanovy linie, odvodíme pomocí klasické mechaniky pro dvouatomovou molekulu kmitající s frekvencí ν_1 . Dále uvažujeme v klasické mechanice dvouatomovou molekulu, u níž nejprve nedochází k vibraci. Po ozáření této molekuly frekvencí ν_0 kmitající s určitou frekvencí ν_0 jsou elektrony vychylovány ze svých poloh periodicky s frekvencí ν_0 , což vede ke vzniku střídavého momentu dipólu. Vektor intenzity dopadajícího elektrického pole záření je pak popsán rovnicí (3).^{cit. 20}

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad (3)$$

Indukovaný moment P_i pak nabývá tvaru popsaného v rovnici (4), kde polarizovatelnost α je mírou snadnosti, kterou se vychylují negativní náboje elektrickým polem. Index nula pak značí, že veličina se týká rovnovážné polohy.²⁰

$$P_i = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \quad (4)$$

Polarizovatelnost α se pro vibrující molekulu mění podle vztahu vyjádřeného v rovnici (5), kde x je výchylka vibrace, pro kterou v zobecněném přiblížení harmonického oscilátoru platí vztah vyjádřený rovnicí (6).^{cit. 21}

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial x}\right)_{x=0} x \quad (5)$$

$$x = x_0 \cos 2\pi \nu_1 t \quad (6)$$

Pro molekulu s vibrujícími atomy je indukovaný moment dipólu vyjádřen dle rovnice (7).

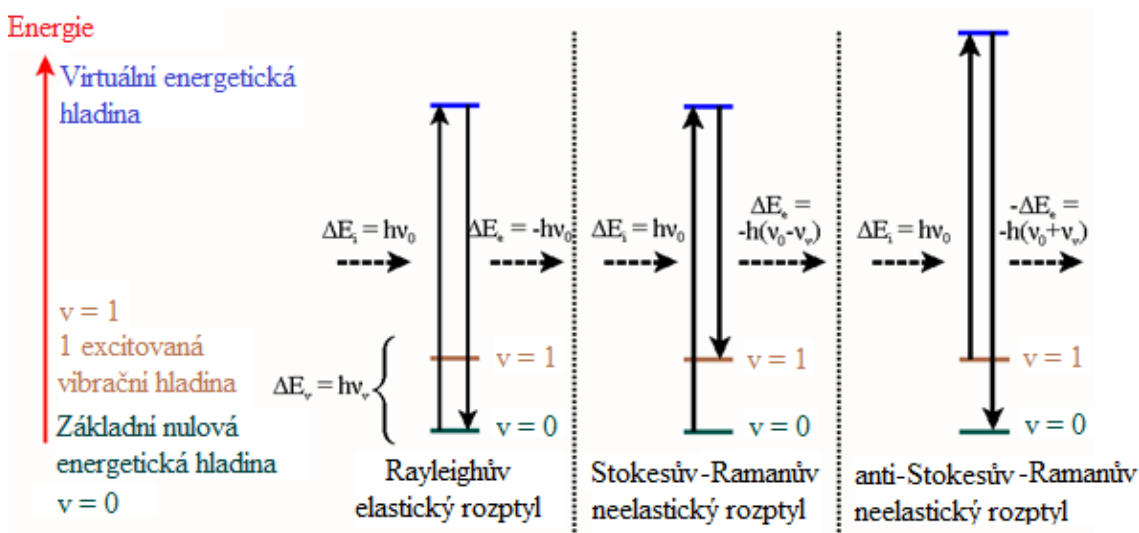
$$\begin{aligned} P_i &= \alpha E = (\alpha_0 + \alpha' x) E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu_0 t \\ &\quad + \frac{1}{2} \alpha' x_0 E_0 [\cos 2\pi (\nu_0 + \nu_1) t + \cos 2\pi (\nu_0 - \nu_1) t] \end{aligned} \quad (7)$$

Z této rovnice je zřejmé, že molekula sama se stane zdrojem záření se stejnou frekvencí ν_0 jako mělo primární záření (klasický neboli Rayleighův rozptyl). Nicméně rovnice obsahuje další členy, a tudíž bude molekula mimo primárního záření zdrojem dalších záření s frekvencemi $(\nu_0 + \nu_1)$ a $(\nu_0 - \nu_1)$ neboli Ramanův rozptyl. Linie, jež se

objeví v Ramanově spektru s nižší frekvencí než ν_0 , mají větší energii nežli původní linie a nazývají se Stokesovy linie. Naproti tomu linie při vyšších frekvencích, tedy linie s nižší energií nežli původní linie se nazývají anti-Stokesovy linie.²⁰

Z rovnice (7) dále vyplývá, že k objevení Ramanových linií je nezbytně nutné, aby při vibraci docházelo ke změně polarizovatelnosti, neboli aby se výraz $\alpha' = (\delta\alpha/\delta x)_{x=0}$ nerovnal nule. Dále je možno dokázat, že intenzita Ramanových linií je pak úměrná čtverci polarizovatelnosti.²⁰

V rozptylových Ramanových spektrech při vzniku Ramanových linií tak dochází ke kvantovým přechodům, jak je zobrazeno na schematickém diagramu viz Obr. 8. Při tomto jevu je nutné si uvědomit, že v rozptylových spektrech se přechody mezi jednotlivými kvantovými vibračními stavy dějí současně a ne postupně, tak jako je tomu v případě fluorescence, kde dochází k emisi světelného kvanta $h\nu'$ následně až po vlastní absorpci světelného kvanta $h\nu$.²²



Obr. 8 Kvantové přechody pro Ramanova rozptylová spektra²³

Intenzita Ramanových rozptylových spekter je stejně jako intenzita rozptýleného záření nepřímo úměrná čtvrté mocnině vlnové délky dopadajícího záření. Ramanovy linie jsou rozloženy symetricky na obou stranách budící frekvence. Anti-Stokesovy linie pak mají mnohem menší intenzitu než Stokesovy linie a vyskytují se za normální teploty pouze u vibrací s vlnočtem do 700 cm^{-1} . Poměr intenzit odpovídajících anti-Stokesových a Stokesových linií je popsán podle rovnice (8).^{cit. 22}

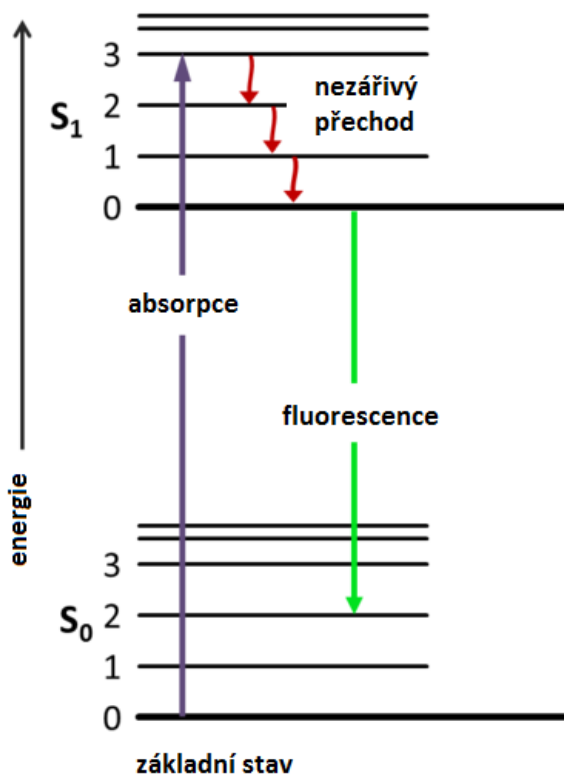
$$\frac{I_{as}}{I_s} = \left(\frac{\nu + \nu_v}{\nu - \nu_v} \right)^4 e^{-h\nu_v/kT} \quad (8)$$

2.5.1 Fluorescence

Fluorescence je z hlediska Ramanovy spektrometrie velmi důležitá, jelikož se jedná o doprovodný jev vznikající při měření Ramanových spekter a ovlivňuje tak a ruší vlastní stanovení Ramanových linií.²⁴

Fluorescence je tudíž ve své podstatě emise záření látkou, která absorbovala elektromagnetické záření. Objevuje se také, když jsou molekuly excitovány do vyšších energetických stavů při bombardování elektrony. Fluorescence je tedy formou luminiscence. V mnoha případech má vyzařované záření delší vlnovou délku, a tedy menší energii, než mělo původní absorbované záření. Nicméně pokud je absorbované elektromagnetické záření dostatečně intenzivní, je možné, aby elektrony absorbovaly dva fotony oproti jednomu. Tato absorpce dvou fotonů pak může vést k emisi záření o kratší vlnové délce a tedy vyšší energii nežli mělo původní absorbované záření.²⁴

Nejčastěji však dochází k absorpci záření v ultrafialové oblasti elektromagnetického spektra, tedy v neviditelné oblasti, nicméně vyzařované záření je již o vyšší vlnové délce a tudíž okem viditelné. Postupné uvolňování záření a s tím související přechod molekul z vyšších excitovaných stavů do základního energetického stavu je popsáno Jablonskiho diagramem viz Obr. 9.^{cit. 24}



Obr. 9 Jablonskiho diagram energetických přechodů během fluorescenčního záření²⁴

Z diagramu je patrné, že poté co elektron absorboval vysokoenergetický foton, došlo ke změně rotačního a vibračního stavu molekuly a její excitaci na vyšší rotačně vibrační energetickou hladinu. Excitovaná molekula se postupně vibračně uvolňuje z excitovaného stavu při čemž vyzařuje fluorescenční záře ve formě fotonů o delší vlnové délce do doby, dokud se molekula nenavrátil na původní nulovou energetickou hladinu.²⁴

Trvání fluorescenčního záření je však časově omezené a v běžných situacích kdy je vybuzeáno absorpcí fotonů elektromagnetického záření v ultrafialové až blízké infračervené oblasti, trvá fluorescenční záření v řádu 0,5 až 20 nanosekund.²⁴

2.6 Princip infračervené spektrometrie

Infračervená spektrometrie je především určena pro identifikaci a popis struktury organických látek a samozřejmě také látek anorganických. Infračervená spektrometrie využívá, jak již název napovídá, infračervené záření, které má právě dostatek energie, jež postačuje k rotačním a vibračním přechodům molekul. Každá vibrace a rotace si tak z infračerveného spektra vybere právě ty fotony, které jí energeticky vyhovují.²⁵

Infračervená spektrometrie využívá část elektromagnetického spektra, nazývanou infračervené záření ($\lambda = 0,78 \mu\text{m} - 1000 \mu\text{m}$), která se dělí na blízkou střední a vzdálenou infračervenou oblast. Blízká infračervená oblast NIR se nalézá ve vlnových délkách $0,78 \mu\text{m}$ až $3 \mu\text{m}$ (vlnčet přibližně 13000 cm^{-1} až 4000 cm^{-1}). Střední infračervená oblast MIR se nachází v rozmezí vlnových délek $3 \mu\text{m}$ až $30 \mu\text{m}$ (vlnčet přibližně 4000 cm^{-1} až 200 cm^{-1}). Následuje vzdálená infračervená oblast FIR ležící v rozmezí vlnových délek $30 \mu\text{m}$ až $1000 \mu\text{m}$ (vlnčet přibližně 200 cm^{-1} až 10 cm^{-1}). Nejvíce je však pro identifikaci využívána střední infračervená oblast, v níž leží největší počet charakteristických absorpcí.²⁶

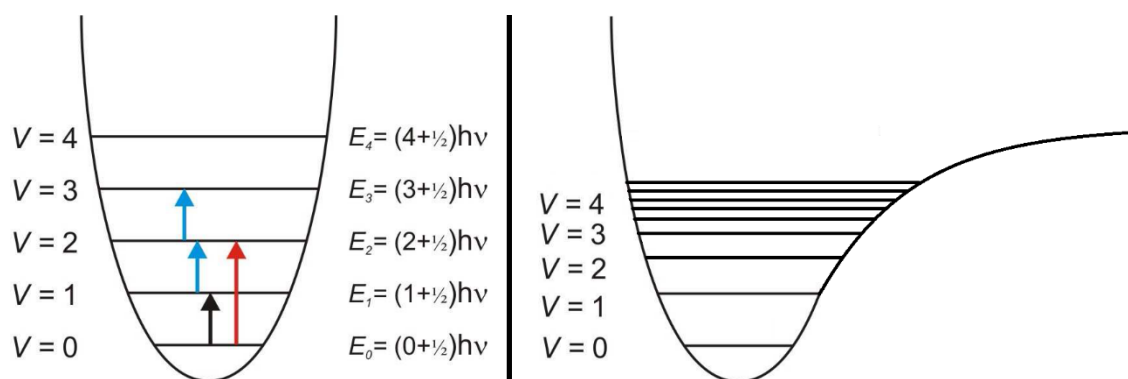
Pro přepočítání vlnových délek na vlnčet lze využít rovnici (9).^{cit. 21}

$$\text{vlnčet } \tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = \frac{10^4}{\text{vlnová délka } \lambda [\mu\text{m}]} \quad (9)$$

Princip infračervené spektrometrie pak spočívá v absorpci infračerveného záření při jeho průchodu vzorkem. Tímto dochází ke změně rotačních a vibračních energetických stavů molekul v závislosti na změnách dipólového momentu dané molekuly.¹⁹

Aby bylo možné zaznamenat vibrace molekul, provedeme opět aproximaci reálné molekuly dvouatomovou molekulou a budeme jí popisovat opět klasickou mechanikou jako kmitající harmonický oscilátor. Pokud budeme toto aplikovat na reálné molekuly, platí zde zákony kvantové mechaniky, podle kterých může vibrující molekula nabývat jen určitých hodnot energie, daných vibračními energetickými hladinami, oproti klasické představě, kde může nabývat libovolných hodnot energie. Tyto hladiny přípustné vibrační energie jsou od sebe stejně vzdáleny a byla jim přidělena vibrační kvantová čísla.¹

Aby byl umožněn přechod molekuly do vyšších kvantových energetických vibračních hladin, musí molekula absorbovat foton o velikosti energie přesně odpovídající energetickému rozdílu dvou energetických vibračních hladin. Energie fotonu o dané energii a vlnové délce (vlnočtu) se spotřebuje na rozkmitání atomů v molekule. Detektor pak tuto skutečnost zaznamená jako pokles toku záření o dané vlnové délce (vlnočtu). Na výsledném spektru se v tomto místě objeví absorpční maximum. Protože však jsou vibrační přechody u dvou i více atomových molekul doprovázeny rotačními přechody, dochází tak k rozšíření linie za vzniku absorpčního maxima. U reálné molekuly však kmity nejsou dokonale harmonické, projevuje se tato skutečnost tím, že potenciálová křivka není symetrická a energetické hladiny nejsou od sebe rovnoměrně vzdáleny viz Obr. 10.^{cit. 1}



Obr. 10 Potenciálová křivka harmonického (vlevo) a anharmonického (vpravo) oscilátoru²⁷

Vibrace u víceatomových molekul si pak lze představit jako soubor vibrací řady oscilátorů, jejichž pohyby jsou na sebe vázány a vzájemně se ovlivňují. Tento složitý vibrační pohyb lze rozložit na několik jednoduchých vibračních pohybů, z nichž každý představuje jednu tzv. normální vibraci neboli normální vibrační modus. Základní rozdělení vibrací je na vibrace valenční a deformační.¹

U valenčních vibrací se mění převážně jen mezijaderné vzdálenosti, čímž dochází k prodlužování či zkracování vazeb a to buď symetricky či antisymetricky.

U deformačních vibrací dochází převážně ke změně valenčních úhlů. Deformační vibrace se dělí na nůžkové (scissoring), kyvadlové (rocking), torzní (twisting) a vějířové (wagging).¹

Počet těchto vibrací roste s počtem atomů v molekule (N) a činí $(3N - 6)$ pro nelineární molekulu a $(3N - 5)$ pro lineární molekulu. Přičemž v infračerveném spektru se projevují jen ty vibrace, při kterých dochází k periodické změně dipólového momentu molekuly.¹

2.7 Porovnání Ramanovy spektrometrie s infračervenou spektrometrií

Jak již bylo zmíněno, tak infračervená spektrometrie je založena na absorpci infračerveného záření o určitých vlnových délkách přítomností konkrétních vazeb v molekule. Podmínkou zeslabení procházejícího záření je vyvolání charakteristických vibrací, při nichž se mění dipól moment molekuly. Oproti tomu je Ramanova spektrometrie založena na neelastickém rozptylu záření, ke kterému dochází absorpcí infračerveného záření a detekcí vyzářeného rozptýleného záření, jehož frekvence je charakteristická pro daný typ substituentů a vazeb mezi atomy. Aby došlo k rozptylu záření, musí tak dojít ke změně polarizovatelnosti molekuly.¹⁹

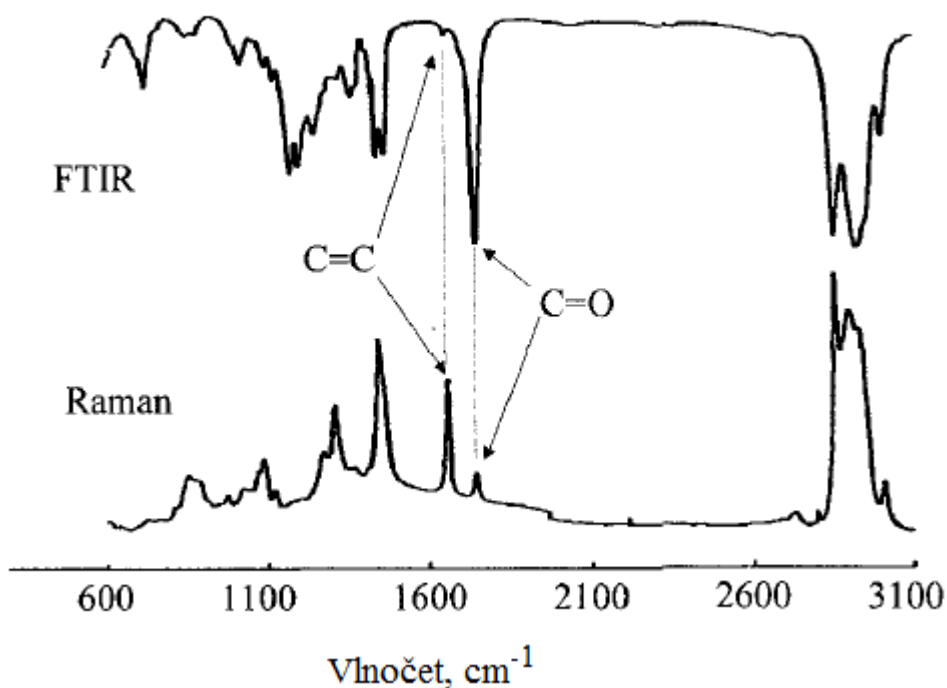
Z podstaty principu těchto metod je patrné, že charakteristické vibrace vazeb, jež jsou silné v Ramanovo spektru, budou slabé v infračerveném spektru a naopak charakteristické vibrace silné v infračerveném spektru, budou slabé v Ramanovo spektru. Z toho vyplývá, že jsou tyto dvě metody k sobě vzájemně doplňkové. Nicméně každá z těchto metod má své přednosti a omezení.²¹

V případě Ramanovy spektrometrie má například voda velice slabý molekulární signál, tudíž je snazší analyzovat vodné roztoky, v nichž Ramanovy přístroje vodu v podstatě nezaznamenávají, a mohou tak nerušeně stanovovat ostatní složky vodného roztoku. V případě infračervené spektrometrie je naopak obtížnější stanovovat vodné roztoky, jelikož v infračervené spektrometrii má voda velice silný molekulární signál a ruší tak stanovení ostatních komponent vodných roztoků.

V některých případech je dokonce měření vodných roztoků zcela nemožné a to v případě infračervené spektrometrie využívající měřicí kyvety z chloridu sodného.²⁵

Ukažme si rozdíl těchto dvou metod na příkladu spektra methylesteru kyseliny olejové měřeného Ramanovou spektrometrií a infračervenou spektrometrií s Fourierovou transformací. Je patrné, že polarizovatelnost vazby C=C se výrazně mění s vibrací spojenou se změnou délky vazby C=C. V tomto případě je Ramanův rozptyl vibrací vazby C=C silný, oproti vibraci vazby C=O která je velmi slabá. Provedeme-li porovnání s infračervenou spektrometrií, pak absorpce v infračervené oblasti vyžaduje změnu dipól momentu, aby byla vibrace aktivní v infračerveném spektru. Tudíž vibrace vazby C=C je velmi slabá vůči absorpci infračerveného záření vazbou C=O, kde je vibrační změna délky vazby velmi silná viz Obr. 11.^{cit. 1}

Methylester kyseliny olejové



Obr. 11 FT-IR spektrum (nahore) a Ramanovo spektrum (dole) methylesteru kyseliny olejové¹

Pro Ramanovu spektrometrii také existuje určité omezení, zejména pak při analýze biologických materiálů a obecně vysoce fluoreskujících materiálů, kde fluorescenční záření vybuzené ozářením vzorku je intenzivnější, nežli vlastní molekulární signál a znemožňuje tak vlastní analýzu vzorku.¹⁷ Tuto nevýhodu je však možné zmírnit či plně odstranit vhodnou volbou vlnové délky budícího záření popřípadě

využitím modifikovaných technik Ramanovy spektrometrie, kterými jsou zejména SERS a SERRS, jež poskytují o několik řádů silnější molekulární signál, čímž je rušivý vliv fluorescence překonán.²⁸

Pokud se jedná o Ramanovu spektrometrii, je možné provádět analýzu přímo, bez případné úpravy vzorku či záznamu pozadí, nicméně v případě infračervené spektrometrie je vždy zapotřebí souběžně s vlastní analýzou provádět měření srovnávací pro eliminaci rušivých vlivů pozadí, popřípadě je nutné nejprve identifikovat měřené pozadí a následně odečíst tyto hodnoty pozadí od naměřených hodnot stanovovaného vzorku.¹

Obě dvě metody jak infračervená spektrometrie, tak Ramanova spektrometrie jsou díky rozvoji techniky dostupné i v přenosné variantě, což umožňuje provádění analýz i v terénních podmínkách.¹⁰

Další nespornou výhodou při využívání Ramanovy spektrometrie, zejména v přenosném provedení, je možnost provádění analýz i bez nutnosti odběru vzorku. V ručních přístrojích bývá většinou využíváno diodových laserů pracujících v blízké infračervené oblasti 785 nm. Toto záření z větší části prochází i skleněnými nádobami, tudíž je možné provádět stanovení i přes transparentní skleněné či plastové obaly. Naproti tomu u infračervené spektrometrie je vždy nezbytné provést vlastní odběr vzorku.¹⁴

Obě tyto metody nalézají značné využití a je vždy zapotřebí vybrat vhodnou metodu pro konkrétní oblast použití, popřípadě využití obou těchto metod značně rozšiřuje možnosti prováděných analýz.

3 Praktická část

3.1 Ovládání Ramanova spektrometru

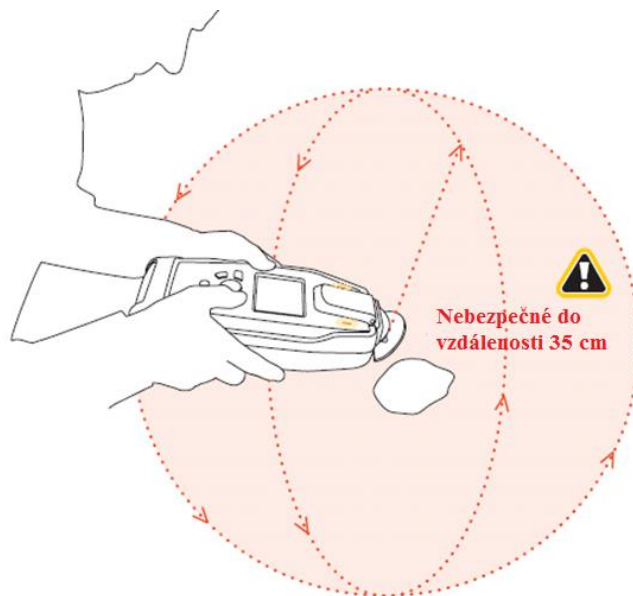
Přenosný Ramanův spektrometr Ahura FirstDefender je velice robustním zařízením schopným pracovat ve značně nepříznivých podmínkách. Kupříkladu je schopen pracovat déle jak 30 minut v zapnutém stavu více jak metr pod hladinou vody. Lze s ním pracovat při vysoké relativní vlhkosti konkrétně 95% vlhkosti a teplotě 60° déle jak 10 dní. Je také schopen dlouhodobě pracovat v prašném prostředí. Tento přístroj je schopen efektivně pracovat i při nárazu po pádu 26 krát z výšky 1,22 m na překližkovou desku položenou na betonu.¹⁴

Parametry tohoto přístroje tak reflektují požadavky na práci v terénu v nebezpečném prostředí. Rovněž při nasazení tohoto přístroje do výuky chemie, kdy lze očekávat ne příliš vhodné zacházení, nemůže prakticky dojít k poškození tohoto přístroje i nešetrným zacházením ze strany žáků či studentů.

Při práci s přístrojem je však důležité dodržovat několik bezpečnostních opatření a rovněž se důkladně seznámit s principem, funkcemi a postupem používání tohoto přístroje.

3.1.1 Bezpečnostní upozornění pro práci s Ramanovým spektrometrem

Jelikož přístroj pro svou funkci využívá stabilizovaný diodový 300 mW laser spadající do skupiny CLASS IIIB pracující v blízké infračervené oblasti na vlnové délce 785 nm +/- 0,5 nm je nutné dbát zvýšené opatrnosti při využití vnějšího zdroje laserového paprsku. V tomto případě je nutné dodržet minimální vzdálenost 35 cm od hrotu přístroje viz Obr. 12. Do této vzdálenosti může laserový paprsek, do oka přímo dopadající popřípadě i odražený, vážně a nenávratně poškodit zrak. Rovněž při práci s výbušninami či jinými hořlavými a nestabilními materiály je nezbytné pro analýzu snížit nastavení výkonu laseru na minimum, zvolit co nejmenší množství této látky a využít k analýze vnější nástavec, aby se zabránilo, popřípadě minimalizovalo nebezpečí exploze či vzplanutí měřené látky.¹⁴

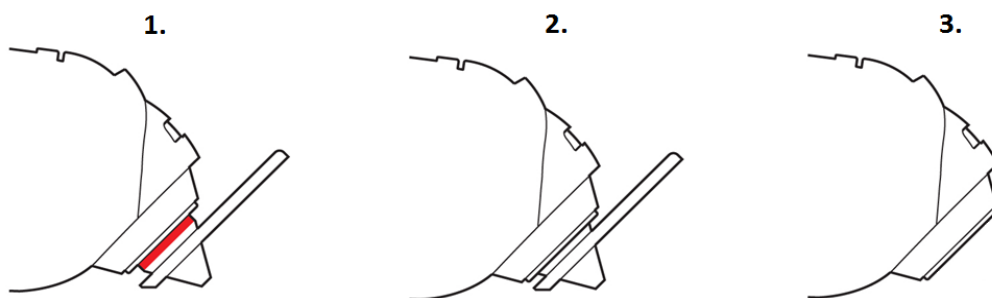


Obr. 12 Bezpečná zóna pro práci s Ramanovým spektrometrem¹⁴

3.1.2 Postup analýzy vzorků přenosným Ramanovým spektrometrem

Pro zajištění správného snímání, je důležité správné nastavení ohniska laseru při použití vnějšího konického snímacího nástavce. Ohnisko laseru je bodem, kde je soustředěný laserový paprsek nejintenzivnější a produkuje tak maximální molekulární signál. Snímací nástavec přispívá ke správnému umístění přístroje tak, aby bylo ohnisko laseru umístěno ve správné pozici pro ideální měření testovaného vzorku. U přístroje je možné nastavení snímacího nástavce do tří poloh:¹⁴

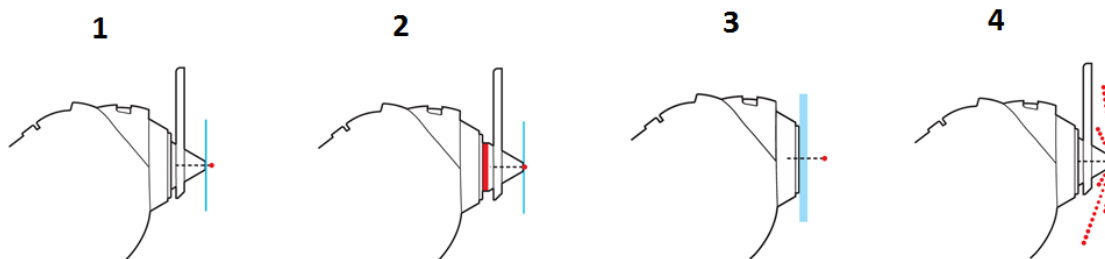
1. Snímací konický nástavec je v krajní pozici: Ohnisko laseru je na špičce snímací hlavy (krajní pozici snímacího nástavce značí oranžový pruh na snímacím nástavci).
2. Snímací konický nástavec je ve střední pozici: Ohnisko laseru je ve vzdálenosti 5 mm nad špičkou snímacího nástavce.
3. Snímací konický nástavec je sejmut: Ohnisko laseru je ve vzdálenosti 18 mm od sběrné optiky přístroje.



Obr. 13 Nastavení ohniska laseru¹⁴

Ramanův spektrometr využívá pro svou funkci laserový paprsek o vlnové délce v blízké infračervené oblasti. Toto záření proniká běžným skleněným popřípadě i plastovým obalem. Z tohoto vyplývá, že lze tímto přístrojem stanovovat látky umístěné v různých skleněných či plastových lahvích, sáčcích či jiných obalech. Podmínkou je, aby byl použitý obal průhledný. Zabarvené obaly propouštějí jen malé množství záření, což by znesnadňovalo, popřípadě zcela znemožňovalo analýzu. Při analyzování obsahu nádob a obalů tak mohou nastat 4 případy:¹⁴

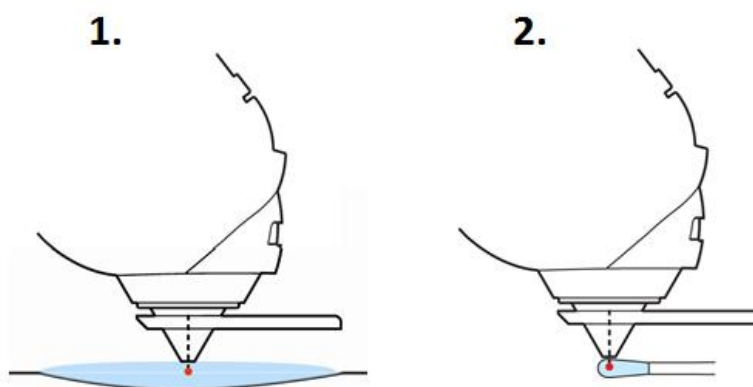
1. Tenkostěnná nádoba (3 mm a tenčí) vyrobená z transparentního plastu či čirého skla s kapalným obsahem – snímací hlavu zasunutím nastavíme do střední polohy, kdy není viditelný oranžový pruh.
2. Tenkostěnná nádoba (3 mm a tenčí) vyrobená z transparentního plastu či čirého skla s pevným obsahem – snímací hlavu vysunutím nastavíme do krajní polohy, kdy je viditelný oranžový pruh.
3. Silnostěnná nádoba (silnější než 3 mm) vyrobená z transparentního plastu či čirého skla – snímací hlavu odpojíme od přístroje a přiložíme sběrnou optiku přímo na analyzovaný obal.
4. Nádoba z neprůhledného obalu – snímání přes stěny těchto nádob není možné.



Obr. 14 Analýza vzorků ve skleněných a plastových obalech¹⁴

V případě analyzování volných kapalin mohou nastat dva případy, jak lze tyto kapaliny analyzovat:¹⁴

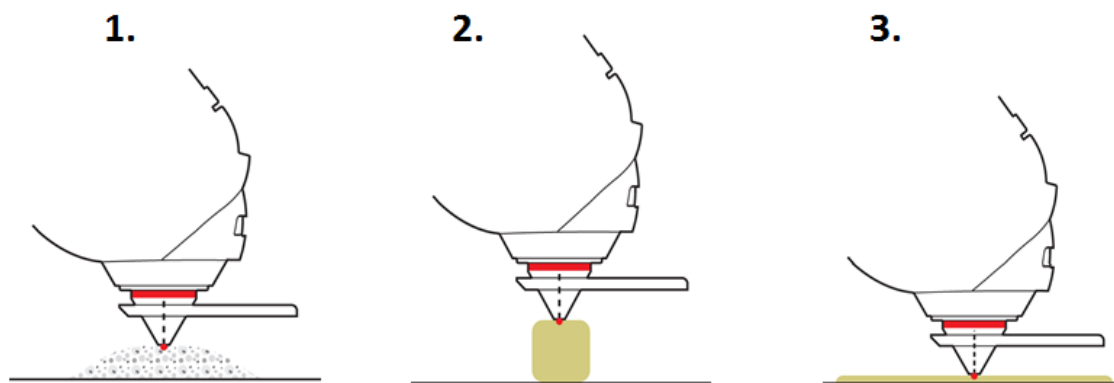
1. V případě rozlité kaluže kapaliny s hloubkou nad 5 mm umístíme snímací hlavu do střední polohy a ponoříme hrot snímacího nástavce pod hladinu kapaliny.
2. V případě tenkého filmu kapaliny či pouhých kapek, odsajeme kapalinu pomocí vatové tyčinky tak, aby byla vatová tyčinka plně nasáklá kapalinou. Snímací nástavec umístíme do střední polohy a přiložíme jej k vatové tyčince.



Obr. 15 Analýza kapalných volných kapalných vzorků¹⁴

V případě, že je zapotřebí analyzovat sypké, pevné či pastovité materiály, jsou možné 3 varianty snímání těchto vzorků:¹⁴

1. Rozsypaný materiál ve vrstvě dostatečně silné, že není vidět povrch pod ním. Umístíme snímací nástavec do krajní polohy (oranžový pruh je viditelný) a přiložíme hrot k povrchu sypkého materiálu.
2. V případě větších částic pevného materiálu, umístíme snímací nástavec do krajní polohy a přiložíme hrot nástavce k povrchu pevného vzorku.
3. Pokud je zapotřebí analyzovat tenký film pastovitého vzorku, utvoříme z materiálu větší hromádku, aby nebyl viditelný materiál podkladu. Snímací nástavec umístíme do krajní polohy a přiložíme k povrchu pastovitého materiálu.

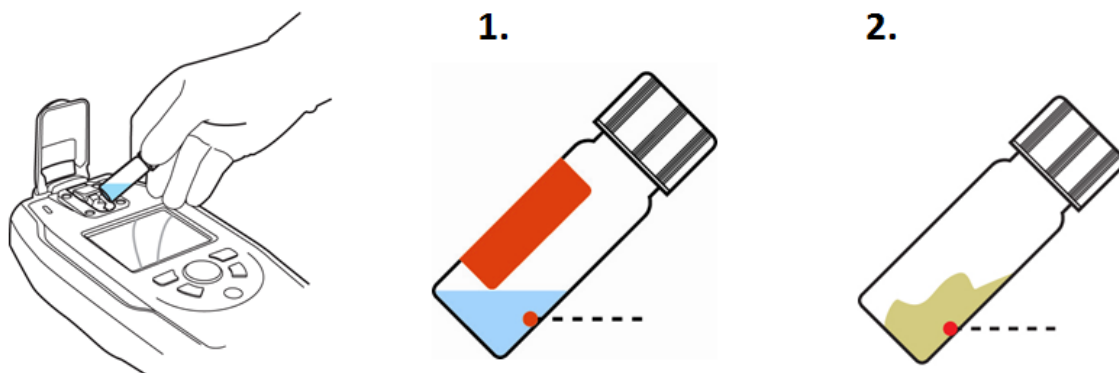


Obr. 16 Analýza volných pevných a pastovitých vzorků¹⁴

V případě, že analýza vzorku s využitím konického snímacího nástavce neposkytuje dostatečně silný molekulární signál k provedení analýzy, popřípadě je-li stanovení rušeno silnou fluorescencí, je vhodné umístit vzorek do vialky a vialku umístit do držáku vialek uvnitř přístroje. Analýza vzorků uvnitř vialek je přesnější, jelikož je stanovení méně rušeno okolním osvětlením a povrchy. V případě analýz s využitím držáku vialek je většinou maximální doba analýzy v řádu maximálně několika desítek sekund. V případě používání vnějšího nástavce může analýza trvat i několik minut, tudíž je vhodnější používat vnitřní držák vialek, je-li to možné vzhledem k povaze vzorku.¹⁴

V případě měření s využitím vnitřního držáku vialek používáme vialky o objemu 4 ml. Vialky vkládáme zasunutím do držáku vialek do slyšitelného cvaknutí. Vyndání vialky z přístroje provedeme stiskem tlačítka EJECT uvnitř držáku vialek. Vlastní analýzu provádíme dle následujícího postupu v závislosti na povaze vzorku:¹⁴

1. V případě kapalného vzorku, naplníme vialku alespoň 300 μ l vzorku tak, aby dosahoval ohniska laseru při umístění v držáku vialek, který má sklon 45°. Dále pokud je na vialce etiketa či nějaký nápis, umístíme vialku do držáku tak, aby nebyla etiketa na straně směřující dolů viz Obr. 17.
2. V případě pevného vzorku, přemístíme do vialky dostatečné množství vzorku a dbáme na to, aby byl vzorek v kontaktu se stěnou vialky a zaujímal pozici v ohnisku laseru viz Obr. 17.



Obr. 17 Analýza kapalných a pevných vzorků uvnitř držáku vialek¹⁴

3.1.3 Detailní postup ovládání přístroje

Nejprve před používáním je zapotřebí přístroj zapnout tlačítkem ON/OFF. Následně před zahájením vlastního snímání je zapotřebí zadat kód, který odemkne laser a umožní tak práci s přístrojem. Kód je zadáván po stisku klávesy ARM a je součástí dokumentace k přístroji Ahura FirstDefender. Rychlé spuštění snímání lze provést klávesou QUICK SCAN. Pro práci s přístrojem využíváme kurzorové klávesy pro pohyb v menu a výběr jednotlivých položek menu. Potvrzení volby je prováděno klávesou ENTER. Rušení volby je prováděno klávesou ESC viz Obr. 18.



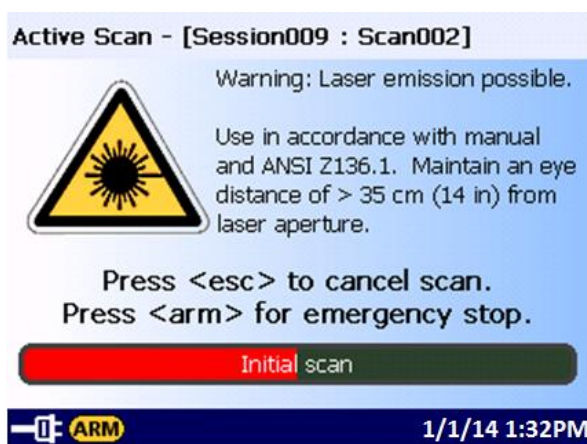
Obr. 18 Ovládací prvky Ramanova spektrometru Ahura FirstDefender

Pro zahájení analýzy vzorku vložíme vzorek do držáku vialek či přiložíme snímací konický nástavec ke vzorku. V menu přístroje pomocí kurzorových kláves zvolíme položku SCAN a klávesou ENTER potvrdíme nabídku V následujícím menu kurzorovými klávesami zvolíme nabídku Go a stiskem klávesy ENTER zahájíme vlastní analýzu viz Obr. 19.



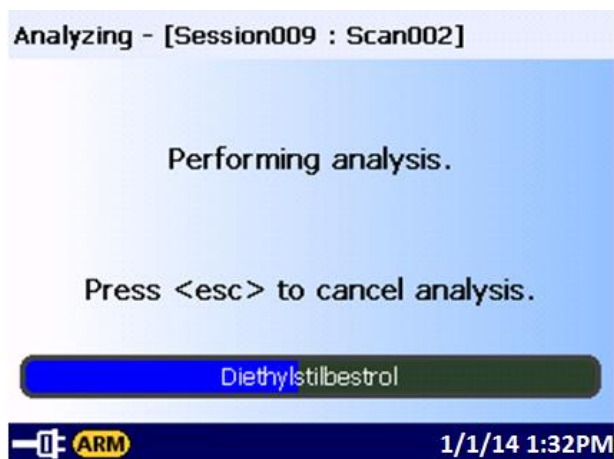
Obr. 19 Hlavní menu Ramanova spektrometru Ahura FirstDefender

Po spuštění analýzy se rozsvítí varovné oranžové diody, umístěné v horní části přístroje po stranách držáku vialek. Během vlastního měření je na obrazovce přístroje zobrazeno varování s nejmenší doporučenou bezpečnou vzdáleností operátora od přístroje a je zde také zobrazen aktuální průběh měření. V horní části obrazovky je volitelně umístěna stupnice síly molekulárního signálu a případně také stupnice zobrazující úroveň rušení analýzy vlivem fluorescence. Ve spodní stavové stupnici je zobrazen i přibližný průběh analýzy a je zde možné odečíst odhadovaný čas zbývající k dokončení analýzy viz Obr. 20.



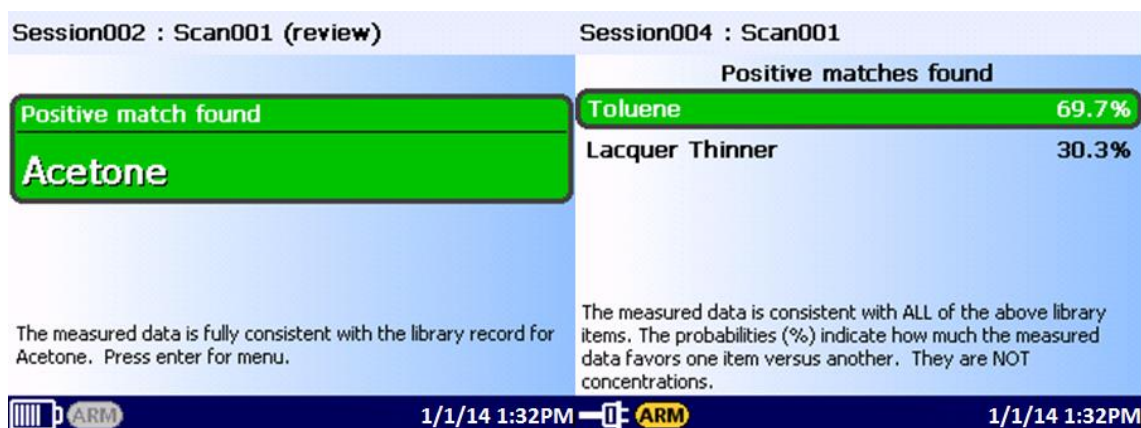
Obr. 20 Obrazovka probíhající analýzy¹⁴

Po změření ukončení měření pohasnou kontrolní oranžové diody a na obrazovce přístroje je zobrazen aktuální průběh prohledávání databáze a porovnávání naměřeného spektra se záznamy z databáze viz Obr. 21.



Obr. 21 **Obrazovka probíhajícího vyhodnocení naměřeného spektra**

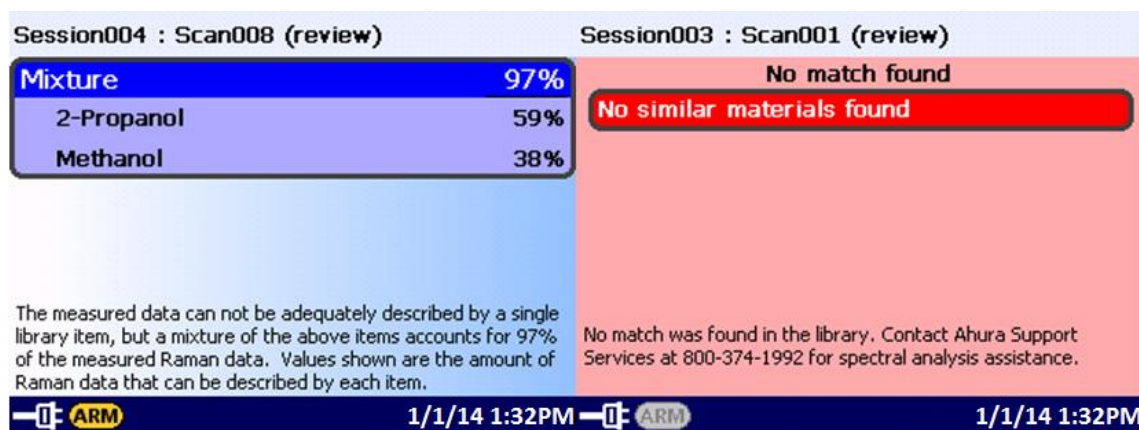
Po ukončení prohledávání databáze je, v případě nalezení shody naměřeného spektra s databázovým záznamem, v horní části obrazovky přístroje zobrazen název chemické látky, která byla spektrometrem identifikována. V případě nalezení více shodných výsledků jsou v sestupném pořadí zobrazeny názvy potenciálně identifikovaných látek s vyjádřením procentuální možnosti shody naměřené látky se záznamem z databáze viz Obr. 22.



Obr. 22 **Výsledky pozitivní analýzy měřeného vzorku**

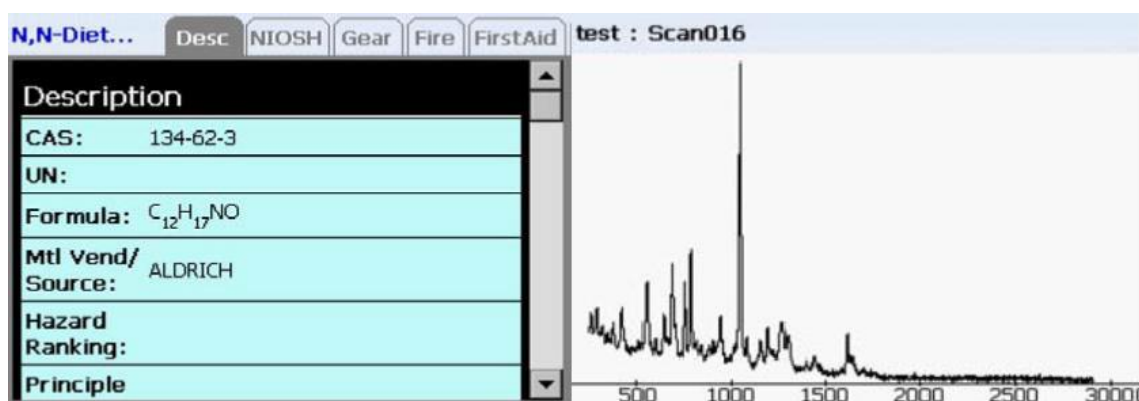
Pokud je během analýzy nalezeno v měřeném vzorku více látek, zobrazí přístroj upozornění na nález směsi a dle intenzity odezvy jednotlivých složek určí přibližné procentuální zastoupení jednotlivých složek v měřené směsi. V případě že přístroj nenalezne žádnou shodu měřeného spektra se záznamy z databáze, je na obrazovce přístroje zobrazeno varování, že nebyla nalezena žádná odpovídající látka. V tomto případě může být důvodem, buď velice slabý signál měřené látky, nebo velké rušení

stanovení fluorescencí, popřípadě daná databáze neobsahuje spektrum měřené látky viz Obr. 23. V případě, kdy je přístroj schopen změřit spektrum dané látky s dostatečnou přesností, ale není nalezena shodná látka z databáze, je možné daný scan uložit do databáze přístroje (známe-li měřenou látku) a tím je přístroj schopen v budoucnu danou látku rozpoznat jak v čistém stavu, tak v případě směsi.



Obr. 23 Výsledky analýzy při identifikaci směsi a negativního výsledku analýzy

V případě pozitivní identifikace dané látky, lze z menu přístroje vyvolat záznamy z databáze obsahující podrobné informace o identifikované látce, zejména je zde uveden vzorec, číslo CAS, dále jsou zde uvedeny základní údaje charakteru a nebezpečnosti identifikované látky, zda je náchylná k výbuchu či k vzplanutí, dále je zde uvedena nebezpečnost látky pro zdraví člověka či nebezpečnost pro životní prostředí a rovněž jsou zde uvedeny možnosti nakládání s danou látkou a její likvidace. Rovněž je zde možnost zobrazit měřené spektrum dané látky. Naměřené spektrum lze uložit jako obrázek ve formátu JPG obsahující graf a údaje o identifikované látce popřípadě lze spektrum exportovat jako soubor SPC, který je možné načíst v počítačovém softwaru pro zpracování spektrofotometrických dat viz Obr. 24.



Obr. 24 Detailní popis analyzované látky a její měřené spektrum

3.2 Kalibrace Ramanova spektrometru

Součástí této práce je vytvoření kalibrace methanol-ethanol ke kvantitativnímu stanovení obsahu methanolu v alkoholických nápojích. Popudem k vytvoření této kalibrace byl zejména zvýšený výskyt trvalého poškození zdraví a dokonce i několik desítek případů úmrtí po požití alkoholických nápojů kontaminovaných zejména methanolem. Během této methanolové aféry byl rovněž zjištěn zvýšený výskyt nelegálně distribuovaných alkoholických nápojů, které byly vyráběny nedokonalým přečištěním denaturovaných alkoholů, zejména se jednalo o denaturační směsi dle Přílohy č. 2 vyhlášky č. 141/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů²⁹. Těmito směsmi byla denaturační směs č. 13 obsahující jako denaturační činidlo isopropylalkohol, dále denaturační směs č. 14 obsahující methanol a následně denaturační směsi č. 1a, 19, 20 a 21 obsahující denaturační činidlo Bitrex (denatonium benzoát). Vytvoření kalibrace pro Ramanův spektrometr tak bude sloužit k rychlejšímu vyloučení či potvrzení nebezpečnosti distribuovaných alkoholických nápojů i bez nutnosti otevření obalu. Tato rychlá identifikace tak může pomoci v ochraně zdraví populace.

Součástí kalibrace Ramanova spektrometru je vytvoření kalibrační řady pro nejběžnější alkoholické nápoje s objemovým obsahem 40% ethanolu. Celkově budou vytvořeny dvě kalibrační řady. První kalibrační řada je sestavena pro vyšší obsahy methanolu ve 40% roztoku ethanolu viz Tabulka 1. Druhá kalibrační řada je vytvořena zejména pro nižší obsahy methanolu ve 40% ethanolu pro přesnější stanovení, zda alkohol splňuje legislativní požadavky na obsah methanolu dle Nařízení č. 110/2008/ES³⁰ viz Tabulka 2.

Tabulka 1 **Kalibrační řada pro vyšší obsahy methanolu ve 40% alkoholu**

Methanol [obj. %]	0	5	10	15	20	25	30	35	40
Ethanol [obj. %]	40	35	30	25	20	15	10	5	0

Tabulka 2 **Kalibrační řada pro nižší obsahy methanolu ve 40% alkoholu**

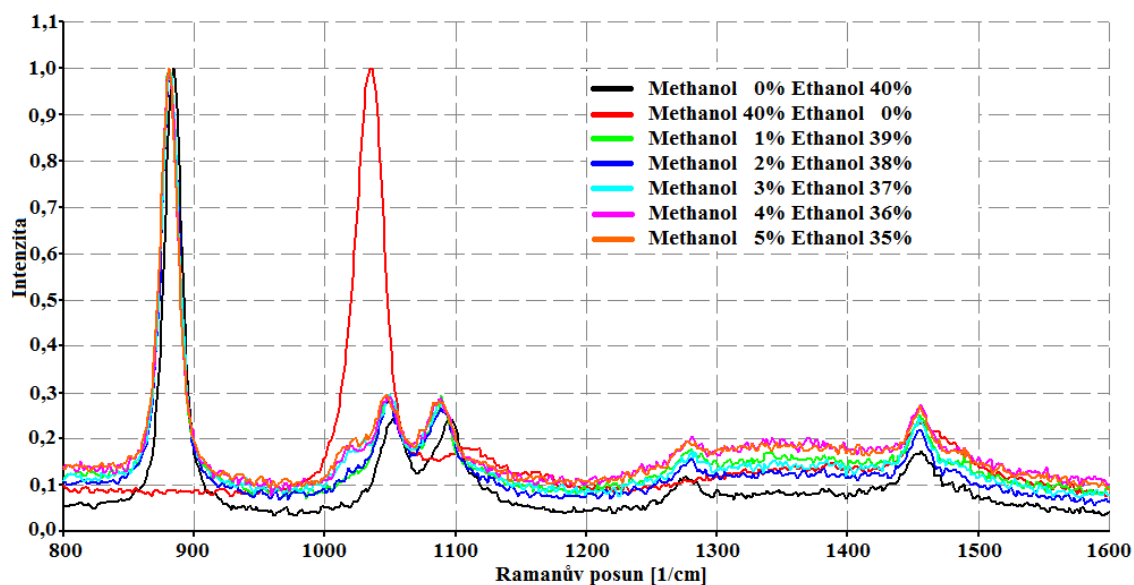
Methanol [obj. %]	0	1	2	3	4	5
Ethanol [obj. %]	40	39	38	37	36	35

Součástí kalibrace bude také ověření schopnosti přístroje detekovat přítomnost isopropylalkoholu a denatonium benzoátu v denaturovaném lihu.

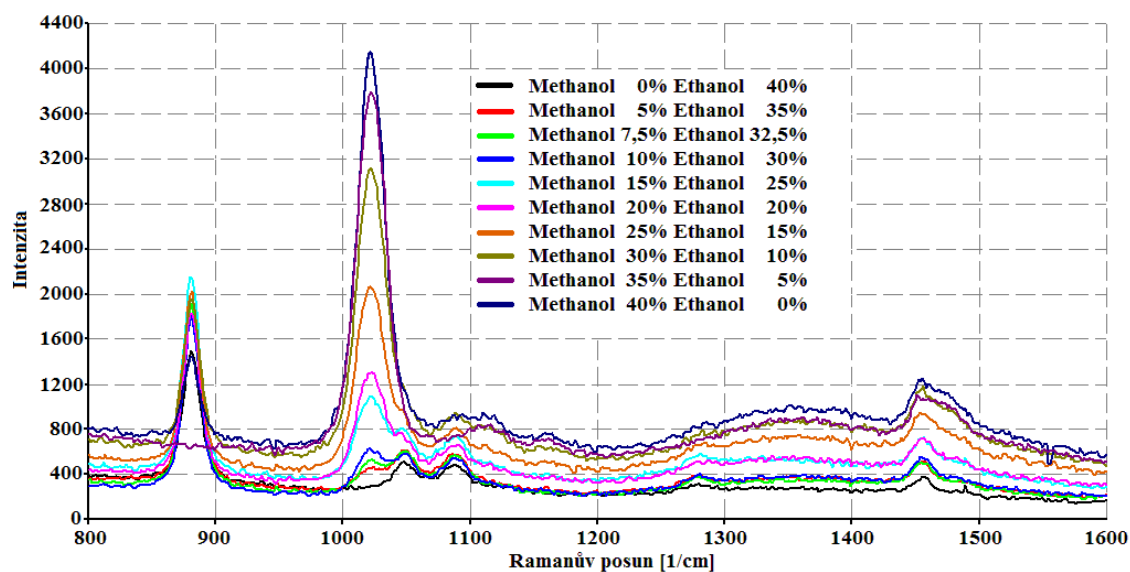
3.3 Stanovení složení alkoholických nápojů s využitím Ramanova spektrometru

Nespornou výhodou při analýze alkoholů s využitím Ramanovy spektrometrie je fakt, že alkoholy obsahují zejména vodu a jelikož má voda velmi slabý signál v Ramanových spektrech, lze tak bez většího rušení stanovit ostatní složky alkoholů, zejména pak ethanol, ale také ostatní látky, kterými mohou být alkoholy kontaminované. Těmito látkami jsou zejména methanol, isopropylalkohol, n-butanol, tzv. přiboudliny a další látky.

Příklady naměřených spekter kalibrace pro nižší obsahy alkoholu je vidět na vybraném úseku spektra na Obr. 25. Na vlnočtu $1035,8 \text{ cm}^{-1}$ je již v případě nižších obsahů methanolu patrný rostoucí charakteristický peak methanolu, který je posunutý oproti charakteristickému peaku ethanolu na vlnočtu $883,9 \text{ cm}^{-1}$. Ještě lépe je tato skutečnost patrná na vybraném úseku spektra kalibrace vyšších obsahů methanolu na Obr. 26. Z grafu je dobře patrné jak rostoucí obsah methanolu se odráží ve výšce naměřeného charakteristického peaku methanolu.

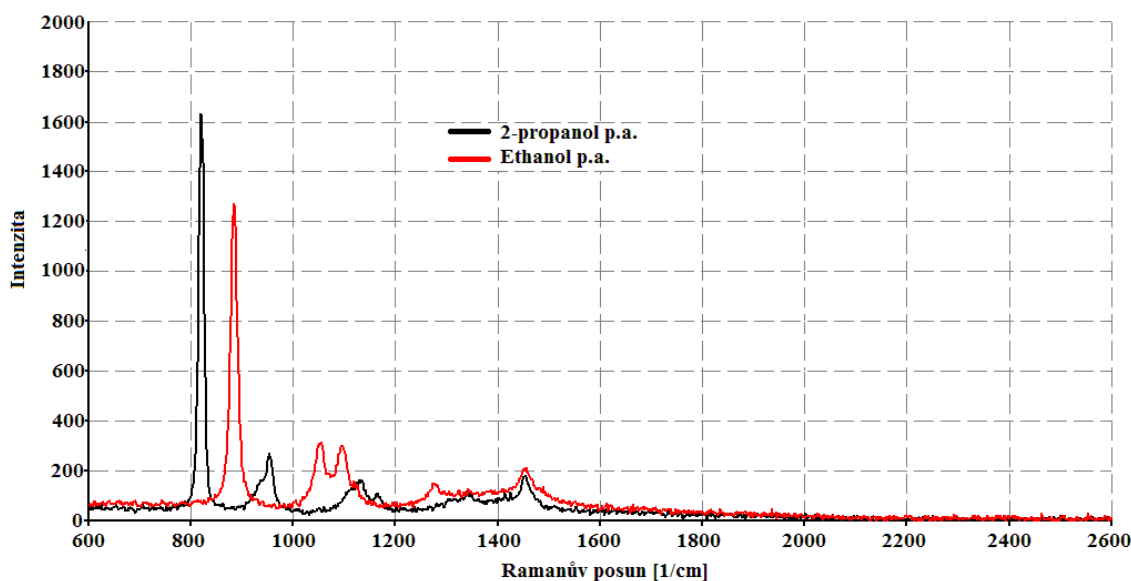


Obr. 25 Vybraný úsek spektra s charakteristickými peaky methanolu a ethanolu kalibrační řady pro nižší obsahy methanolu



Obr. 26 Vybraný úsek spektra s charakteristickými peaky methanolu a ethanolu kalibrační řady pro vyšší obsahy methanolu

Na Obr. 27 je pak na vybraném úseku spektra vidět rozdíl v naměřeném spektru ethanolu a 2-propanolu, který je součástí denaturovaných alkoholů. Je zde dobře patrné, že charakteristické peaky obou těchto chemických látek jsou oproti sobě výrazně posunuty a lze tak škodlivý 2-propanol již vizuálním pohledem na spektrum bezpečně od ethanolu odlišit.



Obr. 27 Vybraný úsek spektra s charakteristickými peaky 2-propanolu a ethanolu

3.4 Identifikace neznámých látek pomocí Ramanova spektrometru

Součástí této práce je ověření schopnosti Ramanova spektrometru identifikovat několik druhů neznámých látek, zejména pak čirých roztoků a bílých prášku, které sensoricky člověk nedokáže rozlišit. Na Obr. 28 jsou zobrazeny příklady testovaných látek. Jedná se o 10 čirých roztoků, které jak je z obrázku patrné, nelze vizuálně rozlišit. Dále je zde zobrazen příklad 10 bílých prášků, které je opět nesnadné okem rozlišit. V obou případech vizuální identifikace selhává, rovněž tak určení pomocí čichu nelze brát příliš v potaz a také se nedoporučuje čichat k neznámým látkám, které by mohli být toxické již při inhalaci výparů. Rovněž rozlišení látek pomocí chuti nelze v případě chemických látek provádět s ohledem na jejich potenciální toxicitu. Z tohoto postu byl k analýzám použit Ramanův spektrometr, který byl schopen neznámé látky přesně identifikovat v řádu několika málo sekund.

Dále bylo analyzováno několik běžně dostupných léků k ověření přítomnosti účinné látky v daném léku viz Obr. 28. V kapitole Příloha č. 4 – Analýza neznámých látek, jsou pak zobrazeny vybrané úseky měřených spekter těchto neznámých vzorků. Jednotlivé analyzované vzorky jsou dle čísla uvedena v Tabulka 3.



Obr. 28 Testované neznámé vzorky čirých kapalin, bílých prášků a léků

Tabulka 3 Identifikované neznámé vzorky čirých kapalin, bílých prášků a léků

Neznámý kapalný čirý vzorek č.	Identifikovaná látka	Neznámý pevný bílý vzorek č.	Identifikovaná látka
1	Xylen	8	Sulfonamid
2	Benzen	9	Uhličitan sodný
7	Chloroform	14	Ethylendiamid tetraoctová kyselina (EDTA)
11	Tetrahydrofuran	17	Sulfid barnatý
37	Dichlormethan	20	Diamantan (C ₁₄ H ₂₀)
38	Aceton	21	Adamantan (C ₁₀ H ₁₆)
39	Toluen	25	Octan vápenatý
42	Polyvinyl	28	Siřičitan sodný

	pyrollidon		
43	1-hexanol		44
46	Tetraethyl orthosilikát		45
			Kys. citronová
			Škrob
Neznámé léky č.			
Identifikovaná látka			
A	Ibuprofenum		
B	titanová běloba, uhličitan vápenatý		
C	Acetaminophen (Paracetamol)		

3.5 Základní interpretace Ramanových spekter

Aby bylo možné interpretovat spektra měřených látek, je důležité nejprve určit intenzivní charakteristické peaky, které odpovídají vibracím vyvolaných specifickými funkčními skupinami a jejich vazbami. Intenzita peaků v Ramanově spektru je určena změnou polarizovatelnosti během vibrace. Dána je vztahem:³¹

$$I \propto \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2 \quad (10)$$

Kde α = polarizovatelnost

Q = normální souřadnice

Polarizovatelnost α měří míru snadnosti, s níž vnější elektrické pole může vyvolat dočasný dipólový moment. Tak měří snadnost, s jakou může být elektrický náboj molekuly přesunut. Polarizovatelnost je velká, když je velká koncentrace volných elektronů v molekule. Experimentálně bylo ověřeno, že když je poměr $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)$ velký, dostáváme pak relativně intenzivní Ramanovy vazby.³¹ Například:

- Násobné vazby: $C \equiv C$, $-C \equiv N$, $C=C$, $C=O$. V případě těchto vazeb je velká koncentrace elektronové hustoty mezi atomy a tím je při vibraci způsobeném protažení vazeb získán silný Ramanův signál.³¹
- Cl, Br a I atomy. Tyto atomy mají elektrony umístěné ve vnější slupce a jsou drženy poměrně volně a mohou tak být vloženým elektrickým polem posunuty. Vibrace vyvolávající protažení a ohyb vazeb vyvolaných těmito atomy jsou většinou intenzivní.³¹

- c) Ostatní mnoha elektronové atomy: S, Hg a další těžké kovy. Zde jsou opět elektrony ve vnější slupce drženy relativně slabě. Vibrace vyvolávající protažení vazeb vyvolané těmito atomy jsou pak relativně intenzivní.³¹
- d) Naopak u vazeb, které jsou silně polární, intenzita Ramanových linií má tendenci být slabá, jelikož jsou elektrony pevně drženy elektronegativním atomem. Protažení vazeb vyvolané skupinami O-H a C-F jsou velmi slabé v Ramanových spektrech, naproti tomu v infračervených spektrech jsou velmi intenzivní.³¹
- e) Vylučující pravidla: Pro molekuly se středovou souměrností, které jsou aktivní v infračervené spektrometrii, jsou zakázané v Ramanových spektrech a naopak.³¹
- f) Ramanova spektra mají tendenci být více citlivá na strukturu molekuly, naproti tomu infračervená spektra jsou více citlivá na funkční skupiny připojené ke struktuře.³¹

Příklady porovnání intenzity odezvy pro vybrané funkční skupiny a vazby v infračervené spektrometrii a Ramanově spektrometrii jsou uvedeny v Tabulka 4.

Tabulka 4 IČ vs. Ramanovy intenzity skupin³²

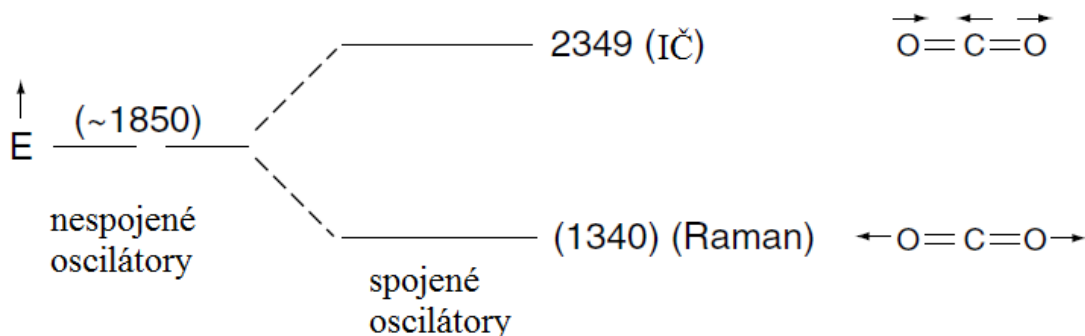
Slabá v IČ, silné v Ramanových spektrech	Intenzivní v IČ, slabé v Ramanových spektrech	Intenzivní v IČ i v Ramanových spektrech
C≡C protažení	C-F protažení	-C≡N protažení
C=C protažení	O-H protažení	>C=N protažení
N=N protažení	N-H protažení	C-Cl protažení
S-H protažení	C-H mimo rovinu ohybu	-NO ₂ protažení
C=S protažení		
C-S protažení		
S-S protažení		
CH ₂ kroucení		

Vybrané Ramanovy skupiny frekvencí, které mohou být užitečné v problematických sekcích:³³

- a) C=C protažení – velmi silné v Ramanových spektrech: $1680 - 1630 \text{ cm}^{-1}$.^{cit. 33}
- b) Fenylové sloučeniny – velmi silné v Ramanových spektrech pro mono-, 1,3-, a 1,3,5-substituenty: $1000 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$.^{cit. 33}
- c) C-CH₃ – symetrická deformace na vlnočtu $1375 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ je viditelná v Ramanových spektrech pokud je methylová skupina vázána na nesaturovaný uhlík (například: aromát -CH₃, =C-CH₃ nebo ≡C-CH₃). Pokud je methylová skupina vázána na saturovaný uhlík, je Ramanův signál extrémně slabý.³³

Dosud byla popsána Ramanova spektra s ohledem na jednotlivé funkční skupiny a nyní si ukažme, jak budou vypadat Ramanovy linie, když bude v molekule přítomno více vazeb a tudíž se bude jednat o spojování vibrací. Pro ilustraci si uvedeme spojování vibrací prvního řádu na symetrické molekule CO₂.³³

Molekulu CO₂ si lze představit jako dva identické harmonické oscilátory (C=O) sdílející centrální uhlíkový atom. Pokud dojde při vibraci k protažení jedné vazby, způsobí pohyb uhlíkového atomu kompresi druhé vazby čímž je tato vazba zapojena do vibrace. Výsledkem této interakce je spojení dvou původních energetických stavů tvořících dva nové stavy, jeden s vyšší energií a druhý s nižší energií.³³



Obr. 29 Spojené oscilátory prvního řádu v molekule CO₂ (uvedené číselné hodnoty jsou v jednotkách cm⁻¹)³³

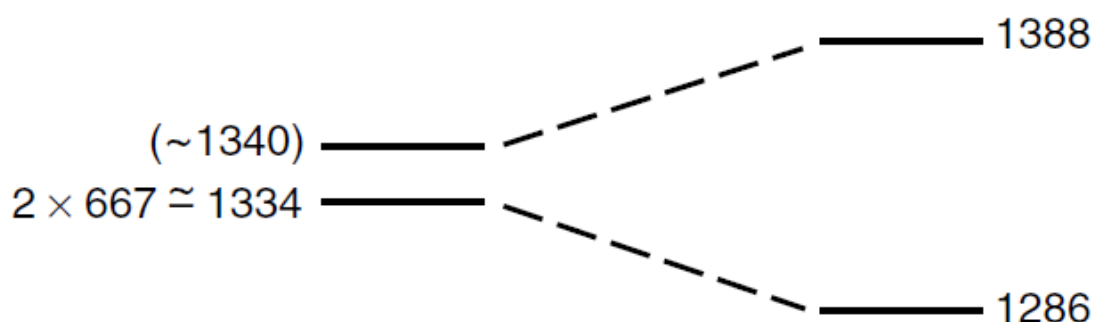
Spojování prvního řádu se objevuje u frekvencí mnoha významných skupin:

- a) Protažení všech kumulovaných dvojných vazeb X=Y=Z
- b) Protažení u skupin XY₂ včetně skupiny -CH₂-
- c) Protažení u skupin XY₃ včetně skupiny -CH₃-
- d) Deformace u vazby skupiny XY₃

e) Skupina N-H v rovině ohybu sekundárních amidů

V molekulách se nicméně také uplatňuje spojování druhého řádu nazývané Fermiho rezonance. Tento jev lze opět dobře ilustrovat na molekule CO_2 . Opět se jedná o interakci dvou stavů s rozdělením výsledné energie, ale s tím rozdílem, že jeden ze stavů je součtem frekvencí (například: $\nu_a + \nu_b$, $2\nu_a + \nu_b$, $\nu_a + \nu_b + \nu_c$) a druhý je harmonickým násobkem frekvencí (například: $2\nu_a$, $3\nu_a$, $4\nu_a$). Součet frekvencí a násobky jsou kvůli neharmonickým podmínkám potenciální funkcí. Fermiho rezonance tak závisí na neharmonických podmínkách, což je příčinou interakce druhého řádu.³³

V molekule CO_2 je hypoteticky aktivní Ramanova vazba na vlnočtu 1340 cm^{-1} . Nicméně ve skutečnosti má tato molekula dva pásy s téměř stejnou intenzitou na vlnočtu 1286 cm^{-1} a 1388 cm^{-1} . Tento jev vysvětlil až Enrico Fermi. Nerušené symetrické protažení by bylo na 1340 cm^{-1} . Ohyb v molekule CO_2 je aktivní na vlnočtu 667 cm^{-1} tudíž bude první násobek frekvence o něco menší než $2 \times 667 = 1334 \text{ cm}^{-1}$. Jelikož je tato hodnota blízko vlnočtu 1340 cm^{-1} , rozdělí se tento mix dvou stavů, tak jak je ukázáno na Obr. 30. Toto rozdělení o 102 cm^{-1} je však nezvykle velké pro Fermiho rezonanci, která většinou dosahuje nižších hodnot.³³



Obr. 30 Interakce druhého řádu (Fermiho rezonance) v molekule CO_2 (uvedené číselné hodnoty jsou v jednotkách cm^{-1})³³

Fermiho rezonance musí však splňovat 3 podmínky:

- Frekvence prvního řádu musí být blízko sebe (typicky je vzdálenost menší než 30 cm^{-1})³³
- Základní, harmonické nebo součtové frekvence musí mít stejnou symetrii ve smyslu teorie grup³³
- Musí být nějaký mechanismus pro interakci, z tohoto důvodu nemohou být vibrace lokalizovány v různých částech molekuly. Například u molekuly CO_2 způsobí ohyb molekuly malé odstrčení kyslíkových atomů od sebe,

pokaždé když prochází atom uhlíku rovnovážnou polohou, k čemuž dochází dvakrát za cyklus ohybu.³³

Fermiho rezonance tak způsobuje posun vazeb z jejich normálních pozic.

Abychom vůbec byli schopni rozklíčovat naměřená Ramanova spektra, lze jako základní pomůcku pro interpretaci Ramanova spektra využít následující tabulku obsahující vlnočty pro charakteristické vibrace základních funkčních skupin viz Tabulka 5.

Tabulka 5 **Charakteristické vlnočty vibrací pro nejběžnější funkční skupiny**³⁴

Vlnočet [cm^{-1}]	Vibrace	Skupina
480-510	SS protažení	dialkyl, disulfid
615-630	kruhová deformace	monosubstituent benzenu
650-660	CCl protažení	primární chlorované alkany
620-715	CS protažení	dialkyl, disulfid
585-740	CS protažení	alkyl, sulfidy
820-825	C ₃ O protažení skeletu	sekundární alkoholy
720-830	vibrace kruhu	para-disubstituenty benzenu
749-835	protážení skeletu	isopropyl
877	OO protažení	peroxid vodíku
850-900	symetrické CNC protažení	sekundární aminy
837-905	CC protažení skeletu	n-alkany
830-930	symetrické COC protažení	alifatické ethery
990-1010	trigonální „dýchání“ kruhu	mono-substituenty benzenu
990-1010	trigonální „dýchání“ kruhu	meta-substituenty benzenu
1015-1030	CH rovinná deformace	mono-substituenty benzenu
1020-1060	vibrace kruhu	ortho-disubstituenty benzenu
950-1150	CC protažení	n-alkany
1188-1196	symetrické SO ₂ protažení	alkyl sulfáty
1205	C ₆ H ₅ -C vibrace	alkyl benzeny
1200-1230	vibrace kruhu	para-disubstituenty benzenu
1251-1270	CH rovinná deformace	<i>cis</i> -dialkyl ethyleny
1295-1305	CH ₂ fázové kroucení	n-alkany
1175-1310	CH ₂ kroucení	n-alkany
1290-1314	CH rovinná deformace	<i>trans</i> -dialkyl ethyleny
1330-1350	CH deformace	isopropyl
1368-1385	CH ₃ symetrická deformace	n-alkany
1370-1390	protážení kruhu	naftaleny

1385-1415	protažení kruhu	antraceny
1465-1466	CH ₃ deformace	n-alkany
1446-1473	CH ₃ , CH ₂ deformace	n-alkany
1550-1630	protažení kruhu (doublet)	deriváty benzenu
1590-1650	NH ₂ nůžková	primární aminy
1649-1654	symetrické C=O protažení	karboxylové kyseliny (cyklické dimery)
1700-1725	C=O protažení	alifatické ketony
1720-1740	C=O protažení	alifatické aldehydy
2100-2160	C=C protažení	alkyl acetyleny
2232-2251	C=N protažení	alifatické nitrily
2231-2301	C≡C protažení	dialkyl acetyleny
2560-2590	SH protažení	thioly
2849-2861	symetrické CH ₂ protažení	n-alkany
2883-2884	symetrické CH ₃ protažení	n-alkany
2912-2929	antisymetrické CH ₂ protažení	2 n-alkany
2965-2969	antisymetrické CH ₃ protažení	n-alkany
3000-3100	aromatické CH protažení	deriváty benzenu
3330-3400	vazebné antisymetrické NH ₂ protažení	primární aminy

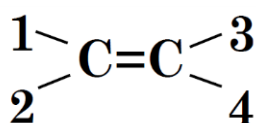
Jak již bylo dříve zmíněno, lze Ramanovu spektrometrii vnímat jako doplňkovou metodu k infračervené spektrometrii. V následující tabulce jsou pak uvedeny charakteristické vlnočty vibrací pro specifické funkční skupiny s důrazem na intenzitu odezvy v Ramanově a infračervené spektrometrii viz Tabulka 6.

Tabulka 6 Charakteristické vibrace funkčních skupin a porovnání intenzity odezvy pro Ramanovu a infračervenou spektrometrii³⁵

Funkční skupina / vibrace	Vlnočty [cm ⁻¹]	Raman	IČ
Mřížové vibrace v krystalech	10 - 200	silná	silná
δ(CC) alifatické řetězce	250 - 400	silná	slabá
ν(Se-Se)	290 - 330	silná	slabá
ν(S-S)	430 - 550	silná	slabá
ν(Si-O-Si)	450 - 550	silná	slabá
ν(Xkov-O)	150-450	silná	slabá
ν(C-I)	480 - 660	silná	silná
ν(C-Br)	500 - 700	silná	silná
ν(C-Cl)	550 - 800	silná	silná
ν(C-S) alifatické	630 - 790	silná	střední

$\nu(\text{C-S})$ aromatické	1080 - 1100	silná	střední
$\nu(\text{O-O})$	845 - 900	silná	slabá
$\nu(\text{C-O-C})$	800 - 970	střední	slabá
$\nu(\text{C-O-C})$ asymetrická	1060 - 1150	slabá	silná
$\nu(\text{CC})$ alicyklické, alifatické řetězové vibrace	600 - 1300	střední	střední
$\nu(\text{C=S})$	1000 - 1250	silná	slabá
$\nu(\text{CC})$ aromatické kruhové řetězové vibrace	1580, 1600	silná	střední
	1450, 1500	střední	střední
	1000	silná/střední	slabá
$\delta(\text{CH}_3)$	1380	střední	silná
$\delta(\text{CH}_2)$ $\delta(\text{CH}_3)$ asymetrické	1400 - 1470	střední	střední
$\delta(\text{CH}_2)$ $\delta(\text{CH}_3)$ asymetrické	1400 - 1470	střední	střední
$\nu(\text{C-(NO}_2))$	1340 - 1380	silná	střední
$\nu(\text{C-(NO}_2))$ asymetrické	1530 - 1590	střední	silná
$\nu(\text{N=N})$ aromatické	1410 - 1440	střední	-
$\nu(\text{N=N})$ alifatické	1550 - 1580	střední	-
$\delta(\text{H}_2\text{O})$	~1640	slabá široká	silná
$\nu(\text{C=N})$	1610 - 1680	silná	střední
$\nu(\text{C=C})$	1500 - 1900	silná	slabá
$\nu(\text{C=O})$	1680 - 1820	střední	silná
$\nu(\text{C}\equiv\text{C})$	2100 - 2250	silná	slabá
$\nu(\text{C}\equiv\text{N})$	2220 - 2255	střední	silná
$\nu(\text{-S-H})$	2550 - 2600	silná	slabá
$\nu(\text{C-H})$	2800 - 3000	silná	silná
$\nu(=\text{C-H})$	3000 - 3100	silná	střední
$\nu(\cong\text{C-H})$	3300	slabá	silná
$\nu(\text{N-H})$	3300 - 3500	střední	střední
$\nu(\text{O-H})$	3100 - 3650	slabá	silná

V případě násobné vazby jsou vlnočty charakteristických vibrací ovlivněny polohou substituentů na násobné vazbě. Jako příklad budou uvedeny charakteristické vlnočty pro specifické substituenty vinylové skupiny (ethenu) v závislosti na poloze vzhledem k násobné vazbě viz Obr. 31.



Obr. 31 Substituenty vinylové skupiny³⁵

Příklady vlivu substituentů vinylové skupiny na výsledný vlnočet jsou prezentovány v tabulkách 7 - 9.

Tabulka 7 Vlnočty funkčních skupin cis a trans izomerů ethenu³⁵

1,3 = H (cis izomery)		
2	4	Vlnočet [cm⁻¹]
CH ₃ -	CH ₃ -	1662
CH ₃ CH ₂ -	CH ₃ -	1658
(CH ₃) ₂ CH-	(CH ₃) ₂ CH-	1649
CH ₃ CH ₂ -	C(CH ₃) ₃ -	1650
C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	1629
OCH ₃ -	OCH ₃ -	1672
Cl-	Cl-	1591
Br-	Br-	1587
COOH	COOH	1631, 1697
CH ₃ -	CH ₃ (CH ₂) ₄ -	1655
CH ₃ -	CH ₃ CH ₂ SS-	1612
1,4 = H (trans izomery)		
2	3	Vlnočet [cm⁻¹]
CH ₃ -	CH ₃ -	1676
CH ₃ CH ₂ -	CH ₃ -	1673
(CH ₃) ₂ CH-	(CH ₃) ₂ CH-	1663
CH ₃ CH ₂ -	C(CH ₃) ₃ -	1659
C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	1648
OCH ₃ -	OCH ₃ -	1666
Cl-	Cl-	1579
Br-	Br-	1582
COOH	COOH	1683

Tabulka 8 Vlnočty charakteristických substituentů ethenu³⁵

1	2	3	4	Vlnočet [cm⁻¹]
H-	H-	CH ₃ -	CH ₃ -	1658
H-	H-	CH ₃ -	CH ₃ CH ₂ -	1649
H-	H-	CH ₃ -	CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	1649
H-	H-	CH ₃ -	C ₆ H ₅ -	1634
H-	H-	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ -	1610
H-	H-	Cl-	Cl-	1612
H-	Cl-	Cl-	Cl-	1582
H-	CH ₃ -	CH ₃ -	CH ₃ CH ₂ -	1669
H-	CH ₃ -	CH ₃ -	CH ₃ -	1680
CH ₃ -	CH ₃ -	CH ₃ -	CH ₃ -	1676
Cl-	Cl-	Cl-	Cl-	1572
CN-	CN-	CN-	CN-	1567

Tabulka 9 Vlnočty substituentů ethenu v poloze 4 ^{cit. 35}

1, 2, 3 = H	
4	Vlnočet [cm⁻¹]
C ₆ H ₅ -	1625
C ₆ H ₅ CH ₂ -	1635
C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂ -	1648
CN-	1607
CNCH ₂ -	1646
Cl-	1607
Br-	1601
I-	1581
CH ₂ Cl-	1650
CH ₂ Br-	1630
HOCH ₂ -	1644
CH ₃ CHOHCH-	1644
OCNCH ₂ -	1645
(CH ₃) ₃ C-	1641
CH ₃ COO-	1635
1, 2, 3 = H	
4 = nerozvětvený alkan	
Počet uhlíků na 4 pozici	Vlnočet [cm⁻¹]
0	1623
1	1651
2	1645
3	1641
4	1638
5	1640
6	1642
7	1641
10	1641
11	1637
14	1642
16	1641

4 Didaktická část

4.1 Didaktické využití Ramanovy spektrometrie ve výuce

Ramanova spektrometrie nalézá své značné uplatnění zejména při výuce teorie struktury látek, kdy napomáhá lepšímu pochopení vazebných sil, délek vazby a pohybů vazeb v důsledku vnějšího působení. Jelikož je tato technologie založena na změnách polarizovatelnosti vazeb, může tak sloužit k lepšímu výkladu a snazšímu pochopení principů polarizovatelnosti vazby molekul.

Nepopiratelnou výhodou je také možnost přímého předvedení této spektrofotometrické techniky a informování o využití této technologie v běžném životě zejména složkami integrovaného záchranného systému. Tyto praktické zkušenosti s odkazy na reálné každodenní využití v reálném životě mohou u žáků vést ke zvýšení zájmu o studium dané problematiky a její lepší zapamatování.

4.2 Využití Ramanova spektrometru při výuce chemie

Ramanova spektrometrie a zejména pak Ramanovy spektrometry, ač stále představují značně finančně náročnou investici, jsou bezesporu velkým přínosem pro výuku chemie jak již na středních školách tak i na školách vysokých.

Ramanovy spektrometry pak najdou uplatnění při laboratorních pracích pro identifikaci neznámých látek, tak své uplatnění najdou i při teoretickém výkladu.

V případě laboratorních prací mohou Ramanovy spektrometry sloužit jako podpůrný prostředek při analytických laboratořích pro ověření látek stanovovaných během kvalitativního zjišťování přítomnosti konkrétních látek, prvků, funkčních skupin a iontů zejména při anorganických a organických laboratorních pracích. Rovněž mohou Ramanovy spektrometry výraznou měrou přispět ke kvantitativnímu stanovení množství jednotlivých složek zkoumaných roztoků i vzorků pevných látek. Zejména pak při stanovování složitějších směsí.

Při výkladu teorie může pochopení principů Ramanovy spektrometrie vést k lepšímu pochopení struktury látek a jejich složení. Rovněž možnost praktických ukázek s odkazy na nejběžnější reálné využití je velice přínosné pro lepší zapamatování dané problematiky žáky.

4.3 Představení Ramanovy spektrometrie žákům středních škol

Pro žáky středních škol je představení Ramanovy spektrometrie multioborový problémem. Ramanova spektrometrie v sobě spojuje problematiku chemie a zejména pak určování struktury látek a možnosti jejich identifikace. Dále pak podstata této metody je zejména problematikou z oblasti fyziky a je založena na vlastnostech elektromagnetického spektra a principech šíření a rozptylu světla. Oba tyto předměty spadají dle RVP pro gymnázia do vzdělávací oblasti Člověk a příroda. Nicméně princip, na němž fungují Ramanovy spektrometry, spadá i do vzdělávací oblasti Informatika a informační a komunikační technologie, zejména tím, že Ramanovy spektrometry využívají výpočetní techniku ke zpracování a vyhodnocení spekter pomocí heuristické analýzy, což vyžaduje znalost výpočetní techniky. Okrajově pak Ramanova spektrometrie zasahuje do Matematiky zejména zmínkami o Fourierově transformaci převádějící spektrum časové závislosti intenzity na čas na spektrum závislosti intenzity na frekvenci. Rovněž zmínka o historii a historickém vývoji dané technologie částečně zasahuje problematiku Dějepisu zejména pak novodobé historie.

Výklad Ramanovy spektrometrie rozvíjí u žáků především kompetence k učení (nejvíce pak schopnost pochopení principu, funkcí a použití Ramanovy spektrometrie v praxi) dále kompetence k řešení problémů (schopnost určit vhodnost použití této metody v praxi pro analýzu konkrétních typů látek).

Obecné cíle tohoto tématu a konkrétní hodiny jsou objasnění žákům princip, vlastnosti a použití Ramanovy spektrometrie, dále pak objasnění vhodnosti Ramanovy spektrometrie pro analýzu konkrétních typů látek.

Během výkladu je vhodné použít tyto výukové metody:

- práce s učebnicí, odbornou literaturou, fotografiemi
- výklad s prezentací a diskusí
- diskuse
- instruktáž
- práce s textem
- předvádění a pozorování

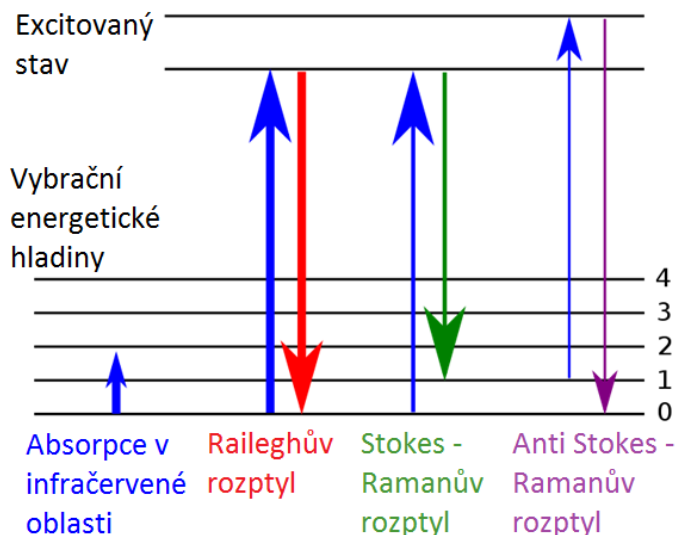
Organizační formy výuky pak jsou frontálně – individuální, individualizovaná, kooperativní.

4.3.1 Příklad výkladu Ramanovy spektrometrie žákům středních škol

Ramanova spektrometrie je pojmenována po objeviteli svého principu, kterým byl Indický vědec Sir Chandrasekhara Venkata Raman, který pozoroval tento jev rozptylu elektromagnetického záření za použití slunečního světla již v roce 1928. Po tomto objevu byl celý obor této spektrometrie pojmenován po Ramanovy, jež byl dva roky poté oceněn Nobelovou cenou za fyziku a to v roce 1930. Svůj objev Raman uskutečnil za využití slunečního záření, přičemž použil fotografický filtr k vytvoření monochromatického záření následovaný měřeným vzorkem a dále filtrem pohlcujícím toto monochromatické záření. Tímto zjistil, že u malého množství světla došlo ke změně vlnové délky a tudíž prošlo monochromátorem a mělo tak jinou vlnovou délku nežli původní záření. Jeho měření s využitím fotografické detekce trvala i několik hodin nicméně i takto byl Raman schopný naměřit Ramanovy linie pro přibližně 60 kapalin a plynů.³⁶

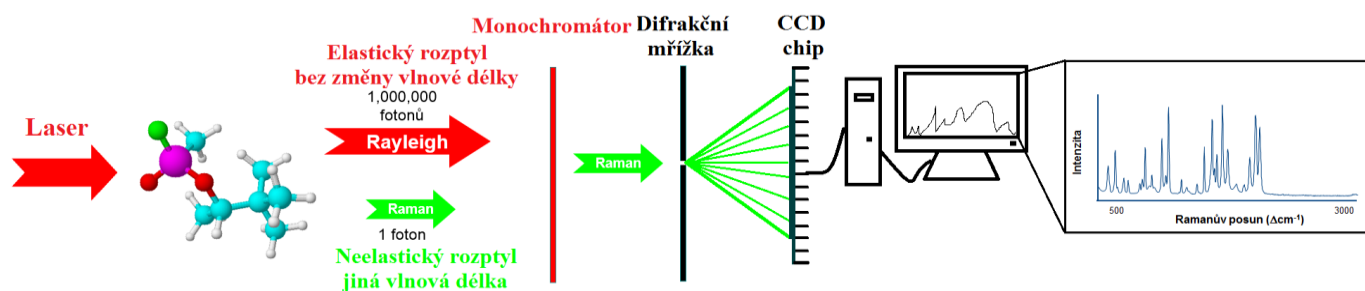
Jak šel vývoj dál, začali být pro Ramanovu spektrometrii využívány jako zdroj světla rtuťové výbojky nejdříve s fotografickou detekcí a následně pak i se spektrofotometrickou detekcí. V současné době jsou již používány jako zdroj světla zejména lasery a detekce probíhá pomocí CCD čipů.³⁶

Ramanův rozptyl je jevem, který vzniká při interakci mezi fotony dopadajícího světla a atomy. Tyto fotony předají svou energii rotačním a vibračním stavům atomů nebo molekul, které jsou excitovány na vyšší energetické vibrační hladiny. Tento excitovaný stav je pro molekuly nestabilním stavem a tudíž se molekuly vracejí na základní nulovou energetickou hladinu, při čemž vyzáří foton o stejné energii a tedy stejné vlnové délce jako měli původní absorbované fotony. Tomuto jevu se říká Rayleighův rozptyl, který však nic o dané látce nevyovídá. Nicméně v jednom případě z milionu dochází při návratu molekuly do základního stavu k vyzáření fotonu o menší energii (delší vlnové délce) popřípadě o větší energii (kratší vlnové délce).³⁶ Tyto fotony s různou vlnovou délkou nesou analytickou informaci, která vypovídá o struktuře, a charakteru dané látky jak je patrné na Obr. 32.



Obr. 32 Přejchody mezi vibračními hladinami excitovaných molekul²³

Ramanova spektrometrie využívá zejména záření v blízké infračervené oblasti záření tedy záření o vlnových délkách kolem 785 nm. Toto záření má méně energie nežli záření viditelné nicméně tato energie dostačuje ke změně rotačně vibračních stavů molekul a tudíž k jejich excitaci viz Příloha č. 1 – Elektromagnetické spektrum. Tato vlnová délka záření má tu výhodu, že velkou měrou proniká i sklem, což nám umožňuje provádět analýzy i ve skleněných obalech. Zejména i z tohoto důvodu jsou dnešní Ramanovy spektrometry založeny na interakci laserového paprsku se stabilizovanou vlnovou délkou (785 nm) s měřenou látkou. Dochází tak k rozptylu záření. Vyzářené fotony se stejnou vlnovou délkou, kterou měl excitační laser, jsou odfiltrovány monochromátorem. Fotony s rozdílnou vlnovou délkou procházejí přes monochromátor. Dále jsou na difrakční mřížce rozděleny podle vlnových délek a dopadají na CDD čip. Přístroj pak detekuje intenzitu dopadajícího záření v závislosti na vlnové délce. Z těchto údajů je sestaveno spektrum závislosti vlnočtu (převrácené hodnoty vlnové délky) na intenzitě dopadajícího záření. Následně je naměřené spektrum porovnáno s vnitřní databází spekter a při nalezení shody je identifikována konkrétní látka popřípadě směs látek. V závislosti na intenzitě dopadajícího záření je určeno i procentuální zastoupení jednotlivých složek stanovované látky.³⁶ Princip je patrný z Obr. 33.



Obr. 33 Princip Ramanových spektrometrů

Touto metodou jsme schopni detekovat látky pevné, kapalné, plynné a také gely a pasty. Jsme tak schopni například detekovat: organické sloučeniny, ropné produkty, pesticidy, hnojiva, plasty, průmyslové materiály, drogy, chemické zbraně, “bílé prášky”, anorganické sloučeniny, minerální kyseliny (sírová, dusičná, ...), anorganické oxidy (rez, oxid titaničitý, ...), některé iontové sloučeniny, (sírany, fosforečnany, chloristany, uhličitany), krystalické polokovy (křemík) a vodné roztoky.³⁶

Nicméně i pro tuto univerzální metodu jsou jistá omezení a lze nalézt některé látky, které jsou obtížně detekovatelné či zcela nedetekovatelné. Takovými látkami jsou: černě nebo velmi tmavě zbarvené vzorky, vysoce fluoreskující materiály, rozsáhlé kruhové molekuly (steroidy), některé přírodní produkty, detergenty, některé jasně zbarvené fluoreskující materiály (obzvláště modře nebo zeleně zbarvené), většina kovů a elementárních látek, jakékoli substance s velmi slabým Ramanovým signálem (např. voda), biologické materiály, obvykle fluoreskující, proteiny, lipidy, karbohydráty.³⁶

Nicméně existují i modifikace Ramanovy spektrometrie, které jsou schopny toto omezení odstranit. Nejčastější modifikací je tzv. SERS (povrchově zesílená Ramanova spektrometrie), která je prováděna nanosením vzorku látky na povrch zlatého či stříbrného terčičku. Tímto postupem dojde k zesílení signálu až 1000 krát, což umožní analyzovat biologické materiály (krev, tkáně, apod.) a lze tak kupříkladu odlišit nádorovou tkáň od tkáně zdravé.³⁶

Díky své univerzálnosti je Ramanova spektrometrie hojně využívána při identifikaci neznámých látek, což se uplatní jak v laboratořích, tak v běžném životě. Tyto přístroje pak nejčastěji využívají složky integrovaného záchranného systému policie a hasiči. Policie využívá Ramanovy spektrometry k určení „bílých prášků“ tedy k rozpoznání drog od neškodných látek. Ramanovy spektrometry lze také využít k určení podezřelých látek, zejména pak výbušnin, což se používá zejména na letištích a celnících. Naproti tomu hasiči využívají Ramanovy spektrometry k určení

nebezpečných látek nalezených v různých legálních i nelegálních skladech a dále pak při různých haváriích, nehodách i teroristických útocích k vyloučení či potvrzení nebezpečnosti nalezených rozlitých či rozsypaných látek. Ramanův spektrometr také nachází své využití v medicíně při kontinuálním sledování složení anestézního plynu při anestezii, analýze složení farmaceutik a neinvazivním monitorování tkání. Dalším speciální použitím Ramanovy spektrometrie je při analýze složení historických dokumentů, ověření pravosti drahých kamenů a dokonce i na vesmírných sondách zkoumajících povrch vesmírných těles.³⁶

Tento přístroj se také hojně používal v české republice během období výskytu otrav způsobených požitím alkoholů počátkem září 2012. Tyto alkoholy obsahovaly vysoké hodnoty methanolu, izopropylalkohol a další nežádoucí příměsi což zapříčinilo více jak 140 trvalých poškození lidského zdraví a z tohoto počtu došlo k více jak 50 případům úmrtí. Hlavní předností této metody je možnost provádění analýzy přímo přes skleněné i plastové obaly, a to jen díky využití laserového záření v blízké infračervené oblasti, jež těmito materiály proniká.³⁶

4.4 Představení Ramanovy spektrometrie studentům vysokých škol

Pro žáky vysokých škol je vhodné zmínit historii této techniky a její vývoj od prapočátků až po současný stav. Rovněž by součástí výkladu měl být detailní popis principu této metody s odkazem na elektromagnetické spektrum. Důležité je upozornit studenty na látky, které lze touto metodou identifikovat a zdůraznit omezení této techniky a informovat o možnostech odstranění těchto omezení s využitím příslušných modifikací Ramanovy spektrometrie. Vhodné je také zmínit technologii, kterou současné přístroje využívají a uvést příklady praktických měření a využití těchto přístrojů nejen v laboratorní praxi, ale také v běžném životě, což umožní lepší zapamatování dané problematiky.

4.4.1 Příklad výkladu Ramanovy spektrometrie studentům vysokých škol

Princip Ramanovy spektrometrie resp. neelastického rozptylu není žádnou současnou novinkou, nýbrž byl předpovězen již Adolfem Smekalem a to v roce 1923. Ramanův efekt byl pojmenován po jednom ze svých objevitelů, byl jím Indický vědec Sir Chandrasekhara Venkata Raman, který pozoroval tento jev za použití slunečního světla v roce 1928 spolu se svým kolegou, kterým byl Kariamannickam Srinivasa

Krishnan. Tento jev nezávisle na Ramanovy také pozorovali Grigory Landsberg a Leonid Mandelstam v Moskvě. Následně byl celý obor této spektrometrie pojmenován po Ramanovy, jež byl dva roky po tomto objevu oceněn Nobelovou cenou za fyziku a to v roce 1930. Rok před tím, tedy v roce 1929 byl Sir Chandrasekhara Venkata Raman povýšen do šlechtického stavu. Svůj objev Raman provedl za využití slunečního záření, dále použil fotografický filtr k vytvoření monochromatického záření následovaný stanovovaným vzorkem a dále filtrem pohlcujícím toto monochromatické záření. Tímto zjistil, že u malého množství světla došlo ke změně frekvence a tudíž prošlo monochromátorem a mělo tak jinou vlnovou délku nežli původní záření. Takováto měření s „fotografickou“ detekcí však trvala i několik hodin nicméně i přes toto omezení byli Raman se svým kolegou Krishnanem ve své době schopni detekovat Ramanovy linie pro přibližně 60 kapalin a plynů.³⁶

Po tomto objevu pak následovali další průkopnické studie, které zejména v letech 1930 až 1934 vytvořil československý fyzik Georg Placzek (narozen v Brně 1905), který se zasloužil o vypracování systematické teorie Ramanova rozptylu.³⁶

Jak šel vývoj dál, začali být pro Ramanovu spektrometrii využívány jako zdroj světla rtuťové výbojky nejdříve s fotografickou detekcí a následně pak i se spektrofotometrickou detekcí. V současní době jsou již používány jako zdroj světla zejména lasery a detekce probíhá pomocí CCD čipů.³⁶

Ramanův rozptyl je přesněji jev vznikající při interakci mezi fotony dopadajícího světla a atomy, kdy dochází k předání energie rotačním a vibračním stavům atomů nebo molekul, kdy rozptýlené záření má jinou vlnovou délku (resp. energii fotonů) než záření dopadající. V Ramanově spektru je tak intenzita získaných pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu. K Ramanově spektrometrii také existuje doplňková metoda, jíž je infračervená spektrometrie, kde je naopak intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu. Z tohoto vyplývá, že vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na tom, zda je studujeme pomocí infračervené či Ramanovy spektrometrie avšak intenzity spektrálních linií budou pro obě metody odlišné. Polohou pásů v určitých oblastech spektra lze pak usuzovat na konkrétní vazby a substituenty z nichž se měřená molekula skládá a naopak lze ze struktury molekuly určit, jak bude vypadat spektrum dané molekuly viz Obr. 34.^{cit. 36}

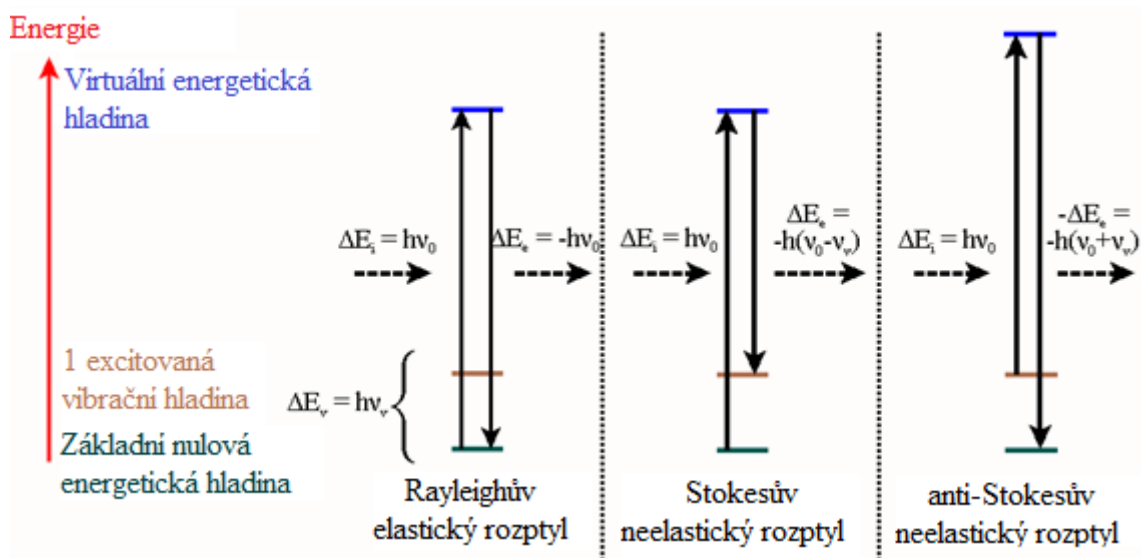
Frekvence, cm ⁻¹		Intenzita *		Hlavní výskyt	
4000	3000	IČ	Raman		
		Vibrace vazeb			
		O-H protažení	vs	vsl	Lipidy
		=C-H protažení	s-stř	stř	Lipidy
		-C-H protažení	s-stř	stř	Lipidy
		-C=N protažení	stř	s	
		C=O protažení	s	stř-sl	Lipidy, amino kys.
		C=O protažení	s	sl-stř	Lipidy, amino kys.
		C=O protažení	s	stř-s	Proteiny
		C=C protažení	stř-sl	s	Lipidy
		C=C protažení	stř	s	Lipidy
		C=C protažení	stř	s	Lipidy
		N-H ohyb	s	sl	Proteiny
		C-H střih	stř	stř-sl	Lipidy
		C-O protažení	s		Amino kys., lipidy
		N-H ohyb	sl-stř		Proteiny
		P=O protažení	vs	stř-sl	Lipidy, nukleové kys.
		Oblast "otisku prstu"			
		C=O protažení	s	stř-sl	Karbohydráty
		Skeletální		stř	Škrob
		C-O-C skeletální	stř-sl	stř-sl	Glukóza, galaktóza,
		C-O-C skeletální	stř-sl	stř	manóza
		C-H kývání	sl-stř	vsl	Lipidy
		Skeletální		vs	Škrob

* s = silná, stř = střední, sl = slabá, vs = velmi silná, vsl = velmi slabá

Obr. 34 Charakteristické vibrace³⁵

Nyní si přiblížíme princip, na němž jsou založeny dnešní Ramanovy spektrometry. V těchto přístrojích dochází k interakci laserového paprsku, se stabilizovanou vlnovou délkou (zejména v blízké infračervené oblasti 785 nm), se vzorkem, čímž dochází k excitaci molekul vzorku na vyšší energetickou vibrační hladinu. Následně dochází k rozptylu záření a vyzáření fotonu. Malá část záření projde vzorkem, zbylá část záření podléhá elastickému rozptylu (Rayleighův rozptyl – kde nedochází ke změně vlnové délky) a neelastickému rozptylu (Ramanův rozptyl – zde dochází ke změně vlnové délky rozptýleného světla přibližně u jednoho fotonu z milionu).³⁶

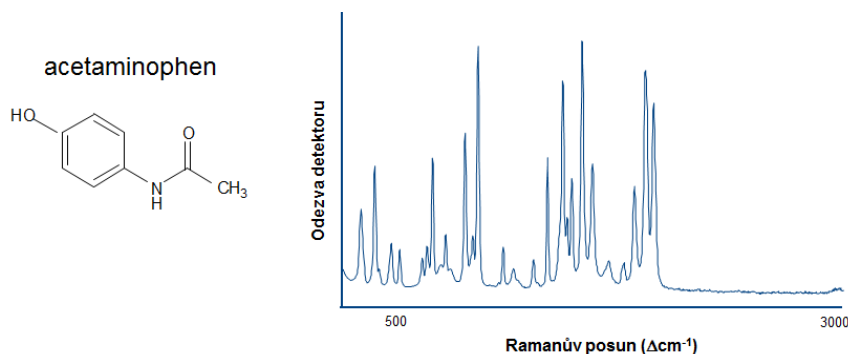
Rozptýlené fotony s kratší vlnovou délkou mají větší energii, nežli měli původní excitační fotony, a dále rozptýlené fotony s delší vlnovou délkou oproti původním fotonům, zodpovědným za excitaci, mají nižší energii viz Obr. 35.



Obr. 35 Energetické hladiny rozptýleného záření²³

Rozptýlené záření pak prochází do přístroje přes monochromátor, v němž dochází k odfiltrování záření o vlnové délce použitého laseru (Rayleighův rozptyl) a k průchodu záření o odlišné vlnové délce (Ramanův rozptyl). Prošlé záření je následně registrováno pomocí polovodičového CCD čipu.³⁶

Následně je naměřené spektrum porovnáno s vnitřní databází spekter. Při nalezení shody je identifikována konkrétní látka popřípadě směs látek a v závislosti na intenzitě odezvy je určeno i procentuální zastoupení jednotlivých složek.

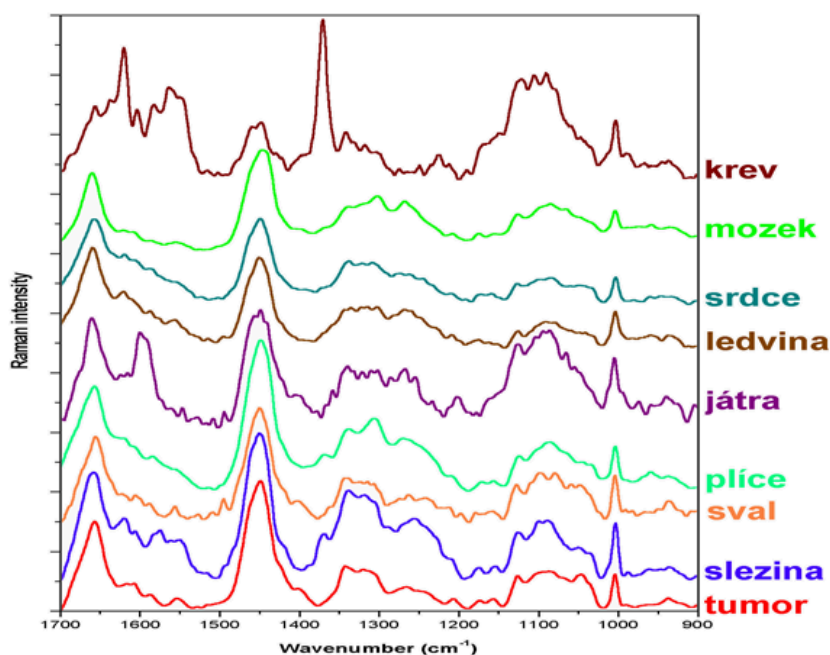


Obr. 36 Příklad měřeného spektra Ramanovým spektrometrem

Touto metodou jsme schopni detekovat látky v pevném, kapalném a plynném skupenství. Jsme tak schopni například detekovat: organické sloučeniny, ropné produkty, pesticidy, hnojiva, plasty, průmyslové materiály, drogy, chemické zbraně, “bílé prášky”, anorganické sloučeniny, minerální kyseliny (sírová, dusičná, ...), anorganické oxidy (rez, oxid titaničitý, ...), některé iontové sloučeniny, (sírany, fosforečnany, chloristany, uhličitany), krystalické polokovy (křemík), vodné roztoky.³⁶

Nicméně pro tuto metodu jsou i obtížně detekovatelné nebo nedetekovatelné látky, zejména pak: černě nebo velmi tmavě zbarvené vzorky, vysoce fluoreskující materiály, rozsáhlé kruhové molekuly (steroidy), některé přírodní produkty, detergenty, některé jasně zbarvené fluoreskující materiály (obzvláště modře nebo zeleně zbarvené), většina kovů a elementárních látek, jakékoli substance s velmi slabým Ramanovým signálem (např. voda), biologické materiály, obvykle fluoreskující, proteiny, lipidy, karbohydráty.³⁶

Tyto neduhy pak lze odstranit s využitím příslušných modifikací Ramanovy spektrometrie, jsou jimi: rezonanční Ramanova spektrometrie (RR), povrchově zesílená Ramanova spektrometrie (surface enhanced – SERS), rezonanční povrchově zesílená Ramanova spektrometrie (resonance surface enhanced – SERRS), fotoakustická Ramanova spektrometrie (photo-acoustic – PARS), hyperRaman, koherentní anti-Stokesova Ramanova spektrometrie (coherent anti-Stokes – CARS), koherentní Stokesova Ramanova spektrometrie (coherent Stokes – CSRS) a další.³⁶



Obr. 37 Příklad spekter tkání¹⁶

Mezi těmito modifikacemi je pak zejména využívána povrchově zesílená Ramanova spektrometrie SERS, která je za normálních okolností prováděna za účasti koloidních částic zlata či stříbra popřípadě s využitím substrátu obsahujícího tyto kovy. Dochází tak k excitaci elektronů kovu což má za následek zvýšení intenzity elektrického pole v okolí kovu. Vzhledem k tomu, že intenzita Ramanova spektra je závislá na intenzitě elektrického pole, dochází tak k zesílení signálu až 1000 krát. Tato

technika pak najde své využití zejména při analýze biologických materiálů (krve, tkání, apod.) viz Obr. 37.^{cit. 36}

Své největší využití nachází Ramanova spektrometrie zvláště při identifikaci neznámých látek, což je velice důležitou součástí laboratorní praxe a rovněž nachází značné využití i v běžném životě. Jednou z dostupných metod k rychlému určení neznámé látky je využití Ramanových spekter. Pomocí Ramanových spektrometrů jsme pak zejména schopni identifikovat ropné látky, pesticidy, hnojiva, plasty, průmyslové materiály a rovněž můžeme identifikovat drogy, chemické zbraně, kyseliny, oxidy, iontové sloučeniny, krystalické polokovy a vodné roztoky. Přístroje schopné vyhodnotit Ramanova spektra dosahují velikostí příručních přístrojů, což umožňuje jejich využití v terénu složkami integrovaného záchranného systému tedy policií a hasiči. Ramanův spektrometr nachází své využití také v medicíně při kontinuálním sledování složení anestézního plynu při anestezii, analýze složení farmaceutik a neinvazivním monitorování tkání, dále se využívá při detekci výbušnin na letištích, při určování chemického složení historických dokumentů, ověření pravosti drahých kamenů a dokonce i na vesmírných sondách zkoumajících povrch vesmírných těles. Tento přístroj našel své uplatnění i během období zvýšeného výskytu otrav způsobených požitím alkoholů. Pro tyto účely byl kalibrován na analýzu jejich složení, zda neobsahují škodlivý methanol, izopropylalkohol a další nežádoucí příměsi. Výhodou této metody je možnost provádět stanovení nejen vodných roztoků, ale umožňuje také provádět analýzu přímo přes skleněné i plastové obaly, a to zejména díky využití laserového záření v blízké infračervené oblasti, jež těmito materiály proniká.³⁶

Ramanovy spektrometry jsou tak nedílnou součástí laboratorní praxe, ale také stále více získávají své místo v každodenním životě a lze předpokládat, že další vývoj techniky přispěje k jejich stále většímu využití.

5 Závěr

V této práci byla popsána historie a vývoj Ramanovy spektrometrie a její principy. Rovněž zde byl popsán vývoj a princip instrumentace používané pro konstrukci Ramanových spektrometrů včetně detailního popisu postupu ovládání a průběhu analýzy jednotlivých typů vzorků s využitím přenosného Ramanova spektrometru Ahura FirstDefender.

Dalším důležitým výstupem této práce bylo vytvoření kalibrace pro přenosný Ramanův spektrometr Ahura FirstDefender pro přesné kvantitativní stanovení obsahu methanolu v nejběžnějších vzorcích alkoholů s 40 objemovými procenty ethanolu. Tudíž se jedná o nejběžnější komerčně dostupné alkoholy, kterými jsou typičtí zástupci rumů, vodek či pálenek. Tato kalibrace umožňuje rychlou a přesnou analýzu složení alkoholů, což vede k rychlému vyloučení či případnému potvrzení škodlivosti testovaného alkoholu a určení zda alkohol dosahuje legislativně platných limitů pro obsah methanolu. Tento krok tak může přispět k zabránění vážného poškození zdraví či úmrtí lidí způsobené požitím alkoholu obsahujícím vysoké obsahy methanolu a jiných kontaminujících látek.

Dále byla v této práci testována schopnost Ramanova spektrometru (Ahura FirstDefender) detekovat přítomnost látek nacházejících se v alkoholech pocházejících z nelegálních zdrojů, zejména pak majících původ v nekvalitně čištěných denaturačních směsích, které obsahují zejména isopropylalkohol, methanol a denatonium benzoát (Bitrex). Tyto zbytky denaturačních směsí nesmějí být v alkoholech určených pro potravinářské účely přítomné, tudíž je důležité zjistit jejich případnou přítomnost a tyto alkoholy vyloučit z prodejních řetězců. Testováním tak byla potvrzena schopnost přenosného Ramanova spektrometru Ahura FirstDefender identifikovat isopropylalkohol v alkoholických nápojích, nicméně schopnost detekce denatonium benzoátu (Bitrexu) v běžně používaných denaturačních směsích, ve kterých dosahuje obsahu 2 – 30 mg.l⁻¹ ethanolu (viz Příloha č. 2 k vyhlášce č. 141/1997Sb. ve znění pozdějších předpisů), nebyla potvrzena. Jelikož se jedná o velmi malé obsahy denaturačního činidla, nalézá se stanovovaná látka pod mezí detekce přenosného Ramanova spektrometru Ahura FirstDefender. Tudíž pro provedení detekce denatonium benzoátu je vhodné využít laboratorní Ramanovy spektrometry s větší přesností a lepším spektrálním rozlišením. Nicméně přítomnost denatonium benzoátu lze snadno i

v takto nízkých koncentracích poznat sensoricky vzhledem k jeho značně hořké chuti, což člověku znemožňuje konzumaci alkoholů obsahujících tuto denaturační směs.

Jelikož je v neposlední řadě osvěta velice důležitým prvkem vzdělávacího procesu žáků a studentů na všech stupních vzdělávacího procesu, je proto součástí této práce i návrh vhodné formy didaktického výkladu tématu Ramanovy spektrometrie žákům středních škol a studentům vysokých škol. Rovněž je zde uveden příklad použití a uplatnění Ramanovy spektrometrie při výuce chemie a laboratorních prací z chemie. Je zde také poukázáno na další obory a předměty do kterých problematika Ramanovy spektrometrie zasahuje a jsou zde uvedeny i klíčové kompetence vycházející z rámcového vzdělávacího programu pro gymnázia.

6 Seznam použité literatury

- ¹ SCHRADER, B., BOUGEARD, D. *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. New York: VCH, 1995, 787 s. ISBN 35-272-6446-9.
- ² *Raman microscopy: developments and applications*. Editor George Turrell, Jacques Corset. San Diego: Elsevier Academic Press, 1996, 463 s. ISBN 01-218-9690-0.
- ³ GROSSMAN, W.E.L. Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*. 1976, roč. 48, č. 5, s 261-268.
- ⁴ GERRARD, D.L., BOWLEY, H.J. Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*. 1986, roč. 58, č. 5, s. 6-13.
- ⁵ FRAN, A., DELHAYE, M., DASILVA, E.. Evolution of Instrumentation for Detection of the Raman Effect as Driven by Available Technologies and by Developing Applications. *Journal of Chemical Education*. 2007, roč. 84,č. 1, s. 50-60.
- ⁶ FREEMAN, S.K. *Applications of laser Raman spectroscopy*. New York: Wiley, 1974, 336 s. ISBN 04-712-7788-6.
- ⁷ GERRARD, D.L., BIRNIE, J. Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*. 1992, roč. 64, č. 12, s. 502-513.
- ⁸ GERRARD, D.L. Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*. 1994, roč. 66, č. 12, s. 547-557.
- ⁹ ZÝKA, J. Analytická příručka: Díl I. 4. vyd. Praha: SNTL, 1988, 678 s.
- ¹⁰ Nicolet.cz. *Introduction to Raman spectroscopy* [online]. 2003 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/Aplikace/IntroductionToRaman.pdf>
- ¹¹ GERRARD, D.L., BIRNIE, J..Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*. 1990, roč. 60, č. 12, s. 140-150.

- ¹² LEWIS, I.R., EDWARDS, H.G.M. *Handbook of Raman spectroscopy: from the research laboratory to the process line*. New York: Marcel Dekker, 2001, 1054 s. ISBN 08-247-0557-2.
- ¹³ TOBIN, M.C. *Laser Raman spectroscopy : methods and applications*. New York: Wiley-Interscience, 1971, 171 s. ISBN 04-718-7550-3.
- ¹⁴ Thermo scientific. *Applications for Unknown Substances Identification* [online]. 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.ahurascientific.com/chemical-explosives-id/products/>
- ¹⁵ VANDENABEELE, P. Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, roč. 397, č. 7, s. 2629-2630. DOI: 10.1007/s00216-010-3872-8.
- ¹⁶ MOVASAGHI, Z., REHMAN, S., REHMAN, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2007, roč. 42, č. 5, s. 493-541. DOI: 10.1080/05704920701551530.
- ¹⁷ TWARDOWSKI, J., ANZENBACHER, P., MASSON, M. *Raman and IR spectroscopy in biology and biochemistry*. 1. vyd. Warszawa: Polish Scientific Publishers, 1994, 269 s. ISBN 01-375-1082-9.
- ¹⁸ GRASSELLI, J.G., SNAVELY, M.K., BULKIN, B.J. *Chemical applications of Raman spectroscopy*. New York: Wiley, 1981, 198 s. ISBN 04-710-8541-3.
- ¹⁹ KALOUS, V. *Jak moderní chemie zkoumá strukturu molekul*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983, 152 s.
- ²⁰ MCCREERY, R.L. *Raman spectroscopy for chemical analysis*. New York: John Wiley, 2000, 420 s. ISBN 04-712-5287-5.
- ²¹ ZÝKA, J. *Analytická příručka: Díl II*. 4. vyd. Praha: SNTL, 1988, 832 s.
- ²² SZYMANSKI, H.A. *Raman spectroscopy: Theory and Practice*. 2. vyd. New York: Plenum, 1970, 221 s.

- ²³ Raman spectroscopy. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy
- ²⁴ Fluorescence. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence>
- ²⁵ WARTEWIG, S. *IR and Raman spectroscopy: fundamental processing*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, 175 s. ISBN 35-273-0245-X.
- ²⁶ GÜNZLER, H., WILLIAMS, A. *Handbook of analytical techniques*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001, 559 s. ISBN 35-273-0165-8.
- ²⁷ FERRARO, J.R., NAKAMOTO, K., BROWN, C.W. *Introductory Raman spectroscopy*. 2 vyd. Boston: Academic Press, 2003, 434 s. ISBN 01-225-4105-7.
- ²⁸ BAILO, E., DECKERT, V.. Tip-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*. 2008, roč. 37, č. 5, s. 921-930. DOI: 10.1039/b705967c.
- ²⁹ Vyhláška č. 147 ze dne 1. července 1997 o technických požadavcích na výrobu, skladování a zpracování lihu. In *Sbírka zákonů České republiky*. 1996, částka 49.
- ³⁰ Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č.110 ze dne 15. ledna 2008 o definici, popisu, obchodní úpravě, označování a ochraně zeměpisných označení lihovin a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 1576/89. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2008, částka 39.
- ³¹ MILLER, F.A., MAYO, D.W., HANNAH, R. *Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2004, 567 s. ISBN 04-712-4823-1.
- ³² LIN-VIEN, D. *The Handbook of infrared and raman characteristic frequencies of organic molecules*. Boston: Academic Press, 1991, 1198 s. ISBN 01-245-1160-0.

- ³³ ROEGES, N.P. *A guide to the complete interpretation of infrared spectra of organic structures*. 1. vyd. New York: Wiley, 1994, 340 s. ISBN 04-719-3998-6.
- ³⁴ Horiba com. *Raman data and analysis: Raman spectroscopy for analysis and monitoring* [online]. 2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/bands.pdf>
- ³⁵ SOCRATES, G. *Infrared and raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 3. vyd. West Sussex: John Wiley, 2007, 347 s. ISBN 04-700-9307-2.
- ³⁶ MARTINEC, M., RICHTER, V. Princip a využití Ramanovy spektroskopie. *Biologie Chemie Zeměpis*. 2014, roč. 23, č. 3, s. 124-128.
- ³⁷ Electromagnetic spectrum. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2014 [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_spectrum

7 Cizojazyčné resumé

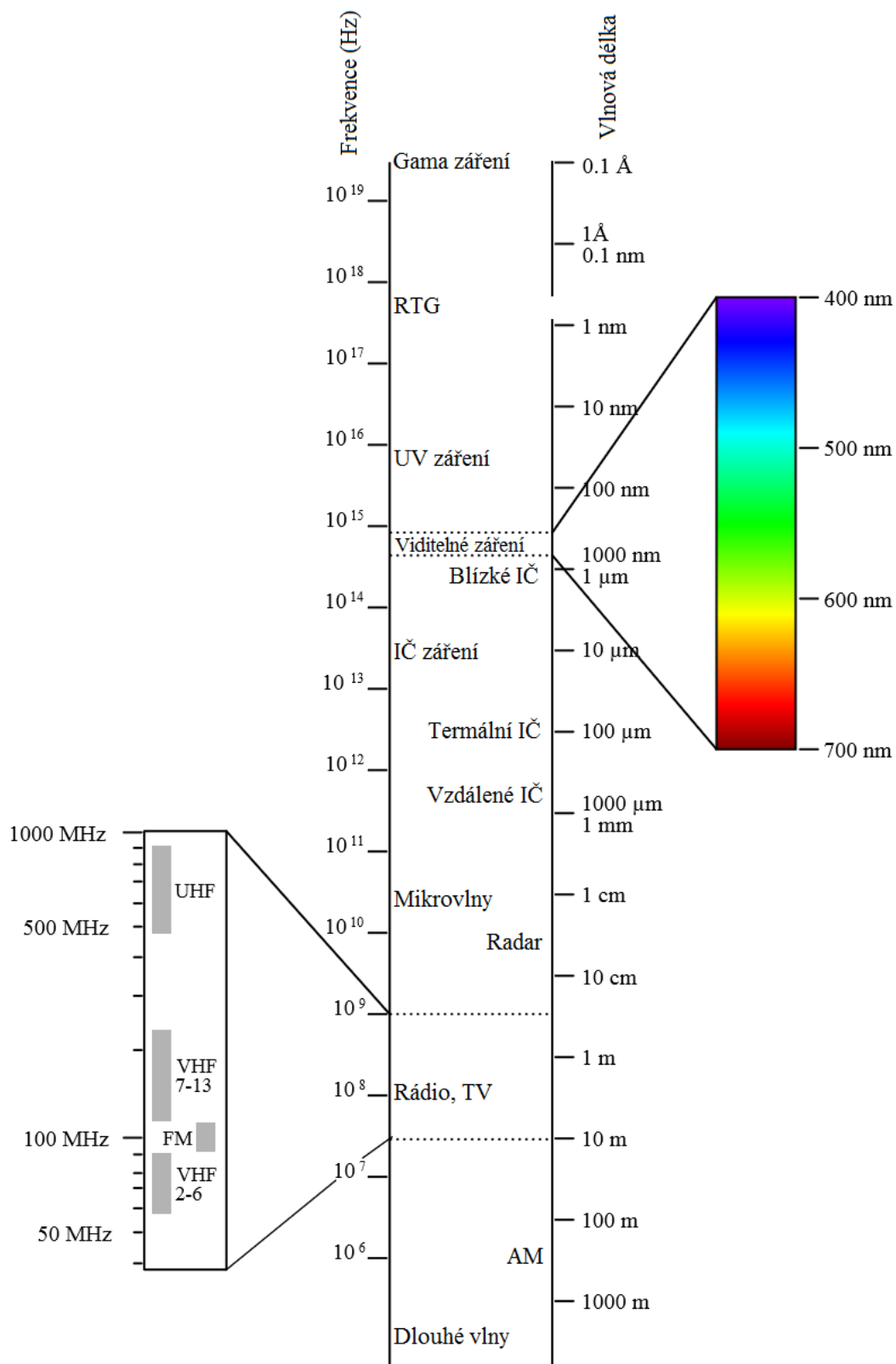
This work is focused on description of Raman spectroscopy and its use in education at high schools and universities. Practical contribution of this work is calibration of Raman spectrometer for accurate quantitative identification of amount of methanol in commercially available 40% alcoholic drinks. In this work was also tested the ability of portable Raman spectrometer Ahura FirstDefender to detect isopropyl alcohol and denatonium benzoate in samples of alcohol.

Next practical contribution of this work is suggestion of the best way how to explain principles and practical usage of this analytical method for high school and university students. Also there is proposal of practical usage of Raman spectrometer in laboratory works in chemistry.

8 Přílohy

8.1 Příloha č. 1 – Elektromagnetické spektrum

Elektromagnetické spektrum³⁷



8.2 Příloha č. 2 – Parametry přenosného Ramanova spektrometru

Specifikace ¹⁴	
Spektrální rozsah	250 cm ⁻¹ to 2875 cm ⁻¹
Spektrální rozlišení	7 to 10,5 cm ⁻¹ (FWHM) napříč spektrem
Laser (vlnová délka)	785 nm +/- 0,5 nm, 2 cm ⁻¹ šířka linie, stabilita <0,1 cm ⁻¹
Výkon laseru	300 mW nebo nižší (nastavitelně)
Sběrná optika	NA = 0,33; 18 mm pracovní vzdálenost; 0,2 mm až 2,5 mm velikost bodu
Expozice	Manuální, Automatický mód (100 ms minimum)
Baterie	Nabíjitelná 7,4 V Interní Lithium Iontová Baterie; >5 hodin při 25 °C
Napájení	Napájecí transformátor 100-240 V AC 50/60 Hz
Váha	<1,8 kg
Rozměry	30 cm x 15 cm x 7,6 cm
Operační teplota	-20 °C až +40 °C
Jazyk	Angličtina, Čínština, Japonština, Němčina a Francouzština

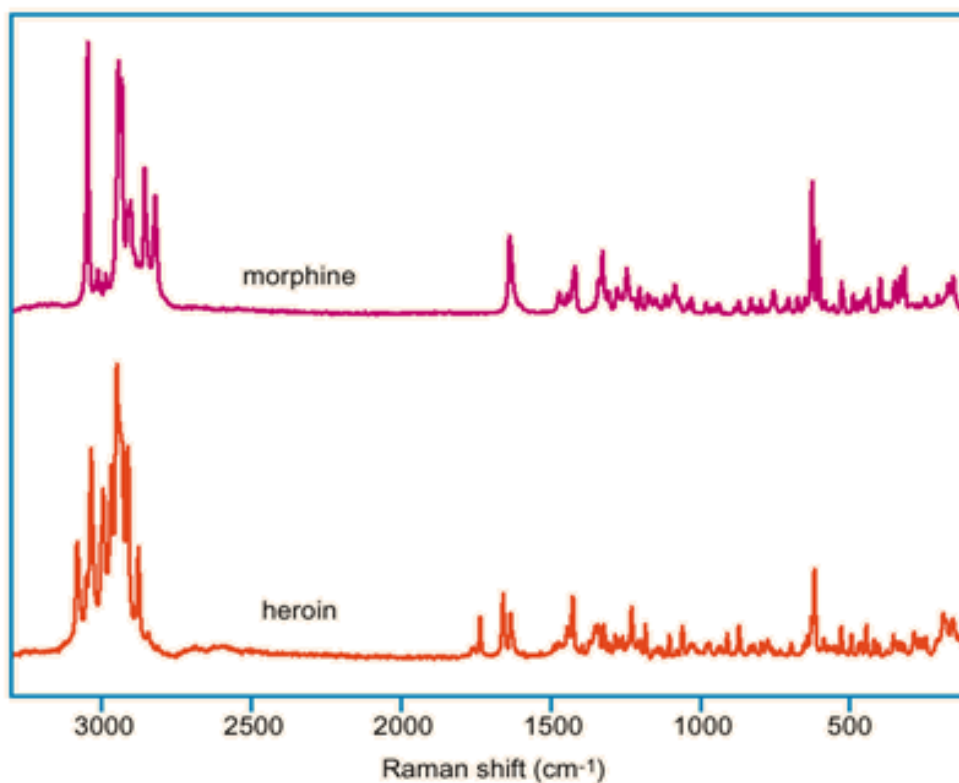
Robustnost¹⁴

Test	Specifikace
Mechanický náraz	40g v 11ms, zub pily
Vibrace	1hodina/osa, složené kruhové vibrace
Náraz při pádu	z výšky 1,22 m na překližkovou desku položenou na beton, 26 x

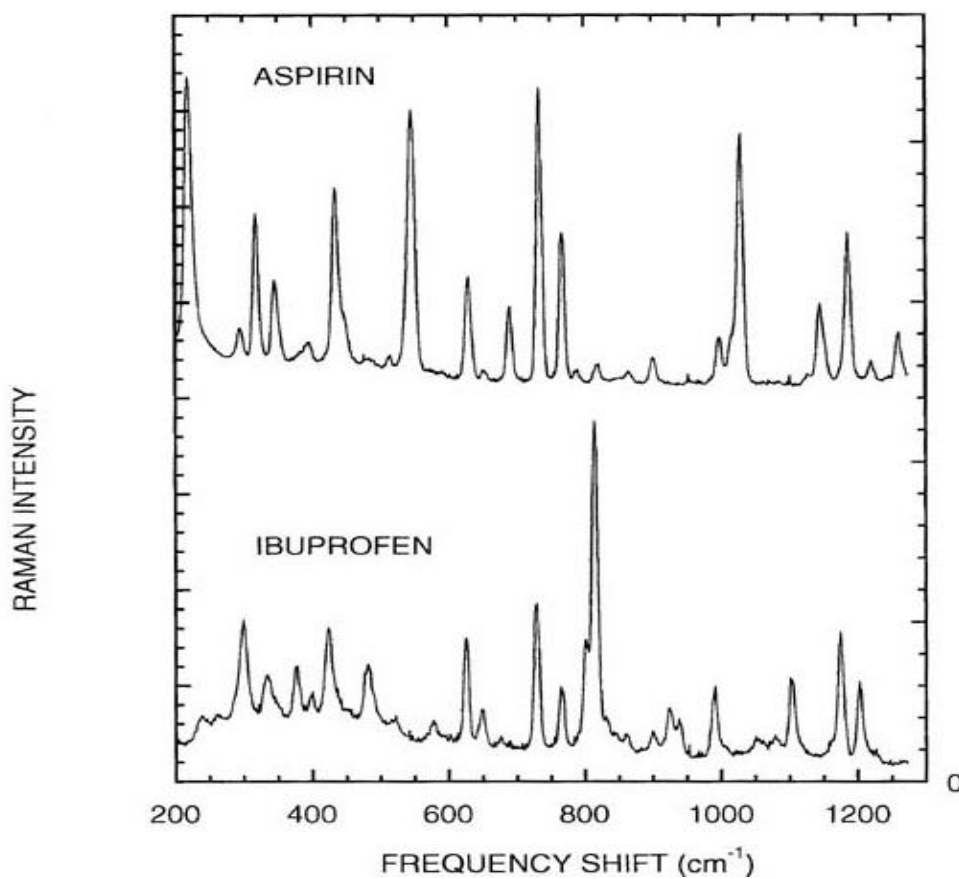
Vlhkost	5 x 48 hod, 60 °C a 95% relativní vlhkosti
Písek/prach/nečistota	foukání prachu
Teplotní šok	-30C až +60C,<1min
Nízká teplota (zapnuto)	-20C po dobu 1 dne
Vysoká teplota (zapnuto)	+35C po dobu 3 dnů
Nízká teplota (skladování)	-30C po dobu 1 dne
Vysoká teplota (skladování)	+60C po dobu 7 dnů
Ponoření (zapnuto)	30 min. v hloubce > 1 metr

8.3 Příloha č. 3 – SERS spektra organických a biologických látek

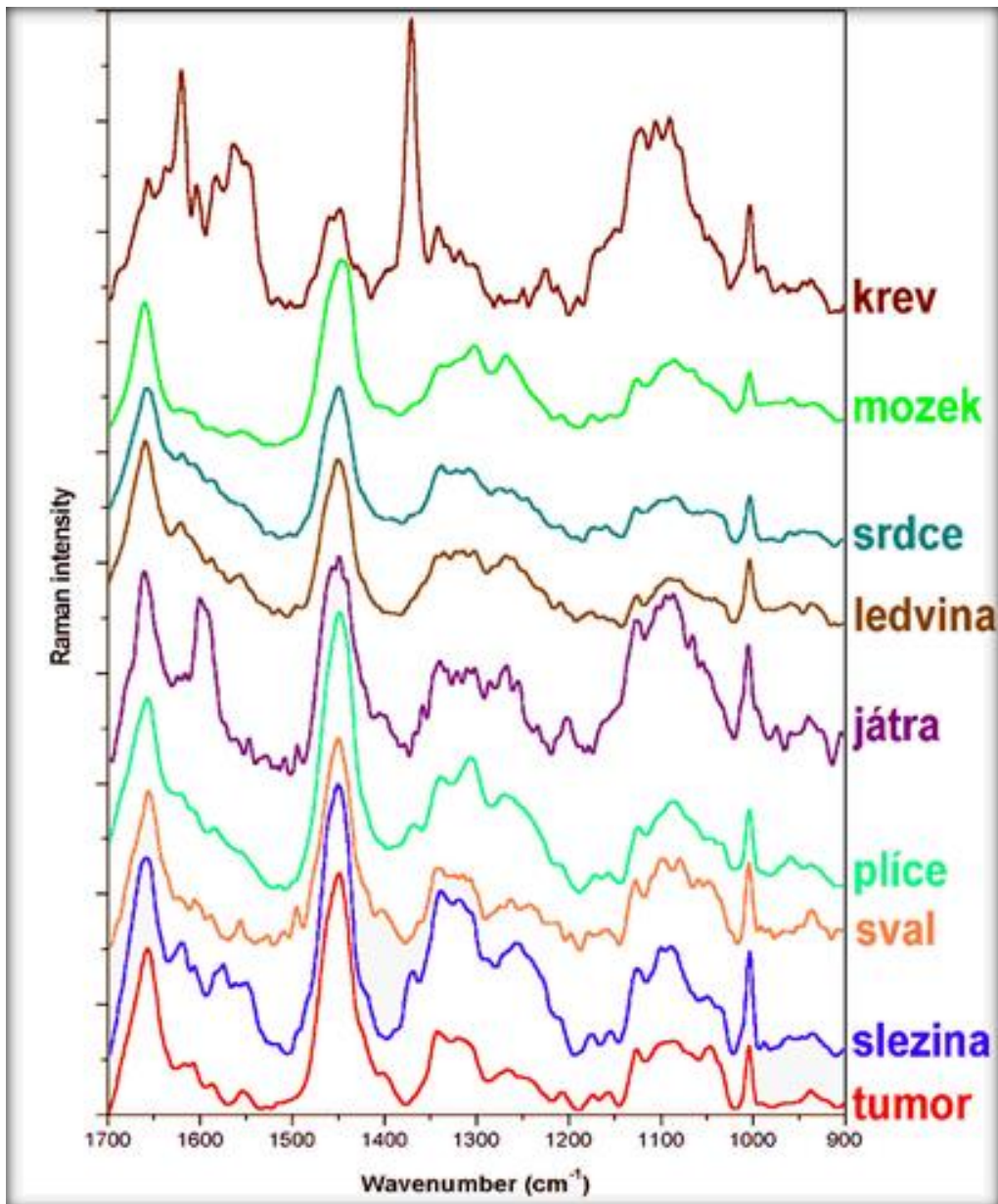
Ramanova spektra heroínu a morfinu¹⁷



Ramanova spektra léků¹⁷



Ramanova spektra tkání¹⁶



8.4 Příloha č. 4 – Analýza neznámých látek

