

Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky II.

Vypracoval: Jana Čurdová, Martin Kříž, Vít Marek.

Dne: 16. června 2003

Úloha: 1

Základy infračervené absorpční spektroskopie

Úkol:

1. Určování tloušťky kyvety d
2. Měření propustnosti a absorbance jednoduchých organických látek (cyklohexan, CCl_4 , směs cyklohexanu a CCl_4 , cyklohexanon)
3. Měření propustnosti vodných roztoků biomolekul (5'-AMP dvojná sůl), odečítání spektra rozpouštědla
4. Metoda zeslabené totální reflexe (ATR)

Teorie:

Pro stanovení absorpčních spekter látek se často používá měření propustnosti $T(\nu)$:

$$T(\nu) = \frac{I_\nu}{I_\nu^0} \quad (1)$$

kde I_ν je intenzita záření po průchodu vzorkem a I_ν^0 je intenzita dopadajícího záření. Velikost útlumu monochromatické vlny o frekvenci ν se charakterizuje pomocí absorbance $A(\nu)$ definované vztahem

$$A(\nu) = \log \frac{I_\nu^0}{I_\nu} \quad (2)$$

Tloušťku kyvety d určíme díky interferenci záření na rovnoběžných stěnách kyvety podle vztahu

$$d = \frac{n}{2 \cdot \Delta \nu} \quad (3)$$

kde n je počet interferenčních maxim připadajících na interval vlnočtů $\Delta \nu$.

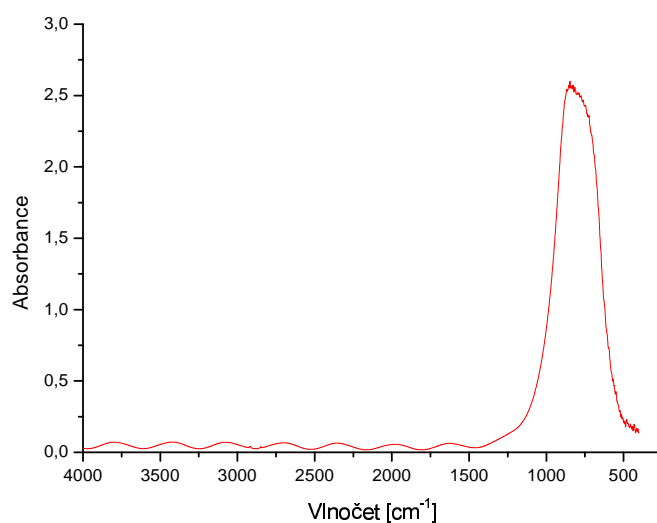
Metoda zeslabené totální reflexe (ATR) využívá vzniku evalescentní vlny při totálním odrazu záření na rozhraní opticky hustšího a řidšího prostředí. Absorbce vzorku se pak projevuje snížením intenzity odraženého záření. Je zde však navíc závislost vzdálenosti průniku evalescentní vlny na vlnové délce, která musí být korigována (ATR-korekce vůči vlnové délce).

Výsledky měření a diskuse:

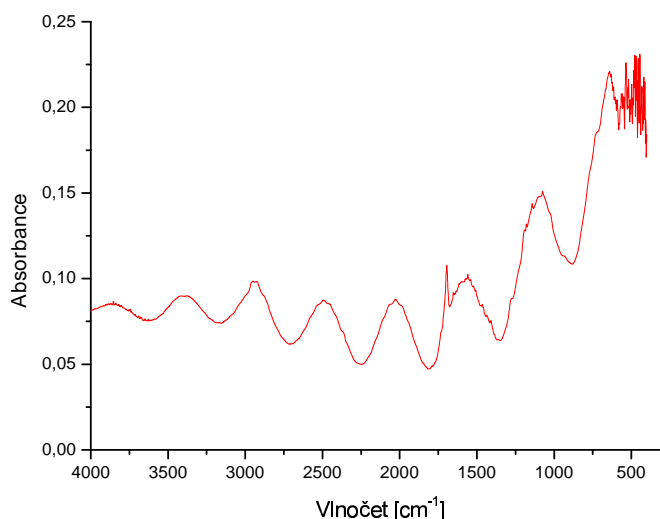
Pro měření absorpce vzorků jsme použili FT-IR spektrometr Nicolet Impact 400. Ten obsahoval MCT detektor, který omezoval přesnost měření při nižších vlnočtech (pro přesnější měření by se musel použít například termální detektor). Spektrometr umožňuje měřit v rozsahu 7800 až 400 cm^{-1} a to s rozlišením 1 až 16 cm^{-1} .

1. K dispozici jsme měli 2 kyvety. První byla z CaF_2 a druhá z KBr . Po vložení prázdných kyvet do spektrometru jsme změřili spektra, na kterých je patrná interference záření po odrazu na stěnách kyvet. U CaF_2 kyvety (obrázek 1) je vzdálenost 6 maxim $\Delta \nu_{\text{CaF}_2} = (2170 \pm 20) \text{ cm}^{-1}$. Chybu jsme odhadli na základě nepřesnosti určení polohy krajních maxim. Po dasazení do vztahu (3)

jsme tak vypočetli tloušťku kyvety $d_{\text{CaF}_2} = (13,8 \pm 0,1) \mu\text{m}$. U KBr kyvety (obrázek 2) je vzdálenost 4 maxim $\Delta\nu_{\text{KBr}} = (1830 \pm 40) \text{ cm}^{-1}$. Tloušťka kyvety je $d_{\text{KBr}} = (10,9 \pm 0,2) \mu\text{m}$. Kyvety měli mít podle zadání 12 a 15 μm , tloušťka však záleží na síle stisku sklíček kyvet k sobě.

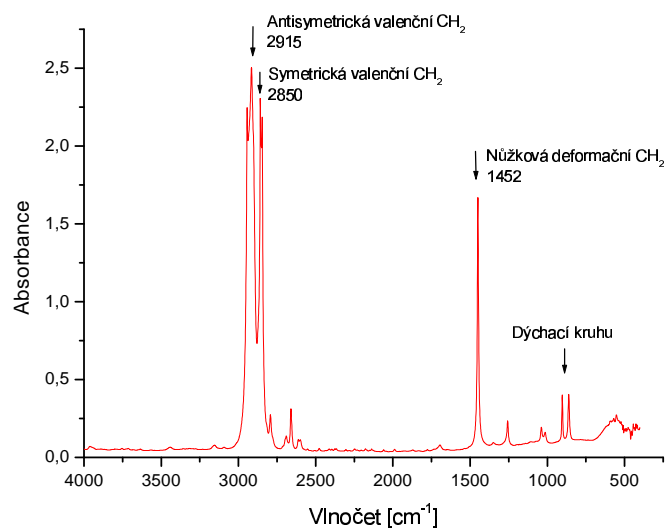


Obrázek 1: prázdná CaF_2 kyveta

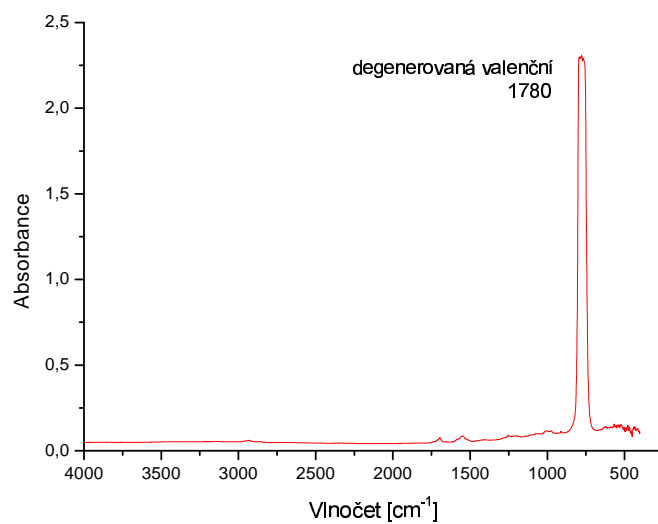


Obrázek 2: prázdná KBr kyveta

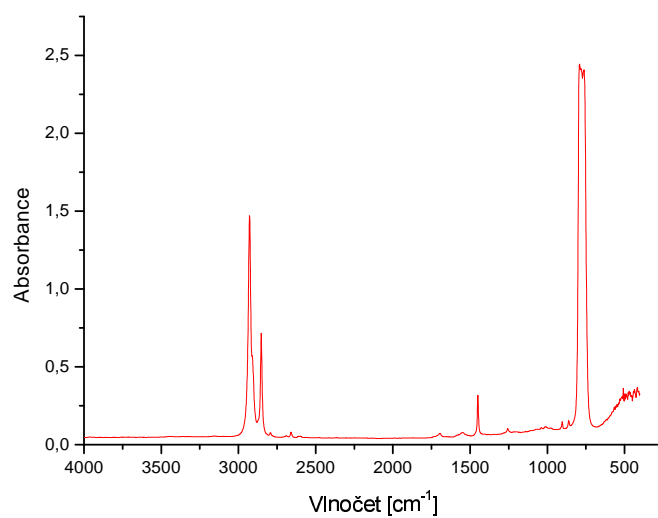
2. První měřenou látkou byl cyklohexan v KBr kyvetě. Spektrum jsme proměřovali v rozsahu 4000-400 cm^{-1} . Pomocí tabulek [1], [2] jsme k jednotlivým čarám přiřadili příslušné charakteristické vibrace (obrázek 3). Stejným způsobem jsme změřili i CCl_4 (obrázek 4) a jeho směsi s cyklohexanem (obrázky 5 a 6). U CCl_4 je úplně symetrická valenční vibrace a deformační vibrace v oblasti pod 500 cm^{-1} , kde detektor informace zkresluje. Posledním měřením v tomto úkolu byl cyklohexanon (obrázek 7). Zde se vyskytuje vibrace $-\text{CO}-$ skupiny na vlně 1710 cm^{-1} a dokonce i její druhá harmonická na 3400 cm^{-1} (což je způsobeno anharmonicitou).
3. V dalším úkolu jsme určovali spektrum dvojné soli 5'-AMP. Toto měření nelze provádět v KBr kyvetě kvůli její rozpustnosti ve vodě. K měření jsme proto použili CaF_2 kyvetu. Voda však vykazuje poměrně silnou absorpci (obrázek 8). Proto je nutné od naměřeného spektra (obrázek 9) odečíst spektrum vody. Výsledné absorpční spektrum AMP je na obrázku 10.



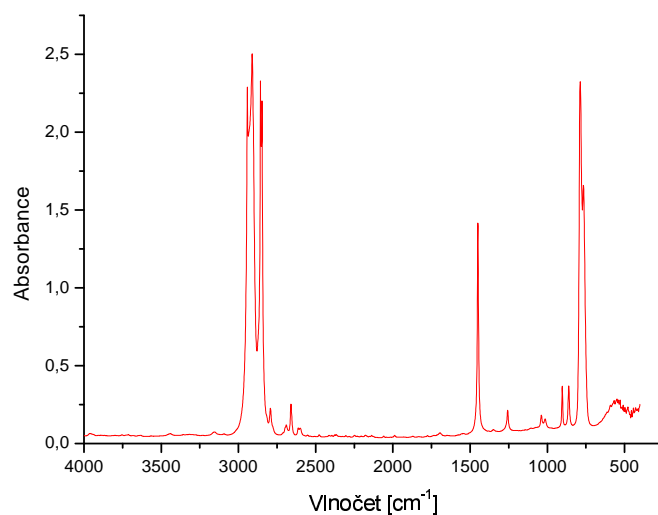
Obrázek 3: cyklohexan v KBr kyvetě



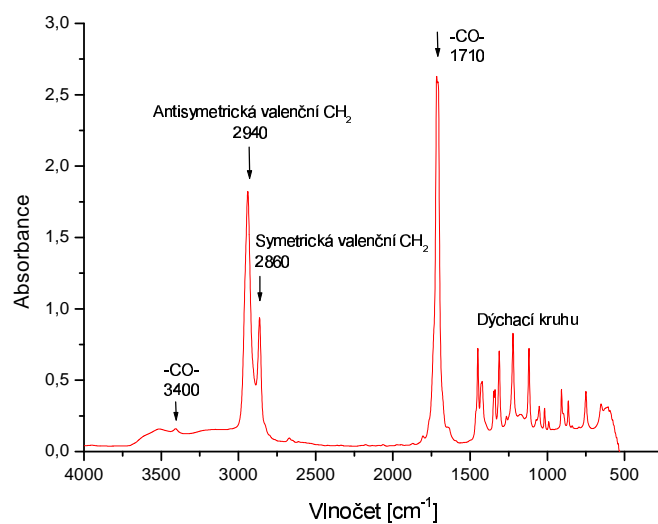
Obrázek 4: CCl_4 v KBr kyvetě



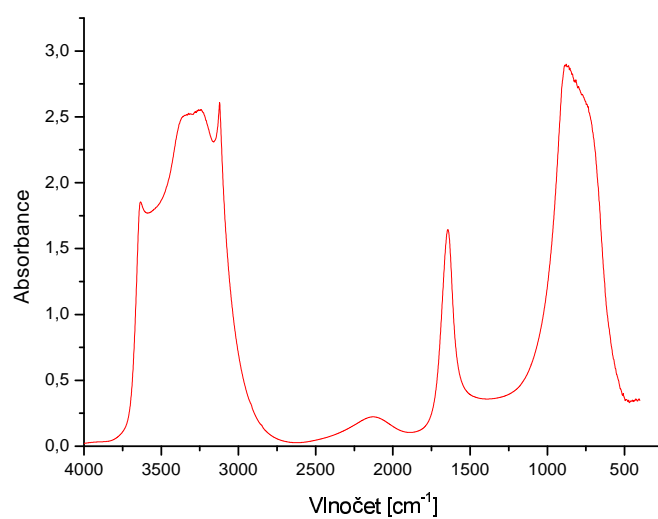
Obrázek 5: směs cyklohexanu a CCl_4 (1:4) v KBr kyvetě



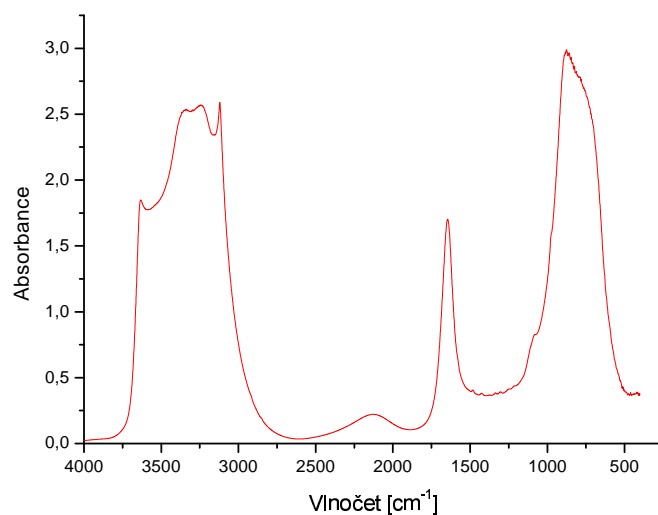
Obrázek 6: směs cyklohexanu a CCl_4 (4:1) v KBr kyvetě



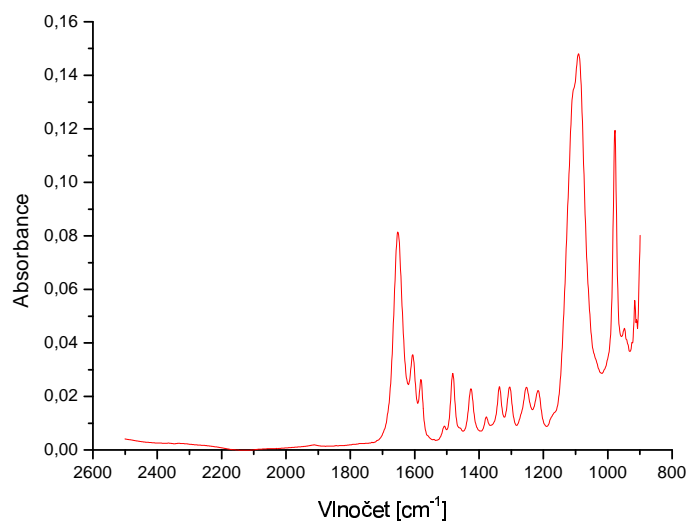
Obrázek 7: cyklohexanon v KBr kyvetě



Obrázek 8: voda, CaF_2 kyveta



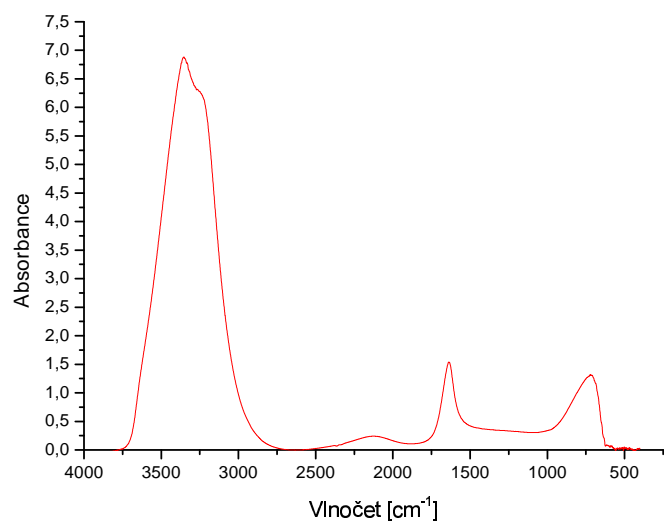
Obrázek 9: AMP disodná sůl + voda, CaF₂ kyveta



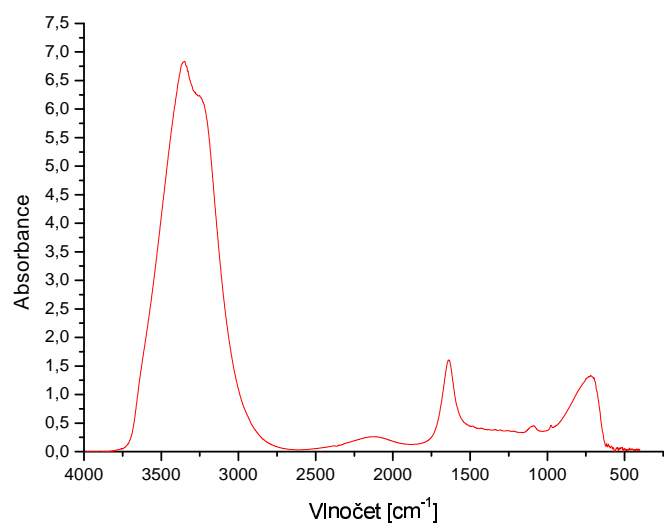
Obrázek 10: AMP disodná sůl, CaF₂ kyveta

4. Stejně měření jako v předchozím bodě jsme provedli metodou ATR. Spektrum vody je na obrázku 11, voda a AMP na obrázku 12. Výsledné spektrum AMP získané odečtením předchozích dvou je na obrázku 13.

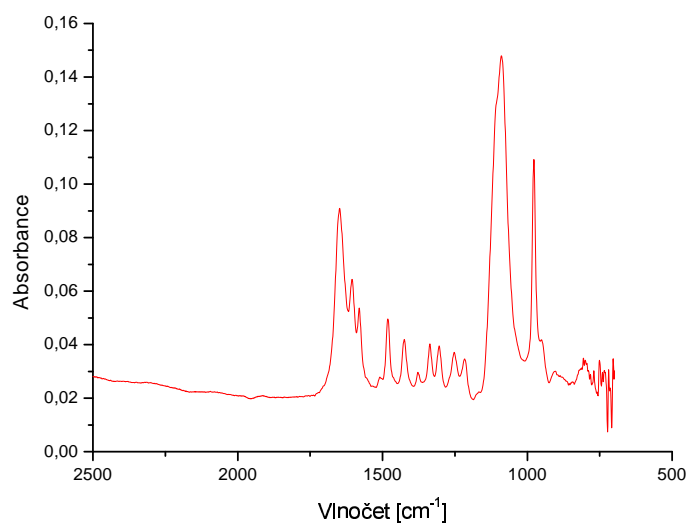
Nakonec jsme určovali absorpční spektrum vodní páry (obrázek 14).



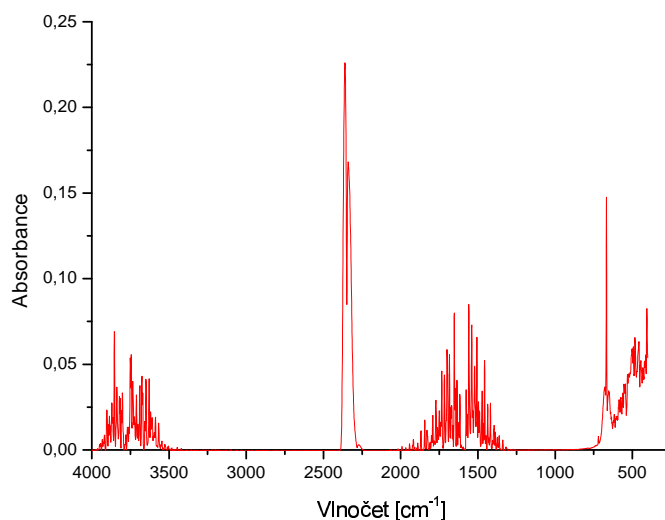
Obrázek 11: voda, ATR, CaF₂ kyveta



Obrázek 12: AMP disodná sůl + voda, ATR, CaF₂ kyveta



Obrázek 13: AMP disodná sůl, ATR, CaF₂ kyveta



Obrázek 14: vodní pára

Závěr:

V této úloze jsme změřili tloušťku KBr kyvety $d_{\text{KBr}} = (10,9 \pm 0,2) \mu\text{m}$ a CaF_2 kyvety $d_{\text{CaF}_2} = (13,8 \pm 0,1) \mu\text{m}$. Změřili jsme absorpční spektra cyklohexanu, tetrachlormetanu, cyklohexanonu a přiřadili jednotlivé vibrační módy k pozorovaným čarám. Určili jsme i absorpční spektrum disodné soli AMP a to i pomocí metody zeslabené totální reflexe. Nakonec jsme pozorovali absorpční spektrum vodní páry.

Reference

- [1] Studijní text k úloze *Základy infračervené absorpční spektroskopie*
- [2] V. Prosser a kolektiv, *Experimentální metody biofyziky*, str. 356, Academia Praha 1989.