



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Martina Valášková

Analýza vibračních spekter vybraných environmentálních kontaminantů

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Václav Profant, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: FP

Praha 2022

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Ráda bych poděkovala RNDr. Václavu Profantovi, Ph.D. za odborný vhled, trpělivost, ochotu, věnovaný čas a pomoc při sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Štěpánu Jílkovi za rady poskytnuté při měření a zpracování dat. Zvláštní poděkování patří mým nejbližším za podporu při studiu.

Název práce: Analýza vibračních spekter vybraných environmentálních kontaminantů

Autor: Martina Valášková

Katedra: Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Václav Profant, Ph.D., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Práce se zabývá studiem vibračních spekter molekul melaminu a thiramu metodami Ramanovy spektroskopie, k detailní interpretaci naměřených spekter jsou využity kvantově chemické simulace. Melamin bývá používán jako průmyslová chemikálie v plastech a lepidlech. Jeho požití ale může vést k močovým nebo ledvinovým kamenům a v krajních případech způsobit i smrt. Thiram je používán jako fungicid a zvířecí repelent, je však toxický. Zkoumána byla proměnlivost Ramanových spekter obou kontaminantů v polykrystalické a kapalné fázi a spekter získaných s využitím metody kapkově nanášených povlaků při různých koncentracích.

Klíčová slova: Ramanův rozptyl, kvantově mechanické simulace, thiram, melamin

Title: Analysis of vibrational spectra of selected environmental contaminants

Author: Martina Valášková

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Václav Profant, Ph.D., Institute of Physics of Charles University

Abstract: This bachelor thesis deals with the study of the vibrational spectra of melamine and thiram molecules using methods of Raman spectroscopy. Quantum chemical simulations are then used for a detailed interpretation of the measured spectra. Melamine is used as an industrial chemical in plastics and adhesives. However, its ingestion can lead to urinary bladder or kidney stones and, in extreme cases, cause death. Thiram is used as a fungicide and animal repellent, but it is toxic. The investigations included the variability of the Raman spectra of both contaminants in the polycrystalline and liquid phase and the spectra obtained by using the drop coating deposition Raman spectroscopy at different concentrations.

Keywords: Raman scattering, quantum mechanical simulations, thiram, melamine

Obsah

Předmluva	3
1 Environmentální kontaminanty	4
1.1 Melamin	4
1.2 Thiram	8
2 Teoretická část	11
2.1 Vibrace molekul	11
2.2 Ramanova spektroskopie	13
2.2.1 Ramanova mikroskopie	15
2.2.2 DCDR	16
2.2.3 SERS	17
2.3 Kvantově mechanické simulace	17
2.3.1 Metody	17
2.3.2 Geometrická optimalizace	18
2.3.3 Vibrační spektra	18
2.3.4 Modely rozpouštědla	19
3 Cíle	20
4 Experimentální metody	21
4.1 Vzorky	21
4.2 Laboratorní přístroje a nástroje	21
4.3 Rozptylové metody	21
4.3.1 Ramanův spektrometr - SPEX	21
4.3.2 Příprava vzorků a měření pomocí Ramanova spektrometru	22
4.3.3 Konfokální Ramanův mikroskop Alpha300 RSA (WITec) .	23
4.3.4 Příprava vzorků a měření pomocí konfokálního Ramanova	
mikroskopu Alpha300 RSA (WITec)	23
4.4 Zpracování dat	25
4.5 Simulace vibračních spekter	26
5 Výsledky	27
5.1 Měření práškových vzorků	27
5.1.1 Melamin v polykrystalické fázi	27
5.1.2 Thiram v polykrystalické fázi	30
5.2 Měření kapalných vzorků	33
5.2.1 Roztoky s melaminem	33
5.2.2 Roztoky s thiramem	38
5.3 Měření DCDR spekter	43
5.3.1 Vyschlé kapky melaminu	43
5.3.2 Vyschlé kapky thiramu	51
5.4 Srovnání Ramanových spekter kontaminantů v různých fázích . .	59
5.4.1 Ramanova spektra melaminu v různých fázích	60
5.4.2 Ramanova spektra thiramu v různých fázích	61
5.4.3 Souhrn experimentálních výsledků	62

5.5	Výpočet Ramanova spektra molekuly melaminu	64
5.5.1	Optimalizace struktury melaminu	64
5.5.2	Vibrační analýza monomeru neutrálního a jednou protonovaného melaminu	67
5.5.3	Vliv hybridní solvatace na Ramanova spektra monomeru melaminu	69
5.5.4	Vliv aglomerace na spektrum melaminu	72
5.5.5	Vliv volby funkcionálu	75
5.5.6	Přiřazení vibrací experimentálním pásům melaminu	76
5.5.7	Nasimulovaná spektra možných zdegradovaných forem melaminu	79
5.6	Výpočet Ramanova spektra molekuly thiramu	82
5.6.1	Konformační sken molekuly thiramu	82
5.6.2	Vibrační analýza thiramu a srovnání nasimulovaných a experimentálních spekter	89
5.6.3	Nasimulovaná spektra možných zdegradovaných forem thiramu	94
	Závěr	96
	Seznam použité literatury	98
	Seznam obrázků	103
	Seznam tabulek	109
	Seznam použitých zkratk	110

Předmluva

Environmentální kontaminanty mohou způsobit znečištění vody, atmosféry, půdy nebo kontaminaci potravin. Mezi environmentální kontaminanty se řadí i melamin a thiram. Melamin je používán jako průmyslová chemikálie při zpracování a výrobě plastů a adheziv, odkud se však může dále uvolňovat. Jeho podvodné přidávání do jídla za účelem zfalšování obsahu proteinů vedlo v několika případech k úmrtí a jeho množství v potravinách je na území Evropské unie (EU) regulováno. Thiram může sloužit jako fungicid a zvířecí repelent. Kvůli toxickým účinkům však není jako účinná látka na území EU povolen.

Při detekci a kontrole zakázaných či jinak regulovaných látek může být vibrační spektroskopie alternativou ke standardním analytickým metodám. Mezi metody vibrační spektroskopie patří Ramanova spektroskopie založená na Ramanově rozptylu. Experimenty uskutečněné na Fyzikálním ústavu UK v minulých letech se věnovaly Ramanově spektroskopii kapkově nanášených povlaků melaminu i thiramu při nízkých koncentracích s cílem nalézt jejich detekční limity. Tato naměřená spektra však vykazovala variabilitu, jež se nepodařilo uspokojivě interpretovat.

Tato práce se věnuje detailní analýze Ramanových spekter melaminu a thiramu v různých fázích a koncentracích. Provedena byla kvalitní makroskopická měření na Ramanově spektrometru i srovnávací mikroskopická měření s využitím konfokálního Ramanova mikroskopu. K podrobné interpretaci experimentálně získaných dat a v nich pozorovaných změn byly dále využity kvantově chemické výpočty.

Práce je rozdělena do pěti kapitol. První kapitola obsahuje popis vlastností obou molekul zkoumaných kontaminantů, jejich využití, informace o toxicitě a stručný kontext na nich prováděných měření na poli vibrační spektroskopie. Druhá kapitola obsahuje teoretický popis vibrací molekul, Ramanova rozptylu a metod jej využívajících. Taktéž obsahuje stručný popis problematiky kvantově mechanických simulací. Třetí kapitola je seznam cílů této práce. Ve čtvrté kapitole je možné nalézt informace o použitých přístrojích, vzorcích a následném zpracování experimentálních i vypočtených dat. Pátá kapitola se věnuje výsledkům provedených experimentů i výstupům z provedených výpočtů, a to včetně jejich diskuze. Závěr práce shrnuje získané výsledky.

1. Environmentální kontaminanty

Environmentální kontaminanty jsou chemické látky, které se náhodně i záměrnou činností dostávají do životního prostředí. Jejich přítomnost zde pak vede k jeho znečištění nebo znehodnocení jeho kvality. Environmentální kontaminanty mohou způsobit znečištění vody (pitné vody, vodních toků i odpadních vod), atmosféry, půdy a v neposlední řadě se mohou dostat do potravního řetězce a být příčinou kontaminace potravin. Pronikání environmentálních kontaminantů do prostředí může být výsledkem lidské činnosti nebo i přírodních dějů (v takovém případě však stále může lidská aktivita napomáhat, případně urychlovat jejich šíření). (Government of Canada) (European Commission, a) (European Commission, b) Takovéto látky jsou studovány, aby bylo možné je v prostředí a produktech identifikovat a eventuálně je odbourat a eliminovat jejich škodlivé účinky. Mezi environmentální kontaminanty patří rovněž melamin a thiram.

1.1 Melamin

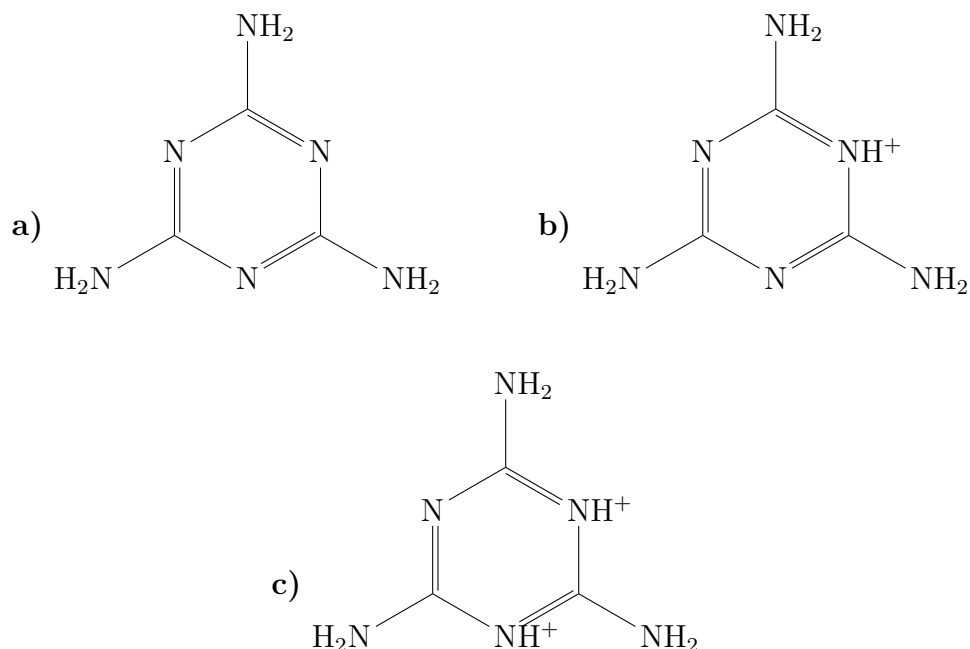
Molekula melaminu (IUPAC (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii) názvem 1,3,5-triazin-2,4,6-triamin, sumárním vzorcem $C_3H_6N_6$) je trimer kyanimidu. Molární hmotnost molekuly melaminu je $M = 126,123 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Melamin se může vyskytovat ve třech formách – jako neutrální molekula nebo jako jednou či dvakrát protonovaný melaminový kationt (viz *Obrázek 1.1*). (Chemicalize, a) Dle provedených experimentů využívajících ultrafialovou (UV) absorpci a výpočtů využívajících teorie molekulových orbitalů, experimentů v infračerveném (IR) spektru a experimentů využívajících nukleární magnetickou rezonanci k protonaci dochází na jednom endocyklickém dusíku (či dvou endocyklických dusících) v triazinové struktuře (Chattaraj a Paul, 2018) (Perpétuo a Janczak, 2008). Rozpustnost ve vodě¹ je poměrně nízká, a to $2,69 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Yalkowsky a kol., 2010), významným rozpouštědlem je DMSO (dimethylsulfoxid), v němž je rozpustnost vyšší.

Melamin bývá používán jako průmyslová chemikálie v plastech a lepidlech, neboť kondenzační polymerací s formaldehydem vzniká melaminová pryskyřice. Využití má také v průmyslu, který se zabývá zpracováváním a výrobou laminátu, adheziv nebo pojiv. V plastech, papíru a barvách byla využívána i jeho vlastnost zpomalovat hoření, pramenící z vysokého obsahu dusíku (Chattaraj a Paul, 2018).

Melamin byl podvodně přidáván do jídla za účelem zfalšování obsahu proteinů měřeného přes obsah dusíku, který tvoří v molekule melaminu přibližně 67 % na jednotku hmotnosti (Mircescu a kol., 2012). Jmenovitě jde o skandál v Číně v roce 2008, kdy bylo zjištěno jeho přidávání do sušeného mléka, což vedlo k tvorbě močových a ledvinových kamenů u dětí a kojenců a v několika případech i k úmrtí. Později byl popsán mechanismus tvorby močových kamenů pomocí vodíkovou vazbou provázaného komplexu mezi melaminem a kyselinou močovou. Melamin je z tohoto důvodu zakázaný (nebo je regulovaný jeho výskyt) v jídle, krmivu či při produkci hnojiv (Chattaraj a Paul, 2018). K vystavení melaminu nebo jeho vedlejším produktům (ammelinu a ammelidu) však může dojít z různých

¹Rozpustnost při 20° C.

ných dalších důvodů od uvolňování z obalových materiálů po rozpad pesticidu cyromazinu (Mircescu a kol., 2012). Na území EU je množství melaminu v potravinách regulováno hodnotou $2,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v jídle s výjimkou počáteční kojenecké a pokračovací kojenecké výživy (zde $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). (Evropská komise, 2012) Světová zdravotnická organizace (WHO) stanovila tolerovatelný denní příjem pro člověka na $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Světová zdravotnická organizace (WHO), 2008).



Obrázek 1.1: Strukturní vzorec molekuly melaminu v **a)** neutrální, **b)** jednou protonované, **c)** dvakrát protonované formě

Vibrační spektroskopie může být v případě melaminu alternativou ke standardním analytickým metodám. S touto motivací již byla zkoumána a získána některá vibrační spektra melaminu.

Mircescu a kol. (2012) porovnávali naměřená data s výpočetně získanými předpověďmi - konkrétně FTIR² spektrum polykrystalického melaminu, SERS³ spektrum melaminu v neutrální formě v roztoku koloidního stříbra o hodnotě pH 8 o koncentraci melaminu 10^{-4} M, FT-Ramanovo spektrum melaminu v práškové formě nebo SERS spektrum jednou protonovaného melaminového kationtu v roztoku koloidního stříbra o hodnotě pH 4 o koncentraci melaminu 10^{-4} M porovnávali s využitím výpočtů na základě teorie hustotního funkcionalu (DFT) získaným IR spektrem jedné neutrální molekuly melaminu⁴, IR a Ramanovým spektrem klastru 10 molekul melaminu⁵ nebo Ramanovým spektrem jednoho jednou protonovaného melaminového kationtu⁶.

Malá rozpustnost melaminu ve vodě je z hlediska měření většinou překážkou pro získání kvalitního Ramanova spektra melaminu ve vodném roztoku. Vzhledem

²infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

³povrchem zesílený Ramanův rozptyl

⁴Výpočet byl proveden při volbě B3LYP/6-31G(d).

⁵Ve zvolené struktuře 4 molekuly mohly volně vibrovat, 6 zůstalo fixovaných, výpočty byly provedeny při volbě B3LYP/6-31G(d).

⁶Výpočet byl proveden při volbě B3LYP/6-311++G(d,p).

k malé rozpustnosti ve vodě však byla zkoumána Ramanova spektra melaminu s využitím metody DCDR (Ramanova mikrospektroskopie kapkově nanášených povlaků) a byla naměřena spektra melaminu v práškové formě a z vyschlých vodních roztoků o koncentracích $15,86 \cdot 10^{-3}$ M, $1,59 \cdot 10^{-3}$ M, $0,16 \cdot 10^{-3}$ M, $31,7 \cdot 10^{-6}$ M, $6,34 \cdot 10^{-6}$ M⁷ (Příkryl, 2020). Takto naměřená spektra však vykazovala proměnlivost. V této práci byly provedeny makro měření, srovnávací mikro měření a kvantově mechanické simulace za účelem objasnit tuto pozorovanou variabilitu.

Molekulárně dynamické (MD) simulace⁸ i experimentálně získaná data ukazují, že se snižující se koncentrací melaminu klesá tendence molekul melaminu asociovat ve vodě a dochází k vyšší hydrataci molekul melaminu⁹. Navíc dále ukazují, že sklon molekul melaminu k asociaci se zmenšuje s rostoucí teplotou¹⁰ (Chattaraj a Paul, 2018).

Ve vodných roztocích mohou molekuly melaminu formovat vodíkové vazby s jinými molekulami melaminu i s molekulami vody. V molekule melaminu může k vodíkové vazbě dojít prostřednictvím tří exocyklických sp^3 -hybridizovaných atomů dusíku, které mohou být ve vodíkové vazbě donory i akceptory, a tří endocyklických sp^2 -hybridizovaných atomů dusíku, které mohou mít ve vodíkové vazbě funkci akceptorů. Po započtení vodíkového můstku mezi molekulami vody může tedy ve vodném roztoku melaminu být pět různých typů vodíkových vazeb – voda-voda, melaminový sp^3 N-voda, melaminový sp^2 N-voda, melaminový sp^3 N-melaminový sp^3 N a melaminový sp^3 N-melaminový sp^2 N. Převažující melamin-melaminovou vodíkovou interakcí je pak dle MD výpočtů interakce melaminový sp^3 N-melaminový sp^2 N a ve vodíkových interakcích voda-melamin převládá vazba melaminový sp^3 N-voda nad vazbou melaminový sp^2 N-voda.¹¹ Se snižující se koncentrací melaminu postupně roste počet melamin-voda vodíkových vazeb a dochází k úbytku melamin-melaminových vazeb. Stejně tak roste počet voda-voda vodíkových vazeb.¹² Potvrzujících výsledků bylo dosaženo i vykreslením prostorového rozložení melaminu kolem referenční molekuly melaminu (Chattaraj a Paul, 2018).

PMFs (Potential of Mean Forces) výpočty melamin-melaminových interakcí ve vodném roztoku indikují energetickou výhodnost formování melaminových dimerů (tvořených prostřednictvím vodíkové vazby sp^3 N-vedlejší sp^2 N, $\pi - \pi$ interakce mezi aromatickými strukturami molekul melaminu mají v tomto případě zanedbatelný efekt na asociování molekul melaminu)¹³. Kvantově mechanické simulace¹⁴ ukazují, že nejvíce stabilní je v tomto případě téměř koplanární struktura dimeru melaminu¹⁵ (Chattaraj a Paul, 2018).

V případě krystalů tvoří neutrální molekuly melaminu dvojrozměrnou síť.

⁷Některá z měření byla provedena dvakrát na rozdílných komerčních substrátech.

⁸Provedeno pro 8 neutrálních molekul melaminu ve vodě.

⁹Výpočty provedeny pro 300 K, normální atmosférický tlak a koncentrace 0,0725 M, 0,1085 M, 0,1735 M a 0,2876 M.

¹⁰Zkoumáno při teplotách 280, 300 a 320 K.

¹¹Výpočet proveden pro 300 K, normální atmosférický tlak a koncentraci 0,2876 M.

¹²Výpočty provedeny pro 300 K, normální atmosférický tlak a koncentrace 0,0725 M, 0,1085 M, 0,1735 M a 0,2876 M.

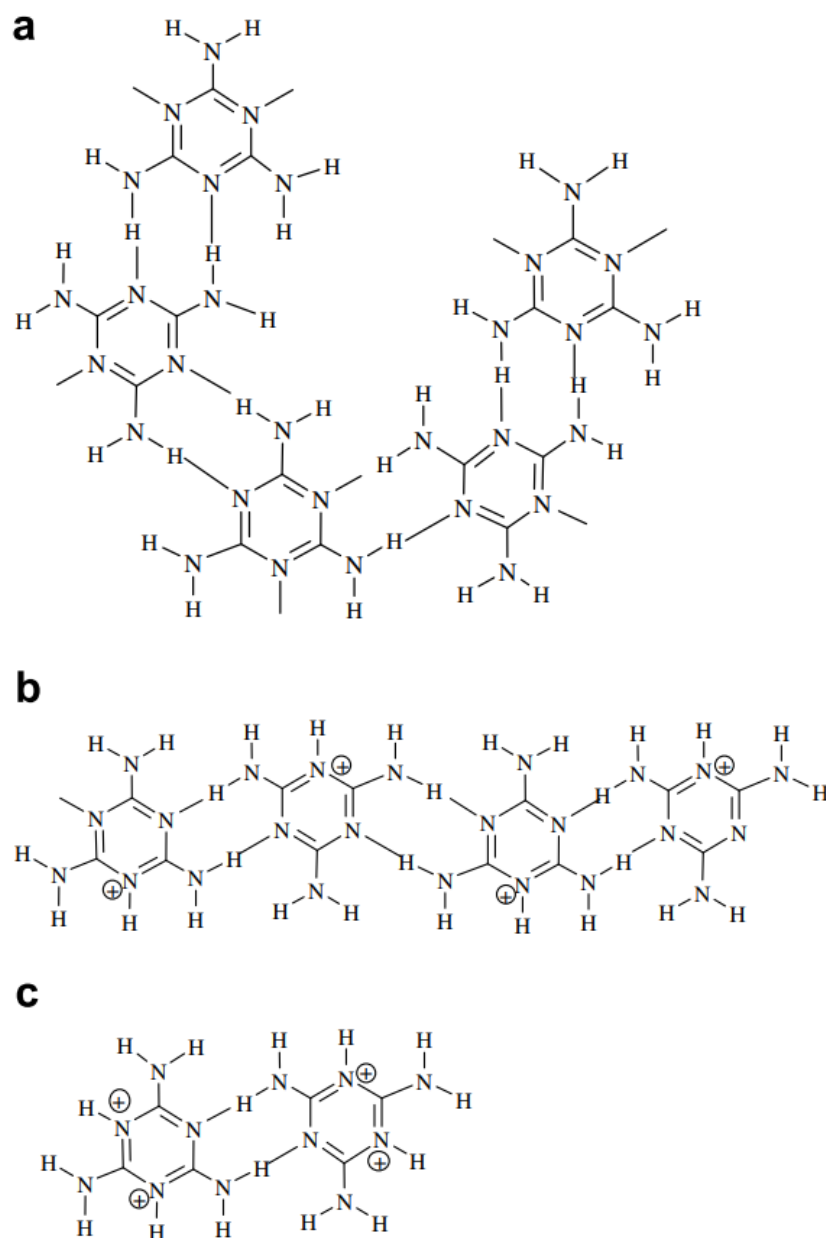
¹³Výpočty provedeny pro 300 K.

¹⁴Provedeny nejprve při volbě B3LYP-D3 s triple- ζ bázi 6-311++G(d,p), ale opakovány i s různými bázemi a metodami s podobnými výsledky.

¹⁵V porovnání s paralelním, antiparalelním, popřípadě kolmým uspořádáním, která byla zkoumána pomocí relaxovaného PES (nadplocha potenciální energie) skenu.

Protonace triazinového kruhu pak vede ke snížení dimenze výsledného uspořádání molekul melaminu (viz *Obrázek 1.2*). Jednou protonované kationty melaminu tvoří jedno-dimenzionální vodíkově provázané řetězce (Perpétuo a Janczak, 2008), protože v tomto případě jsou přítomné aminové skupiny zapojené do komplikovanějších a rozsáhlejších intermolekulárních interakcí, jejichž výsledkem je delokalizace π -elektronů, což vede k planárnějším útvarům (Scoponi a kol., 1992) (Vella-Zarb a kol., 2014), zatímco dvakrát protonované kationty melaminu tvoří pouze dimerní struktury. Ve vzácnějších případech může dojít ke vzniku struktury, jež obsahuje neutrální molekuly melaminu i jednou protonované melaminové kationty. Příkladem jsou krystaly melaminu a aromatických karboxylových kyselin, kdy neutrální a protonovaná molekula melaminu prostřednictvím intermolekulární vodíkové vazby tvoří planární dimer, případně dále tvoří polymerní řetězec. (Perpétuo a Janczak, 2008)

Neutrální molekuly melaminu ve většině pozorovaných případů včetně čistého melaminu a jeho kokrystalů tvoří v krystalické mřížce lomený vlnitý vzor. Krystaly vzniklé přesycením roztoku melaminu v DMSO částečným odpařováním tvoří střídané vrstvy DMSO a molekul melaminu. Každá vrstva rozpouštědla se skládá ze dvou molekul DMSO orientovaných proti sobě tak, že atomy síry jsou co nejdále od sebe. Molekuly melaminu jsou uspořádány ve zvlněných listech prostřednictvím vodíkové vazby mezi endocyklickými dusíky a exocyklickými NH_2 skupinami. Jedná se o uspořádání, které je na rozhraní mezi krystalovou strukturou čistého melaminu s trojdimenzionální sítí bez výrazných vrstev a většiny ostatních krystalových struktur solí nebo kokrystalů jednou protonovaných melaminových kationtů s planárnějším uspořádáním molekul melaminu (Vella-Zarb a kol., 2014).

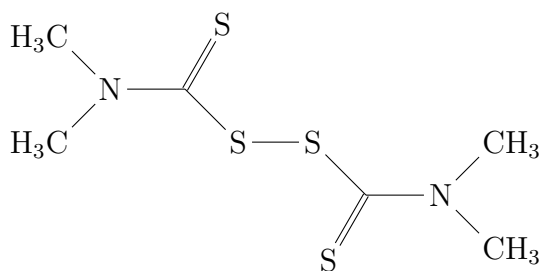


Obrázek 1.2: Uspořádání molekul melaminu v závislosti na stupni protonace: **a)** 2D vrstva neprotonovaného melaminu, **b)** polymerní 1D řetězec, **c)** dimer; převzato z Perpétuo a Janczak (2008)

1.2 Thiram

Molekula thiramu (viz *Obrázek 1.3*) (IUPAC názvem tetramethylthiuram disulfid, sumárním vzorcem $C_6H_{12}N_2S_4$) patří do chemické rodiny dithiokarbamátů¹⁶ (Krieger, 2010). Molární hmotnost molekuly thiramu je $M = 240,42 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. (Chemicalize, b) Rozpustnost thiramu ve vodě je velmi nízká (Yalkowsky a kol., 2010), ale je lépe rozpustný v organických rozpouštědlech (Sharma a kol., 2003) (Krieger, 2010).

¹⁶Mezi dithiokarbamáty patří i další fungicidy a pesticidy, protože kvůli své struktuře se v metabolismu chovají jako jedy.



Obrázek 1.3: Strukturní vzorec molekuly thiramu

Thiram je používán jako fungicid sloužící k ošetření nesklizených plodin, semen a uskladněných nebo přepravovaných produktů. Navíc může být použit jako zvířecí repelent odpuzující hlodavce a vysokou zvěř v případě ovocných a okrasných stromů. Byl použit při léčbě svrabu, v opalovacích krémech a pro své baktericidní účinky byl přidáván do mýdel nebo aplikován na kůži. Dalším využitím je funkce urychlovače a vulkanizačního činidla v gumárenském průmyslu. (Sharma a kol., 2003)

Thiram se může vstřebávat neporušenou kůží a zažívacím traktem, dráždí oči nebo může být vdechnut. V případě kontaktu s neporušenou pokožkou jsou toxické účinky nejmenší, v případě pozření pak větší a nejvíce toxický je při inhalaci. (United States Prevention Agency, 2004) V lidském těle vzniká rozpadem thiramu jedovatý sirouhlík. Kvůli nízké rozpustnosti ve vodě a tendenci adsorbovat na částicích v zemi však není předpokládáno, že by thiram kontaminoval podzemní vodu. Ve vodě dochází k fotodegradaci thiramu, a to do 7 dní působením slunečního světla, případně s poločasem rozpadu kolem 30 minut při přímém působení UV záření, v říční vodě navíc jeho rozpad probíhá rychleji (Filipe a kol., 2013). Kromě přímé aplikace se může thiram do prostředí dostat ale i kvůli rozpadům fungicidů ferbamu a ziramu. (Sharma a kol., 2003) Na území EU není thiram jako účinná látka povolen a nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 396/2005 stanovuje maximální limity reziduí pesticidů v ovoci a zelenině. Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a Světová zdravotnická organizace stanovily akceptovatelný denní příjem pro člověka na $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. (European Food Safety Authority (EFSA), 2020) (World Health Organization)

Analytické metody jsou v případě fungicidů a pesticidů využívány ke kontrole potravin, případně při sledování jejich dopadu na životní prostředí. S touto motivací jsou zkoumána vibrační spektra thiramu a to i při velmi malých koncentracích, aby byla v praxi možná (brzká) detekce. Z důvodu nízkých zkoumaných koncentrací a tendence thiramu adsorbovat byla dosud měřena především SERS spektra thiramu. Využívány jsou převážně nanočástice stříbra nebo zlata a jsou zkoumány vlastnosti SERS spekter v závislosti na tvaru či velikosti těchto částic a zároveň je hledána hranice detekovatelnosti thiramu užitím této metody. Detekováno bylo SERS spektrum thiramu nacházejícího se na ovocných slupkách s využitím Fe_3O_4 mikrosfér pokrytých Au nanotyčkami (Tang a kol., 2015). Roztok thiramu o koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ byl sprejem nanesen na jablečné slupky a ponechán k uschnutí za pokojové teploty. Poté byla na slupku nanesená suspenze s mikrosférami. Při vypařování v digestoři molekuly thiramu interagovaly s Au nanotyčkami, a nakonec tak skončily na mikrosférách. Mikrosféry s molekulami thiramu byly pomocí přiloženého magnetického pole přemístěny na podložní sklíčko a poté naměřeno SERS spektrum pomocí přenosného Ramanova spektrometru.

V dalších provedených (nesimulačních) měřeních bylo naměřeno spektrum thiramů až o koncentraci $1 \cdot 10^{-7}$ M. Použití různých spektrometrů však vedlo k odchylkám v naměřených spektrech. (Tang a kol., 2015) Snahy nalézt, případně posunout hranici detekovatelnosti vedly k získání SERS spekter thiramů o koncentracích v řádech $10^{-9} - 10^{-11}$ M (Guo a kol., 2015) (Saute a Narayanan, 2011) (Zhu a kol., 2017).

V kontextu nízkých měřených koncentrací ve vodě byla zkoumána Ramanova spektra thiramů i s využitím metody DCDR a byla naměřena spektra thiramů v práškové formě a z vyschlých vodních roztoků o koncentracích $0,25 \cdot 10^{-3}$ M, $0,12 \cdot 10^{-3}$ M, $2,50 \cdot 10^{-6}$ M¹⁷. Taktéž byla s využitím metody DCDR naměřena spektra thiramů z vyschlých etanolových roztoků o koncentracích $6,24 \cdot 10^{-3}$ M a $0,13 \cdot 10^{-3}$ M. (Přikryl, 2020) Takto naměřená spektra však vykazovala proměnlivost. V této práci byly provedeny makro měření, srovnávací mikro měření a kvantově mechanické simulace za účelem objasnit tuto pozorovanou variabilitu.

¹⁷Některá z měření byla provedena dvakrát na rozdílných komerčních substrátech.

2. Teoretická část

Molekuly nejsou statické objekty - kromě translace mohou dále rotovat a vibrovat. Naměřená rotační a vibrační spektra pak mohou poskytovat informace o geometrii nebo složení zkoumané molekuly. Významnou roli při analýze vibračních spekter má tzv. oblast otisku prstu¹, tj. část spektra odpovídající přibližně 1400 až 600 cm⁻¹ a vyznačující se hojnou přítomností vibračních pásů, které ve výsledku poskytují téměř „otisk prstu“ molekuly. Mezi základní metody vibrační spektroskopie patří IR absorpce a Ramanův rozptyl s širokými aplikacemi ve fyzice, chemii i biologii. Zatímco IR absorpce je v základě velmi jednoduchý proces (konkrétně přímý přechod mezi vibračními energetickými hladinami), v případě Ramanova rozptylu jde o neelastický rozptyl záření na molekule, kdy mají rozptýlené fotony energii změněnou o hodnotu odpovídající přechodu mezi vibračními hladinami molekulového systému. K detailní interpretaci experimentálně získaných dat pak slouží kvantově mechanické simulace, jejichž princip bude v *Sekci 2.3* popsán na základní úrovni, s níž je možné se setkat v učebnicích kvantové chemie, jako je například *Kvantová teorie molekul* (Skála, 1995).

2.1 Vibrace molekul

V případě elastické vazby si dvojjatomovou molekulu lze představit jako dva hmotné body spojené pružinkou. Pro úhlovou frekvenci vibrací molekuly ω_v pak platí

$$\omega_v = \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (2.1)$$

kde k je parametr charakterizující tuhost vazby a $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ je redukovaná hmotnost. Pro molekulu jako pro kvantový objekt jsou energie vibrační E_n kvantovány a v harmonické aproximaci platí

$$E_n = \hbar \omega_v \left(n + \frac{1}{2} \right), \quad (2.2)$$

kde \hbar je redukovaná Planckova konstanta a kde n je přirozené číslo kvantující jednotlivé energetické hladiny. Povolený přechod v harmonické aproximaci je pak dán výběrovým pravidlem $\Delta n = \pm 1$. Potenciál harmonického oscilátoru je

$$U(R) = \frac{1}{2} k (R - R_0)^2, \quad (2.3)$$

kde R je aktuální délka vazby a R_0 délka vazby pro nevibrující molekulu. (Daniš, 2019)

K přechodu mezi vibračními módy dochází v případě, že dojde k absorpci energie, která odpovídá rozdílu dvou vibračních energetických hladin, což jsou obvykle fotony s energií odpovídající IR záření.

Aby mohl být při IR absorpci foton s náležitou energií opravdu absorbován, a předána tak energie z fotonu molekule, musí odpovídající vibrace způsobit změnu

¹V angličtině „fingerprint region“.

dipólového momentu molekuly μ ; pak je daná vibrace tzv. aktivní, tedy viditelná, v IR spektru. Tedy

$$\frac{\partial \mu}{\partial Q} \neq 0, \quad (2.4)$$

kde Q je jaderná souřadnice (normální mód). Měřená intenzita dané vibrace je pak úměrná druhé mocnině této změny dipólového momentu. (Larkin, 2011)

Obdobná podmínka, a to

$$\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0, \quad (2.5)$$

kde α je polarizovatelnost molekuly, platí i v případě Ramanova rozptylu (podrobněji v *Sekci 2.2*). Informace obsažená v IR absorpčním spektru je z důvodu rozdílných výběrových pravidel komplementární k té v Ramanově spektru.

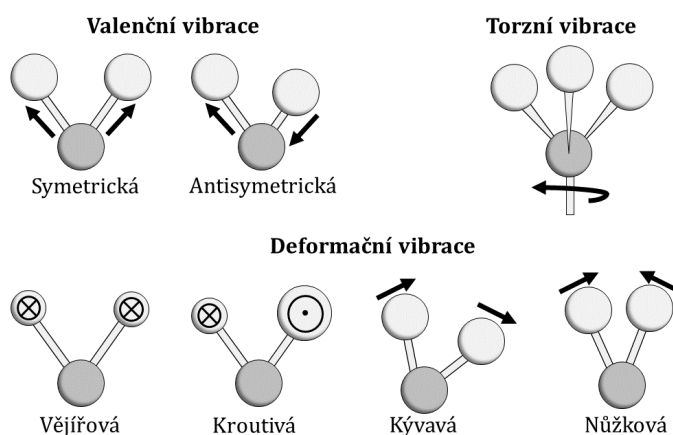
Jestliže není změna dipólového momentu lineárně úměrná R , v energii n -tého stavu přibude anharmonický příspěvek

$$E_n = h\nu_r \left(n + \frac{1}{2} \right) + h\nu_r \chi \left(n + \frac{1}{2} \right)^2, \quad (2.6)$$

kde ν_r je rovnovážná vibrační frekvence, h Planckova konstanta a χ konstanta anharmonicity. (Larkin, 2011)

N částicový systém má $3N$ stupňů volnosti, z čehož 3 stupně volnosti popisují translační pohyb a další 3 rotační pohyb, resp. 2 v případě lineární molekuly. Nelineární molekula tvořená N atomy má tedy $3N - 6$ dodatečných stupňů volnosti, které se projevují jako změny mezijaderných vzdáleností, vibrace, normální vibrační módy, lineární poté $3N - 5$.

Tři základní typy normálních vibračních módů CH_2 , popřípadě CH_3 skupiny jsou valenční vibrace, kdy se mění délka vazby mezi atomy molekuly, přičemž vazebný úhel zůstává stejný, deformační vibrace, kdy se mění vazebný úhel, a torzní vibrace, kdy dochází k otáčení vazby podél své hlavní osy (viz *Obrázek 2.1*). (Procházka, 2016)



Obrázek 2.1: Základní typy normálních vibračních módů CH_2 , popřípadě CH_3 skupiny

2.2 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda vibrační optické spektroskopie založená na nepružném rozptylu záření na zkoumané molekule a pojmenovaná podle indického fyzika C. V. Ramana, který v roce 1928 se svým studentem K. S. Krishnanem tento rozptyl pozoroval (Raman a Krishnan, 1928) a za jeho objev získal v roce 1930 Nobelovu cenu.

Elektromagnetické pole s molekulou buď nemusí interagovat, nebo může být absorbováno, nebo rozptýleno. Pokud energie fotonu odpovídá energetickému rozdílu mezi základním a excitovaným stavem, může dojít k jeho absorpci, a následkem toho k vyexcitování molekuly do vyššího energetického stavu. Molekula ve vyšším energetickém stavu po uplynutí střední doby života daného energetického stavu může opět přejít do nižšího energetického stavu souběžně s emisí fotonu. (Smith a Dent, 2019) (Procházka, 2016)

V případě rozptylu však nemusí mít interagující foton energii odpovídající rozdílu dvou energetických hladin v molekule. Elektromagnetické pole interagující s molekulou totiž může deformovat (polarizovat) „oblak elektronů“ kolem jader, a vytvořit tak tzv. virtuální² energetický stav, do kterého pohlcením odpovídajícího fotonu může být molekula vybudena. Okamžitě poté je vyzářen foton o stejné (to nastává v případě, že se „oblak elektronů“ v průběhu rozptylu navrátí do výchozího stavu), nebo trochu rozdílné energii (to nastává v případě, že je v průběhu rozptylu vyvolán pohyb jader atomů). Nejčastěji dochází k přechodu mezi vibračními energetickými hladinami při stejné elektronové konfiguraci molekuly v základním stavu. (Smith a Dent, 2019) (Procházka, 2016)

Pokud je energie vyzářeného fotonu stejná jako energie fotonu dopadajícího, jde o tzv. pružný (Rayleighův) rozptyl, pokud je energie vyzářeného fotonu rozdílná, jde o nepružný rozptyl (Ramanův) (schéma viz *Obrázek 2.2*). Nejčastěji dochází právě k pružnému, Rayleighově rozptylu. Pravděpodobnost, že dojde k Ramanově rozptylu je velmi nízká - pouze jeden z $10^6 - 10^8$ fotonů je rozptýlen nepružně. Pokud je energie rozptýleného fotonu menší než energie dopadajícího fotonu, jde o tzv. Stokesovu větev a molekula je v tomto případě vybudena do vyššího vibračního energetického stavu, a naopak, pokud je energie rozptýleného fotonu větší, jde o tzv. anti-Stokesovu větev a molekula se po rozptylu nachází na energeticky nižší vibrační hladině. Při pokojové teplotě je podle Boltzmannova rozdělení většina molekul v základním vibračním stavu, případně mohou být ještě z části populovány nejnižší excitované vibrační stavy. Z tohoto důvodu jsou Stokesovy větve ve spektru v porovnání s anti-Stokesovými více intenzivní a využívány v experimentu. (Smith a Dent, 2019) (Procházka, 2016)

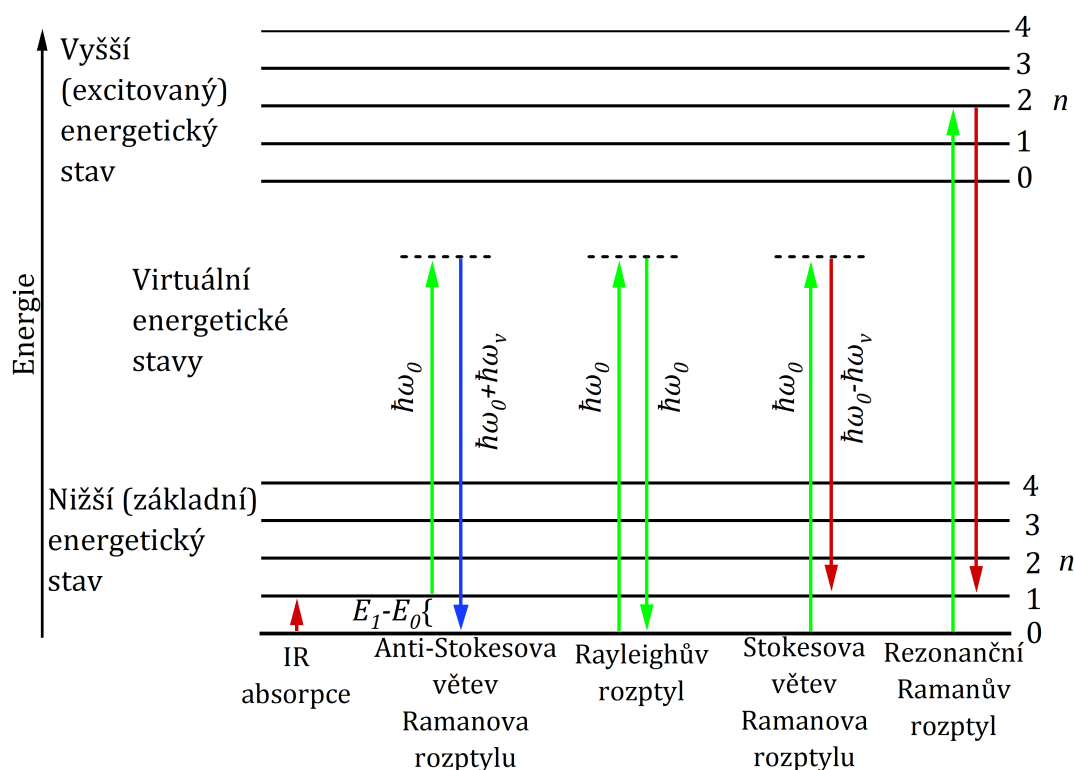
Za výše popsaných podmínek musí při Ramanově rozptylu rozptýlený foton splnit podmínku

$$\hbar\omega_{S/AS} = \hbar\omega_0 \mp (E_1 - E_0), \quad (2.7)$$

kde \hbar je redukovaná Planckova konstanta, ω_S , resp. ω_{AS} , je úhlová frekvence rozptýleného fotonu (index S značí Stokesovu větev a AS značí anti-Stokesovu větev), ω_0 je úhlová frekvence dopadajícího (případně „prvního“) fotonu a kde

²V případě, že tento virtuální stav neodpovídá skutečné energetické hladině molekuly, jedná se o tzv. normální Ramanův rozptyl, v případě, že je ale energie fotonu velmi blízká energii opravdové energetické hladiny molekuly, přejde molekula do odpovídajícího excitovaného stavu a jedná se o tzv. rezonanční Ramanův rozptyl (Procházka, 2016).

E_0 , resp. E_1 , je energie základního, resp. prvního excitovaného vibračního stavu. (Procházka, 2016)



Obrázek 2.2: Schéma energetických přechodů mezi vibračními stavy při Rayleighově a Ramanově rozptylu

Rozdíl energie dopadajících a rozptýlených fotonů se nazývá Ramanův posun, měřený v cm^{-1} (ve vibrační spektroskopii je zvykem při měření frekvencí používat vlnocet a jako jednotky cm^{-1}), odpovídá vlnocetě vibračního módu „účastníciho“ se rozptylu a není závislý na vlnové délce dopadajícího záření. (Procházka, 2016)

Pro intenzitu Ramanova rozptylu I_R platí

$$I_R \sim \nu^4 I_0 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2, \quad (2.8)$$

kde I_0 je intenzita dopadajícího záření, N je počet molekul v daném stavu účastnících se rozptylu, ν je frekvence dopadajícího záření, α je polarizovatelnost molekul a Q je jaderná souřadnice. Intenzita naměřeného Ramanova spektra tedy závisí na koncentraci měřené látky, a Ramanova spektroskopie tak poskytuje kromě kvalitativních výsledků i kvantitativní analýzu. Použitím laseru s kratší vlnovou délkou nebo zvýšením jeho výkonu může být intenzita naměřeného Ramanova spektra zvýšena. (Larkin, 2011) Pokud má být vibrace v Ramanově spektru aktivní (viditelná), musí zjevně platit, že se při ní mění polarizovatelnost molekuly, tedy

$$\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \neq 0. \quad (2.9)$$

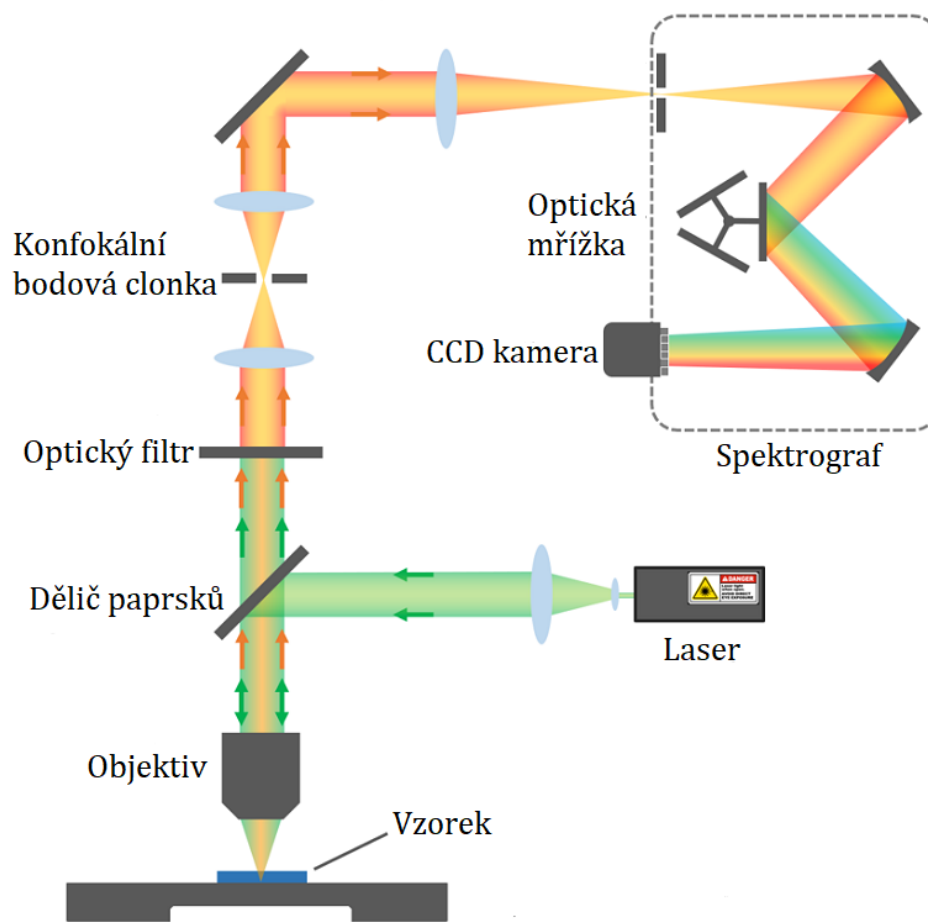
2.2.1 Ramanova mikroskopie

Ramanův mikroskop (schéma viz *Obrázek 2.3*) kombinuje informaci získanou z Ramanova spektrometru s informací o pozici na vzorku z optického mikroskopu. Laserový paprsek vstupuje do Ramanova mikroskopu, prochází přes dělič paprsků, který jej nasměruje na vzorek, a objektiv mikroskopu, který jej zfokusuje do bodu, jehož průměr odpovídá Abbeho difrakčnímu limitu. Na vzorku dochází k Ramanově i Rayleighově rozptylu a takto rozptýlené záření se vrací zpět přes objektiv k děliči paprsků a prochází dále do mikroskopu. Výhodou děliče paprsků je, že část světla rozptýleného na povrchu vzorku může být nasměrována k okuláru, pomocí čehož může být následně určena původní poloha paprsku na vzorku. Z praktických i bezpečnostních důvodů je však lepší mít na místě okuláru umístěnou kameru propojenou s počítačem. Za děličem paprsku se nachází optický filtr, který odfiltrává vlnovou délku použitého laseru, tedy fotony z Rayleighova rozptylu. (Smith a Dent, 2019) (Edinburgh Instruments)

Pokud je mikroskop konfokální, paprsek dále pokračuje ke konfokální bodové clonce, která filtruje světlo pocházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu, což umožňuje sběr rozptýleného záření pouze z určité hloubky vzorku.

Nakonec je paprsek zfokusován do spektrografu a zde pomocí optické mřížky rozdělen na jednotlivé frekvence, které jsou detekovány pomocí CCD (Charge-coupled device) a poslány počítači ke zpracování (Smith a Dent, 2019).

S využitím Ramanovy mikroskopie je možné získat informaci o chemickém složení vzorku in situ bez nutnosti další úpravy, případně zničení vzorku. Kromě přesného výběru místa na zkoumaném vzorku je výhodou, že může být pro experiment použit i malý objem vzorku. Ramanův mikroskop poskytuje informace o chemickém kontrastu - o chemickém složení - vzorku, neboť může změřit spektrum odpovídající každému pixelu v pozorovaném obrazu a následně je možné provést analýzu těchto spekter (např. barevně zobrazit intenzitu vybraného pásu ve spektru nebo statisticky vyhodnotit podobnost spekter z jednotlivých bodů), a zjistit tak složení jednotlivých částí zkoumaného vzorku. Tato technika se nazývá Ramanovské spektrální mapování.



Obrázek 2.3: Schéma konfokálního Ramanova mikroskopu; převzato z Edinburgh Instruments a upraveno

2.2.2 DCDR

Metoda kapkově nanášených povlaků je technika Ramanovy spektroskopie, jež, na rozdíl od tradiční Ramanovy spektroskopie, dovoluje měřit roztoky o velmi malých koncentracích a objemech. (Kuižová a kol., 2021) Je založená na nanášení kapek roztoku na nesmáčivý (hydrofóbní) substrát, který by dále měl mít nízkou optickou absorbanci, vysokou optickou odrazivost a jehož Ramanovo spektrum by mělo být slabé nebo by alespoň nemělo interferovat se spektrem vzorku. (Zhang a kol., 2003)

Substrát musí být hydrofóbní, případně superhydrofóbní, aby se nanášený roztok rozprostřel do co nejmenší plochy, a vypařením rozpouštědla tak došlo k předkoncentraci (tedy zvýšení koncentrace). Některé látky se navíc při vypařování roztoku na nesmáčivých substrátech mohou usazovat v podobě prstenců, tzv. „kávových kroužků“, což dále zvyšuje jejich lokální koncentraci, jiné vysychají do podoby obecných skvrnek. Obojí však může být využito k naměření kvalitního Ramanova spektra. (Kuižová a kol., 2021) (Zhang a kol., 2003)

2.2.3 SERS

Povrchem zesílený Ramanův rozptyl je technika Ramanovy spektroskopie, jež dokáže zesílit intenzitu Ramanova rozptylu, a to o 5-11 řádů. Je založen na zesílení Ramanovy odezvy zkoumané látky interagující s lokalizovanými povrchovými plasmony kovů - většinou Au, Ag, nebo Cu. Mechanismus SERSu lze charakterizovat dvěma příspěvky k zesílení - elektromagnetickým a chemickým (molekulárním).

V případě elektromagnetického příspěvku dochází k zesílení signálu kvůli lokálnímu zesílení elektrického pole způsobeného rezonančním vyexcitováním povrchových plasmonů v kovu, a molekuly adsorbované na povrchu kovu tak mohou být vystaveny silnějšímu elektrickému poli. Pokud nastanou správné podmínky - související s tvarem kovového povrchu a polohou adsorbovaných molekul -, dochází k velmi intenzivnímu takovému zesílení. Chemický příspěvek k zesílení souvisí s přenosem náboje mezi molekulou a kovovým povrchem.

2.3 Kvantově mechanické simulace

Základním cílem kvantově chemických výpočtů je nalezení vlnové funkce zkoumané molekuly (molekulového systému) a získání energie dané molekuly (molekulového systému).

2.3.1 Metody

Ab initio (z latinského „od počátku“) výpočetní metody vycházejí z přírodních zákonů bez dodatečných předpokladů nebo empirických parametrů. Výchozím bodem pro získání vlnových funkcí je v tomto případě nejčastěji Bornova–Oppenheimerova aproximace, která umožňuje oddělit pohyb atomových jader a elektronů, a tzv. jednoelektronové přiblížení, kdy je místo systému vzájemně interagujících elektronů uvažován vždy jednotlivý elektron ve zprůměrovaném elektrickém poli ostatních elektronů - v efektivním potenciálu -, tento potenciál se dále určuje iterativně a jde o tzv. metodu self-konzistentního pole (SCF).

Základní metodou využívající SCF a metodou, která byla dlouhou dobu i nejvíce používanou, je Hartree-Fockova metoda (HF), která hledá vlnovou funkci ve tvaru Slaterova determinantu³ variačně.

Z variačního principu plyne, že HF poskytuje horní odhad energie zkoumané molekuly, báze použitá při výpočtu však ovlivní její hodnotu. Báze může být volena například jako vodíkovské orbitály, STOs (Slater type orbitals) nebo GTOs (Gaussian type orbitals). Může být použita minimální báze, kdy je použito jen tolik funkcí, kolik je potřeba k umístění všech zaplněných orbitalů v atomu, nebo například split-valence báze, kdy jsou vnitřní slupky atomu charakterizovány pomocí jednoho STO tvořeného několika GTO a valenční pak pomocí více (dvou - double ζ - nebo tří - triple ζ). Báze mohou být dále upraveny polarizačními funkcemi, které ošetřují narušení distribuce náboje v důsledku sdílení elektronů mezi jednotlivými atomy přidáním funkce, která aproximuje orbital o nižší symetrii, nebo mohou být upraveny difúzními funkcemi, které upravují popis rozložení

³Zajišťuje antisymetrizovaný součin vlnových funkcí jednotlivých elektronů (molekulových orbitalů), a tedy platnost Pauliho vylučovacího principu.

elektronové hustoty daleko od jader přidáním Gaussovských funkcí s malým exponentem. Často používané jsou i korelačně konzistentní báze vytvořené tak, aby systematicky konvergovaly k úplné bázi.

Dnes nejčastěji používaná metoda pro výpočty vlastností molekul a molekulových systémů je teorie funkcionalu hustoty, založená na Hohenbergových-Khonorových teorémech. V DFT je místo popisu systému pomocí vlnové funkce, která závisí na souřadnicích všech částí systému, volen popis pomocí elektronové hustoty (resp. jejího funkcionalu), která je funkcí pouze tří souřadnic x , y , z . Tvar funkcionalu hustoty však není přesně známý, a jsou tak využívány (často empiricky zatížené) odhady. Z tohoto důvodu není DFT čistě ab initio metodou. Díky popisu skrze elektronovou hustotu je však výpočetní náročnost přijatelná a při užití současně s provedením experimentu poskytuje DFT velmi dobré výsledky. V současnosti nejvyužívanějším DFT funkcionalem je hybridní funkcional B3LYP, vyvinutý už v roce 1993 (Čársky a Urban, 2008).

2.3.2 Geometrická optimalizace

Prvním krokem výpočtů je nalezení stabilního geometrického uspořádání molekuly. To se provádí prostřednictvím geometrické optimalizace. Molekula tvořená N atomy má $3N - 6$ (lineární molekula $3N - 5$) vnitřních stupňů volnosti. Nadplocha potenciální energie (PES) je pak hyperplocha v $3N - 6$ dimenzionálním stavovém prostoru, jejíž každý bod popisuje určitou geometrii systému, které lze přiřadit určitá energie. Při geometrické optimalizaci jsou hledána lokální minima na hyperploše, odpovídající stabilnímu uspořádání atomů, tedy konformeru molekuly. Sedlové body prvního řádu pak odpovídají tranzitním stavům molekuly. Nalézt minima (a sedlové body) na hyperploše je možné pomocí gradientu (vektoru derivací energie podle jaderných souřadnic), který udává směr poklesu energie, a Hessovy matice (matice druhých derivací energie podle jaderných souřadnic), která rozlišuje lokální minimum - v něm je pozitivně definitní, tedy všechna její vlastní čísla jsou kladná - od sedlového bodu - v něm je jedno její vlastní číslo záporné. Mezi metody geometrické optimalizace patří například metoda steepest descent, metoda konjugovaných gradientů, Newtonova-Rapsonova metoda nebo Bernyho algoritmus.

2.3.3 Vibrační spektra

Výpočet vibračních frekvencí je třeba provést na stejné úrovni výpočtu, jaká byla zvolena pro geometrickou optimalizaci systému, tedy použít stejnou metodu i bázi. Jako první je určena Hessova matice systému (matice silových konstant) a převedena do diagonálního tvaru. Pokud geometrie systému odpovídá jeho stabilnímu uspořádání, Hessova matice bude mít $3N - 6$ (resp. $3N - 5$ v případě lineární molekuly) kladných vlastních čísel, odpovídajících vibračním módům. Intenzity jednotlivých vibrací jsou v případě Ramanova spektra úměrné druhým mocninám derivací polarizovatelnosti podle jaderných souřadnic a v případě IR spektra druhým mocninám derivací dipólového momentu podle jaderných vzdáleností.

2.3.4 Modely rozpouštědla

Přítomnost rozpouštědla v systému je třeba zohlednit v simulacích, neboť může ovlivnit molekulové struktury, vazebné energie, excitační a ionizační energie, vibrační a rotační spektra a další. V případě mikrosolvatace jsou ke zkoumanému systému přidány explicitní molekuly rozpouštědla, což je velmi přímočarý přístup, který úspěšně postihuje slabé interakce mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou molekulou. Nevýhodou u mikrosolvatace jsou velké výpočetní nároky a pomalá konvergence s rostoucím počtem molekul rozpouštědla nebo nutnost středování přes různé konfigurace molekul rozpouštědla.

V případě implicitního modelu rozpouštědla je vliv roztoku určen jako výsledek interakce molekuly v solvatační kavitě (v prázdném prostoru ji obklopujícím) s polarizovaným kontinuem⁴. Jednotlivé implicitní modely rozpouštědla se liší ve způsobu určení velikosti a tvaru solvatační kavity⁵, v úrovni popisu rozpuštěnce, v konkrétním popisu dielektrika nebo ve způsobu výpočtu vlastností kavity. V modelu polarizovaného kontinua (PCM, Polarizable continuum model) a Conductor-like screening modelu (COSMO) je kavita volena jako překrývající se van der Waalovy sféry, u PCM je však kontinuum uvažováno jako dielektrikum, zatímco COSMO jej uvažuje jako vodič (a je tedy vhodnou aproximací v případě polárních rozpouštědel).

Pro dosažení lepších výsledků bývá používána kombinace mikrosolvatace a implicitního modelu rozpouštědla, kdy jsou do kavity obklopené polarizovaným kontinuem umístěny i explicitní molekuly rozpouštědla, které přímo interagují s rozpuštěncem například vodíkovými můstky.

⁴Jemuž je přiřazena odpovídající relativní permitivita.

⁵Ta může být volena například jako kulová dutina, elipsoidní dutina nebo na základě van der Waalova poloměru.

3. Cíle

Hlavním cílem této bakalářské práce je analýza dvou významných environmentálních kontaminantů melaminu a thiramu pomocí metod Ramanovy spektroskopie a kvantově chemických výpočtů. Zajímá nás, jaké spektrální změny jsou spojeny s měřením v různých fázích (polykrystalická fáze, roztok, amorfni deposit) a vysvětlení těchto změn na úrovni, kterou umožňuje kvantová teorie molekul. Chceme zjistit, jaké jsou konformační preference těchto molekul a charakterizovat jejich případnou degradaci, ke které může během měření docházet.

Dílčí cíle této bakalářské práce je možné stanovit v následujících bodech:

1. Zpracování rešerše o melaminu a thiramu pokrývající biologický účinek a toxicitu těchto kontaminantů, informace o jejich struktuře a spektroskopických studiích, které se jim věnovaly.
2. Seznámení se s metodami vibrační spektroskopie, jejich teoretickými principy, instrumentalizací a simulacemi spekter s důrazem na Ramanovu spektroskopii a mikrospektroskopii. Zvládnutí základů kvantově mechanických simulací molekulových vlastností.
3. Získání experimentálních spekter obou kontaminantů v polykrystalické formě (prášku), z roztoků a z vyschlých kapek. Pro každý ze vzorků stanovení nejvhodnějšího rozpouštědla umožňujícího měření Ramanova rozptylu v makro režimu a zároveň nezpůsobujícího zvýšenou míru degradace vzorku.
4. Provedení kvantově chemické simulace Ramanových spekter melaminu a thiramu při uvážení konformační flexibility, vlivu rozpouštědla, tendence agregovat a vlivu metody a úrovně výpočtu.
5. Na základě porovnání experimentu a simulací vypracování vibrační analýzy a detailní interpretace naměřených spekter.

4. Experimentální metody

V této kapitole jsou uvedeny vzorky a technické vybavení použité při měření. Dále tato kapitola popisuje postup, kterým byla zpracována experimentálně získaná data, a metodiku použitou při simulacích vibračních spekter.

4.1 Vzorky

Při měření byly použity tyto komerčně vyráběné vzorky zkoumaných kontaminantů zakoupené od firmy Merck (Sigma-Aldrich) ve formě krystalického prášku:

- Melamin: produktové číslo: M2659, čistota: 99 %,
- Thiram: produktové číslo: 45689, čistota: $\geq 98,0$ % (dále jako Thir 98),
- Thiram: produktové číslo: 43966, čistota: certifikovaný referenční materiál (dále jako Thir ≤ 100),
- Thiram: produktové číslo: T24201, čistota: $\geq 96,5$ % (dále jako Thir 96,5).

Použitá rozpouštědla byla vhodná pro vibrační spektroskopii (tj. neobsahovala fluorescenční nečistoty) a byla brána z běžných zásob Fyzikálního ústavu UK.

4.2 Laboratorní přístroje a nástroje

Pro přípravu vzorků bylo použito následující technické vybavení:

- váha: Mettler Toledo AG245,
- centrifuga: GMCLab™ Gilson™ Mini centrifuga,
- pipety: Gilson™ PIPETMAN,
- pH metr: Thermo Scientific Orion 350 PerpHecT® LogR® Meter.

4.3 Rozptylové metody

Při měření byl použit Ramanův spektrometr postavený na Fyzikálním ústavu UK (Oddělení fyziky biomolekul) a konfokální Ramanův mikroskop Alpha300 RSA (WITec).

4.3.1 Ramanův spektrometr - SPEX

Makro měření probíhalo na Ramanově spektrometru, který je založený na spektrografu SPEX 270M od firmy Jobin-Yvon s ohniskovou vzdáleností 270 mm a průměrem kolimačního zrcadla 50 mm a byl sestaven na Fyzikálním ústavu UK (Oddělení fyziky biomolekul). Jako excitační zdroj byl použit Nd:YAG laser o vlnové délce 532 nm, konkrétně 2. harmonická frekvence. Spektrometr využívá pravoúhlé geometrie, kdy dopadající excitační paprsek prochází leštěným dnem

kyvety a rozptýlené záření je následně sbíráno pod úhlem 90° . Rozptýlené záření dále prochází hranovým (Edge) filtrem kvůli odfiltrování Rayleighova rozptylu, je objektivem zfokusováno a vstupuje do spektrografu, kde dochází k jeho difrakci na zvolené mřížce s označením g1, jež má 1200 vrypů/mm. Snímání difraktovaného záření zajišťuje tekutým dusíkem chlazený CCD detektor s 1340×100 pixely.

4.3.2 Příprava vzorků a měření pomocí Ramanova spektrometru

Jako první byla na Ramanově spektrometru měřena spektra vybraných rozpouštědel pro měření zkoumaných kontaminantů, konkrétně deionizované vody (H_2O), těžké vody (D_2O), chloroformu (CHCl_3), acetonu (CH_3COCH_3), cyklohexanu (C_6H_{12}), dimethylsulfoxidu (DMSO), tetrachlormethanu (CCl_4), benzenu (C_6H_6), ethanolu ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) a methanolu (CH_3OH). Při měření byly použity křemenné 10mm Quartz kyvety o objemu 1 ml. Výkon laseru, expoziční doby a počet akumulací byly měněny vždy tak, aby byla ideálně využita dostupná intenzitní škála detektoru (aby byl co nejlépe potlačen šum). Měření byla prováděna v rozmezí přibližně 53 až 2325 cm^{-1} .

Další byla měřena spektra roztoků melaminu v H_2O a DMSO (podrobnosti viz *Tabulka 4.1*). Při přípravě vzorků se kontaminanty v roztocích zcela nerozpustily, a proto byly vzorky odstředěny a pro měření byl odebrán pouze roztok nad sedimentem, při měření tak byl použit nasycený roztok. Měření byla prováděna v rozmezí přibližně 59 až 2319 cm^{-1} . Při měření byly použity křemenné 10mm Quartz kyvety o objemu 1 ml.

Tabulka 4.1: Zvolené parametry při měření roztoků melaminu na Ramanově spektrometru v nízkofrekvenční oblasti

Měřený roztok	Koncentrace roztoku (mg/ml)	Expoziční doba (s)	Počet akumulací	Výkon laseru (mW)
M2659 + H_2O	$\leq 2,5$	6	300	1000
M2659 + H_2O	$\leq 2,5$	6	600	1000
M2659 + H_2O	$\leq 2,5$	6	5400	1000
M2659 + DMSO	≤ 20	1	1800	700

\leq značí, že je údaj o koncentraci orientační z důvodu nerozpuštění veškerého kontaminantu v roztoku

Nakonec byla měřena spektra roztoků melaminu v H_2O , D_2O a DMSO a thiramu v CHCl_3 , CCl_4 a C_6H_6 (podrobnosti viz *Tabulka 4.2*). Měření byla prováděna vždy dvakrát, a to v nízkofrekvenční oblasti v rozmezí přibližně 75 až 2342 cm^{-1} a ve vysokofrekvenční oblasti v rozmezí přibližně 2079 až 3870 cm^{-1} . Při měření byly použity křemenné 10mm Quartz kyvety o objemu 1 ml nebo křemenné 1mm Quartz kyvety o objemu 100 μl . Ke každému měření roztoku bylo naměřeno i spektrum rozpouštědla za identických podmínek.

Tabulka 4.2: Zvolené parametry při měření roztoků melaminu a thiramu na Ramanově spektrometru v nízkofrekvenční a vysokofrekvenční oblasti

Měřený roztok	Koncentrace roztoku (mg/ml)	Expoziční doba (s)	Počet akumulací	Výkon laseru (mW)
M2659 + H ₂ O	2,25	3	600	1000
M2659 + D ₂ O	2,30	3	600	1000
M2659 + DMSO	20,15	3	600	1000
Thir 98 + CHCl ₃	100	3	300	50
Thir 98 + CCl ₄	≤100	15	40	1000
Thir 98 + C ₆ H ₆	100	1,5	600	300
Thir ≤ 100 + CHCl ₃	100	1	300	300
Thir 96,5 + CHCl ₃	100	1	300	300

≤ značí, že je údaj o koncentraci orientační z důvodu nerozpuštění veškerého kontaminantu v roztoku

4.3.3 Konfokální Ramanův mikroskop Alpha300 RSA (WITec)

Pro mikro měření byl využit konfokální Ramanův mikroskop Alpha300 RSA od firmy WITec, jenž je kombinovaný s mikroskopií atomárních sil (AFM) a optickou skenovací mikroskopií v blízkém poli (SNOM). Při měření je získáváno Ramanovo spektrum z každého pixelu obrazu. Ruční polohování vzorku je doplněno o přidružený software WITec Suite FIVE (Oxford Instruments, WITec), jehož součástí Control FIVE 5.1 umožňuje pro měření vybrat konkrétní oblast obrazu. WITec Suite FIVE obsahuje také Project FIVE 5.1, v němž byla spektra po měření upravována. V konstrukci je zabudovaný UHTS (Ultra-High Throughput Spectrometer) spektrometr s ohniskovou vzdáleností 30 cm a mřížkou s 600 vrypy/mm, zkonstruovaný tak, aby poskytoval výsledky rychle a s vysokým rozlišením. Jako excitační zdroj byl při měření použit laser o vlnové délce 532 nm, jako objektiv mikroskopu byl zvolen Carl Zeiss 50×/0.55 LD. Při všech měřeních byl mikroskop v režimu zpětného osvětlení.

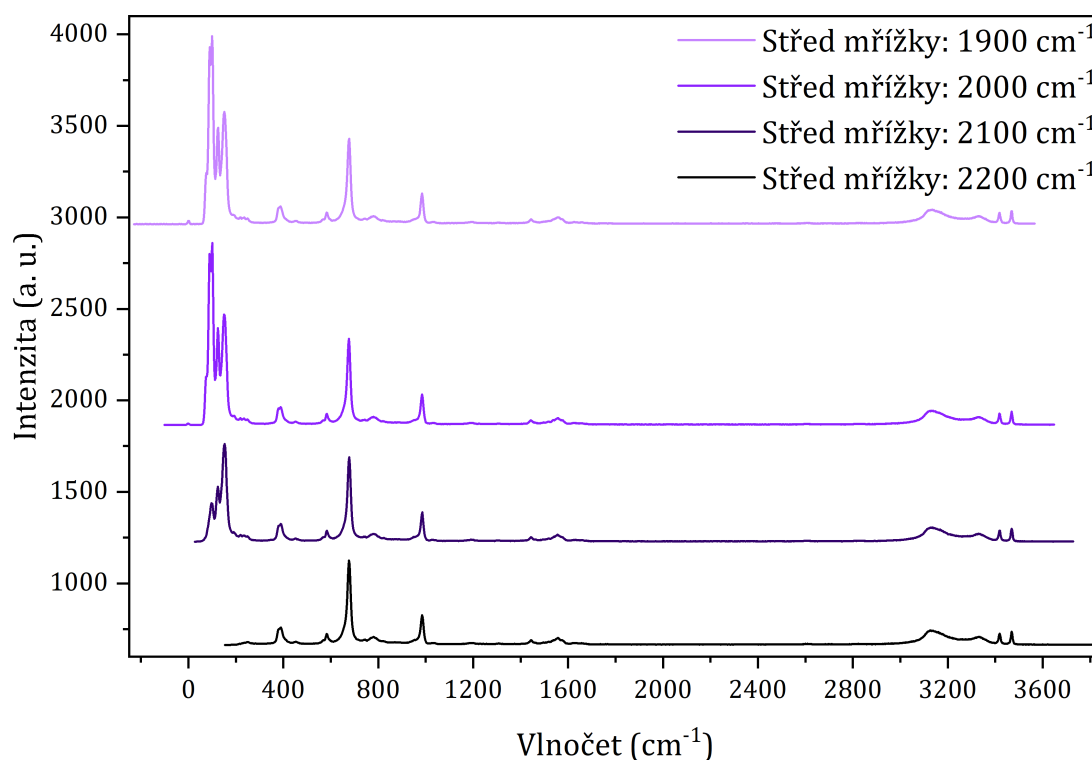
4.3.4 Příprava vzorků a měření pomocí konfokálního Ramanova mikroskopu Alpha300 RSA (WITec)

Jako první byly na Ramanově mikroskopu měřeny polykrystalické vzorky melaminu a thiramu (podrobnosti viz *Tabulka 4.3*). Tenká vrstva prášku byla rozprostřena na podložní sklíčko a za pomoci softwaru byla označena oblast, která má být změřena. Na začátku měření však bylo třeba nastavit spektrální rozsah měřené oblasti. Kvalita naměřené oblasti závisí na umístění mřížky. Pokud střed mřížky odpovídá příliš vysokým frekvencím, ztrácí se informace o nízkofrekvenčních vibracích, neboť jsou deformovány kvůli pozici kraje mřížky. Pro nalezení optimální pozice mřížky bylo vyzkoušeno několik nastavení se vzorkem polykrystalického melaminu (viz *Obrázek 4.1*). V případě 2200 cm⁻¹ nebyla nízkofrekvenční oblast měřena celá a byla deformována filtrem, v případě 2100 již byla měřena celá, ale vibrační pásy byly stále deformovány filtrem, v případě 2000

a 1900 už nedocházelo k deformaci nízkofrekvenčních vibračních pásů, a pro další měření tak byla zvolena poloha 1950, a rozsah měřené oblasti tedy byl přibližně -160 až 3610 cm^{-1} .

Tabulka 4.3: Zvolené parametry při měření polykrystalických vzorků melaminu a thiramu na Ramanově mikroskopu

	Měřený kontaminant	Rozměry skenované oblasti	Rozlišení → Počet skenů/plocha	Výkon laseru (mW)
Melamin	M2659	16x14 μm	48x42 → 9 skenů/ μm^2	16,4
Thiram	Thir 98/Thir ≤ 100	12x15 μm	48x60 → 16 skenů/ μm^2	5,0

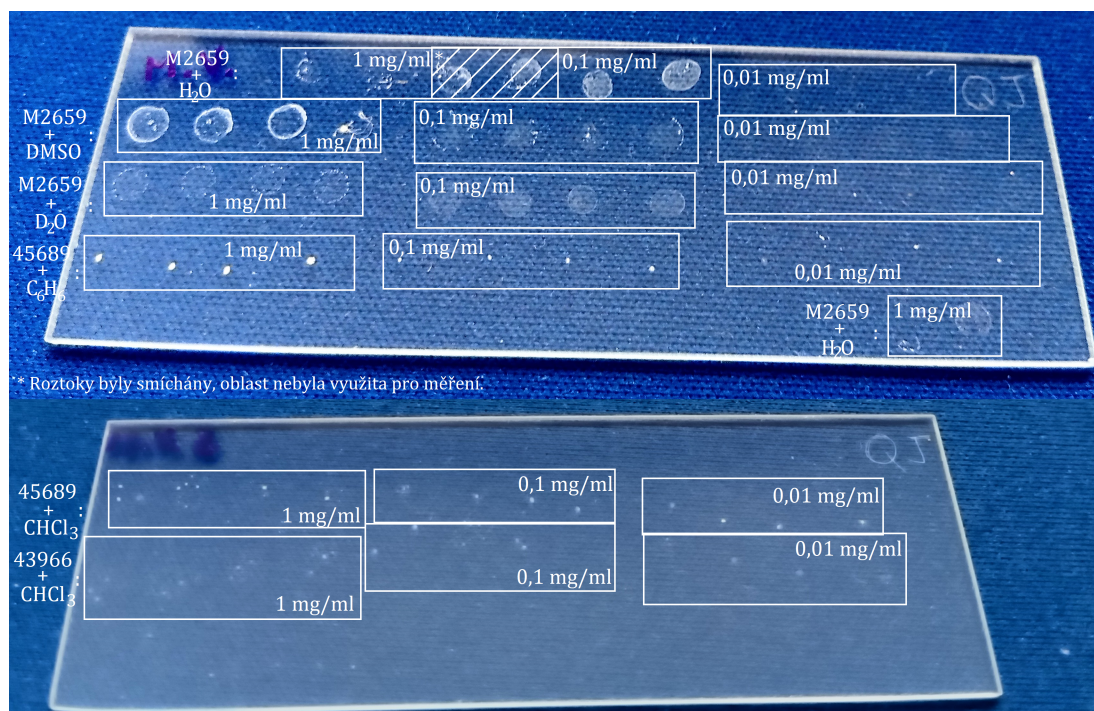


Obrázek 4.1: Naměřená spektra polykrystalického melaminu při různých pozicích mřížky

Dále byl Ramanův mikroskop využit pro DCDR měření (podrobnosti viz *Tabulka 4.4*). Pro toto měření byly připraveny roztoky melaminu v H_2O , D_2O a DMSO a thiramu v C_6H_6 a CHCl_3 v počáteční koncentraci 1 mg/ml a v objemu 2 μl čtyřikrát naneseny na sklíčko, dále 10x zředěny a opět naneseny a poté ještě jednou 10x zředěny a naneseny na sklíčko (viz *Obrázek 4.2*). Sklíčko následně bylo zakryto a měření pak probíhalo za týden nebo čtrnáct dní, kdy již byla všechna rozpouštědla odpařena. K měření ale nakonec nebyly použity všechny kapky. Při měření pak byla ve vyschlých kapkách hledána vhodná místa na získání spektra, zejména byla snaha se vyhnout oblastem, kde se zformovaly malé krystalky. Měření probíhalo v rozmezí přibližně 220 až 3855 cm^{-1} s výkonem laseru nastaveným na 10 mW.

Tabulka 4.4: Zvolené parametry při DCDR měření melaminu a thiramu na Ramanově mikroskopu

Měřený roztok	Koncentrace roztoku (mg/ml)	Rozměry skenované oblasti	Rozlišení → Počet skenů/plocha
M2659 + DMSO	1	50x50 μm	50x50 → 1 sken/ μm^2
M2659 + DMSO - 1/2	0,1	50x50 μm	25x25 → 0,25 skenu/ μm^2
M2659 + DMSO - 1/2	0,01	50x50 μm	25x25 → 0,25 skenu/ μm^2
M2659 + H ₂ O - 1	0,1	50x50 μm	25x25 → 0,25 skenu/ μm^2
M2659 + H ₂ O - 2	0,1	50x20 μm	25x20 → 0,5 skenu/ μm^2
M2659 + H ₂ O - 1	0,01	50x50 μm	25x25 → 0,25 skenu/ μm^2
M2659 + H ₂ O - 2	0,01	30x30 μm	25x25 → 0,69 skenu/ μm^2
M2659 + D ₂ O	1	50x50 μm	25x25 → 0,25 skenu/ μm^2
Thir 98 + C ₆ H ₆	1	20x25 μm	20x25 → 1 sken/ μm^2
Thir 98 + C ₆ H ₆	0,1	20x25 μm	20x25 → 1 sken/ μm^2
Thir 98 + C ₆ H ₆	0,01	25x25 μm	25x25 → 1 sken/ μm^2
Thir ≤ 100 + CHCl ₃	1	25x25 μm	25x25 → 1 sken/ μm^2
Thir ≤ 100 + CHCl ₃	0,1	25x25 μm	25x25 → 1 sken/ μm^2
Thir ≤ 100 + CHCl ₃	0,01	25x25 μm	25x25 → 1 sken/ μm^2



Obrázek 4.2: Vzorky připravené pro DCDR měření

4.4 Zpracování dat

Spektra naměřená na Ramanově spektrometru byla zkalibrována pomocí neonové výbojky a programu Neokalspex2, který byl vytvořen doc. Jiřím Bokem z

Fyzikálního ústavu UK v roce 2007. Při kalibraci byla zvolena vlnová délka excitačního záření 532,163 nm, mřížka 1200 gr/mm, lineární interpolace a vzorkovací interval 1 cm^{-1} .

Zkalibrovaná spektra naměřená na Ramanově spektrometru byla dále upravována v softwaru GRAMS/AI verze 9.2 (Thermo Fisher Scientific Inc.). V něm se od naměřeného spektra odečetlo spektrum rozpouštědla, byla provedena korekce pozadí funkcí „baseline correction“ a spektrum bylo normalizováno¹.

Spektra měřená na konfokálním Ramanově mikroskopu Alpha300 RS byla zpracovávána v přidruženém softwaru z balíčku WITec Suite FIVE (Oxford Instruments, WITec), konkrétně v programech Control FIVE 5.1 a Project FIVE 5.1. Kalibrace spekter byla v tomto případě prováděna automaticky, z naměřených spekter však byly pomocí funkce „Cosmic Ray Removal“ odstraněny signály způsobené kosmickým zářením. Na spektra byla případně použita funkce „True Component Analysis“, která statisticky rozloží naměřená spektra na zvolený počet komponent, a „Average spectra“, jež vytváří průměrné spektrum z vymezené podoblasti skenované oblasti.

Grafy zpracovávající výsledky měření byly vytvořeny v programu OriginPro 2020b verze 9.7.5.184 (OriginLab Corporation).

4.5 Simulace vibračních spekter

Všechny kvantově mechanické simulace byly prováděny za použití softwaru Gaussian 09 (Frisch a kol., 2013), k práci s výsledky byl pak použit program GaussView verze 6.0.16 (Dennington a kol., 2016). Pro všechny výpočty byl nastaven tlak 1 atm. a teplota 298,15 K. Volba výpočetní metody, báze a modelu rozpouštědla je vždy uvedena u konkrétního případu v *Kapitole 5*. Konečný tvar simulovaných spekter byl získán konvolucí vypočítané intenzity vibrací s Lorentzovou funkcí o pološířce 10 cm^{-1} .

Grafy zpracovávající výsledky simulací byly vytvořeny v programu OriginPro 2020b verze 9.7.5.184 (OriginLab Corporation).

¹Konkrétní podrobnosti o normalizaci (o jaký pás se jednalo nebo zda bylo normováno na maximum pásu či na integrální intenzitu) jsou uvedeny u jednotlivých měření.

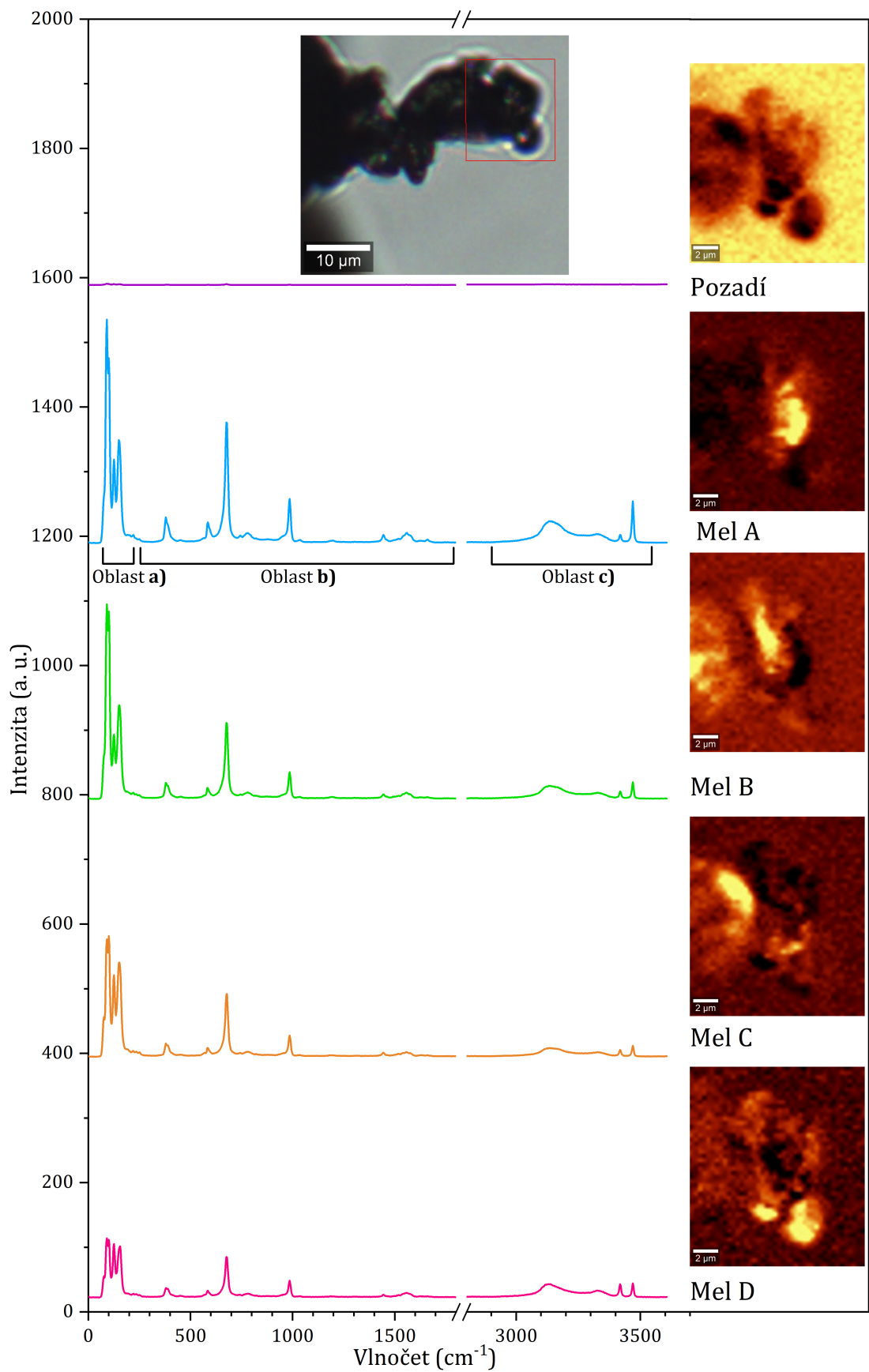
5. Výsledky

5.1 Měření práškových vzorků

Oba kontaminanty byly měřeny v podobě bílého prášku, který byl rozprostřen na podložní sklíčko. V obou případech byla na spektra ze skenované oblasti využita funkce „True Component Analysis“ z programu Project FIVE 5.1, která statisticky (faktorovou analýzou) rozloží naměřená spektra na zvolený počet komponent. Počet komponent byl volen tak, aby na residuálním obrazu nebyly příliš výrazné oblasti a zároveň byla spektra odpovídající jednotlivým komponentám ještě zřetelně odlišná. Tento postup nakonec vedl k pěti komponentám pro oba kontaminanty, z čehož jedna vždy odpovídá pozadí. Výsledné spektrum pro jednotlivou komponentu bylo vždy získáno pomocí funkce „Average spectra“, která faktorovou analýzou vybranou podskupinu spekter zprůměrovala. V obou případech je pozadí v porovnání s ostatními komponentami nízké. Ostatní komponenty představují vibrační spektra melaminu, resp. thiramu. Jejich odlišnost je možné vysvětlit jako krystalový polymorfismus, popř. jsou zatíženy fluorescencí či experimentálními artefakty. Různé krystalové struktury se projevují různou intenzitou některých vibračních pásů, případně i přímo výskytem odlišných vibračních pásů.

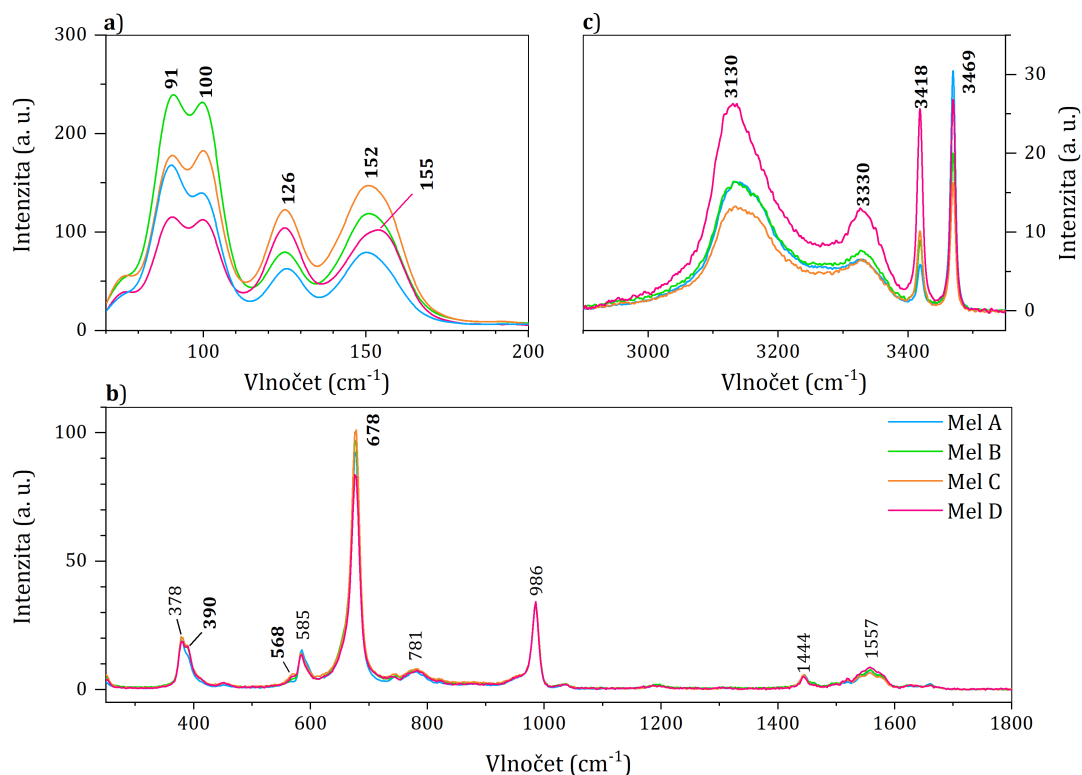
5.1.1 Melamin v polykrystalické fázi

K pěti získaným komponentám je možné přiřadit obrázky skenované oblasti, na kterých je v nepravých barvách (úměrných intenzitě výskytu dané komponenty) vyznačeno, kterým místům na vzorku dané spektrum odpovídá (viz *Obrázek 5.1*). Získaná spektra byla pro další zpracování rozdělena na oblasti **a**), **b**), **c**), které v tomto pořadí přibližně odpovídají vibračním krystalové struktury, oblasti „otisku prstu“ a N-H valenčním vibračním.



Obrázek 5.1: Vibrační spektrum melaminu v práškové formě

Za účelem detailnějšího porovnání rozdílů mezi jednotlivými komponentami na *Obrázku 5.1* byla provedena korekce jejich pozadí a poté byla spektra normována na shodnou integrální intenzitu pásu na pozici 986 cm^{-1} (viz *Obrázek 5.2*).



Obrázek 5.2: Vibrační spektrum melaminu v práškové formě - po korekci pozadí a normování na integrální intenzitu pásu na pozici 986 cm^{-1} ; tučně značená pozice pásu znamená, že se jeho intenzita mezi různými komponentami liší a tato změna byla dále kvantifikována

U takto upravených spekter již bylo možné kvantitativně porovnat změny intenzit odpovídajících maximům vybraných pásů a to konkrétně porovnáním s intenzitou odpovídající maximu pásu na pozici 986 cm^{-1} (dále jako Intenzita_{986}) (viz *Tabulka 5.1*).

Tabulka 5.1: Intenzity maxim pásů pro jednotlivé komponenty polykrystalického melaminu

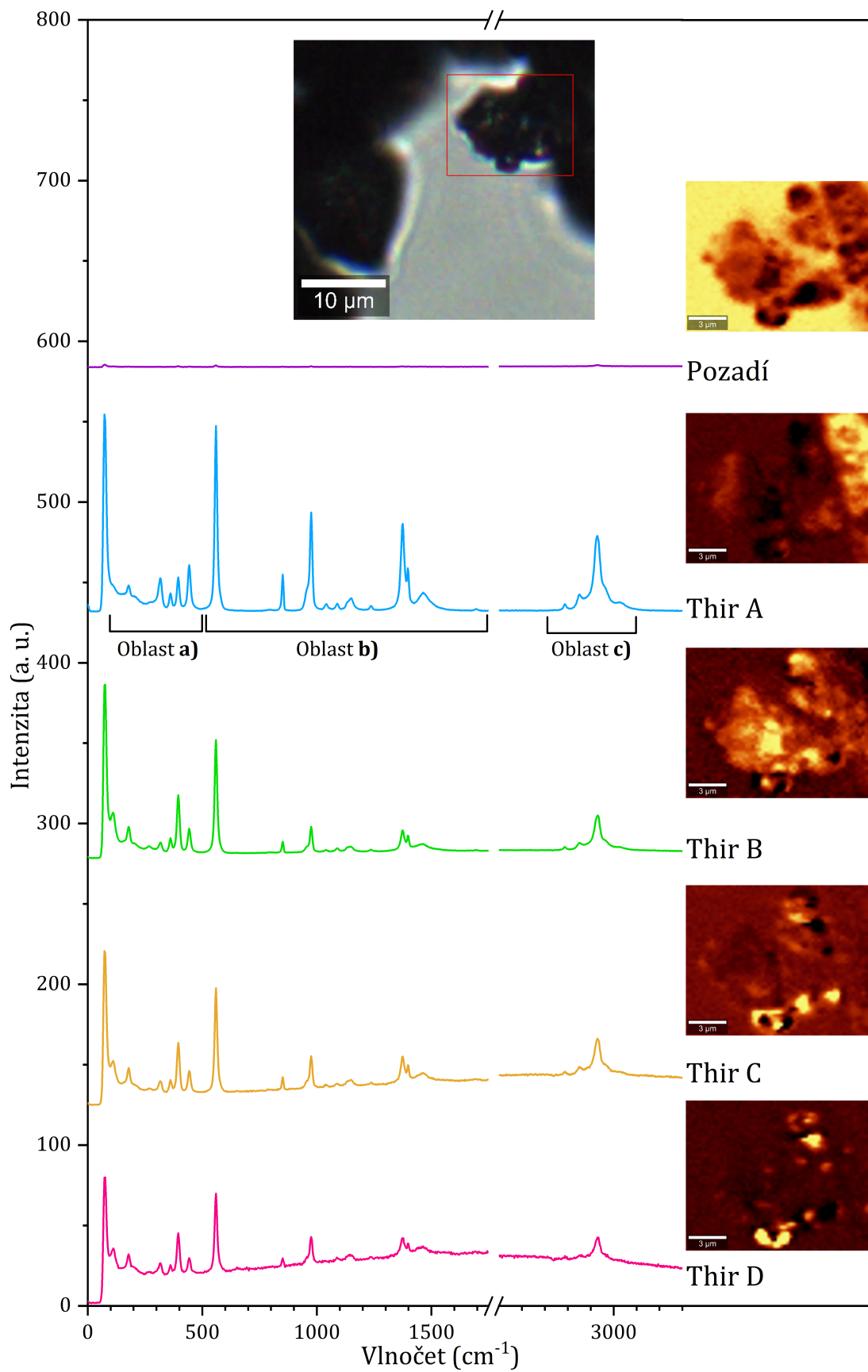
vlnoččet (cm ⁻¹)	Intenzita Intenzita ₉₈₆			
	Mel A	Mel B	Mel C	Mel D
91	5,19	7,33	5,42	3,49
100	4,30	7,07	5,58	3,40
126	1,95	2,42	3,75	3,71
152 (155*)	2,36	3,53	4,36	3,03
390	0,40	0,49	0,51	0,49
568	0,09	0,12	0,18	0,15
678	2,74	2,84	2,98	2,42
986	1,00	1,00	1,00	1,00
3130	0,48	0,49	0,39	0,77
3330	0,20	0,22	0,19	0,37
3418	0,18	0,27	0,31	0,78
3469	0,95	0,62	0,51	0,82

*Pro Mel D.

Oblast **a)** obsahuje vždy čtyři pásy na pozicích 91, 100, 126 a 152 ⁻¹, resp. 155 ⁻¹ v případě komponenty **Mel D**, jejichž poměry intenzit se výrazně mění. Nejpravděpodobnější vysvětlení těchto odlišností je krystalový polymorfismus, tj. odlišné uspořádání melaminových molekul v rámci elementární krystalové struktury. V oblasti **b)** se jednotlivé komponenty téměř dokonale překrývají - výjimkou jsou pouze drobné odlišnosti v intenzitě pásů na 390, 568 a 678 cm⁻¹. Čtyři výrazné pásy v oblasti **c)** na vlnočtech 3130, 3330, 3418 a 3469 cm⁻¹ jsou důsledkem přítomnosti primárních a sekundárních aminových skupin v molekule melaminu a odpovídají N-H valenčním vibracím. Podle interpretace navržené v (Meier a kol., 1995) a (Liu a kol., 2010) odpovídají první dva široké pásy N-H skupinám, které interagují se svým okolím, zatímco dva ostré pásy na 3418 a 3469 cm⁻¹ odpovídají volným N-H skupinám.

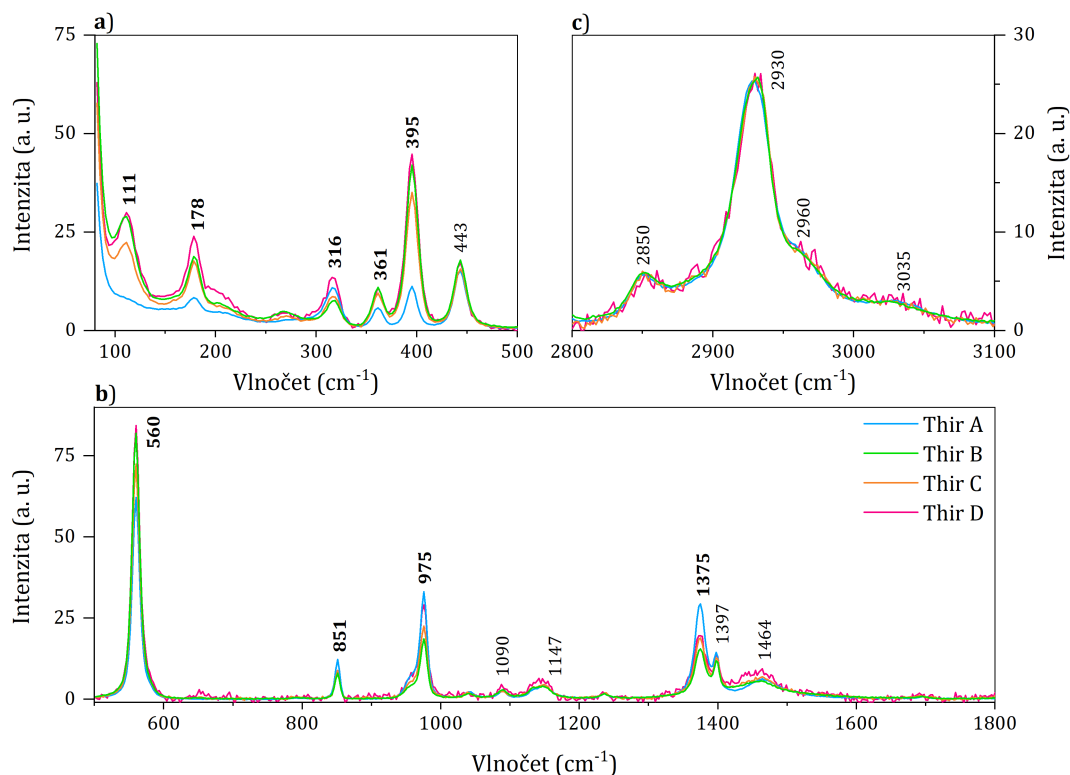
5.1.2 Thiram v polykrystalické fázi

K pěti získaným komponentám je možné přiřadit obrázky skenované oblasti, na kterých je v nepravých barvách vyznačeno, kterým místům na vzorku dané spektrum odpovídá (viz *Obrázek 5.3*). U komponent **Thir C** a **Thir D** je možné pozorovat profil typický pro fluorescenci. Získaná spektra byla pro další zpracování rozdělena na oblasti **a)**, **b)**, **c)**, které v tomto pořadí přibližně odpovídají vibracím krystalové struktury, oblasti „otisku prstu“ a C-H valenčním vibracím.



Obrázek 5.3: Vibrační spektrum thiramu v práškové formě

Za účelem detailnějšího porovnání rozdílů mezi jednotlivými komponentami byla provedena korekce pozadí a poté byla spektra normována na integrální intenzitu v oblasti valenčních C-H vibrací (oblast kolem pásu na pozici 2930 cm^{-1}).



Obrázek 5.4: Vibrační spektrum thiramů v práškové formě - po korekci pozadí a normování na integrální intenzitu v oblasti valenčních C-H vibrací (oblast kolem pásu na pozici 2930 cm^{-1}); tučně značená pozice pásu znamená, že se jeho intenzita mezi různými komponentami liší a tato změna byla dále kvantifikována

U takto upravených spekter již bylo možné kvantitativně porovnat změny intenzit odpovídajících maximům vybraných pásů a to konkrétně porovnáním s intenzitou odpovídající maximu pásu na pozici 2930 cm^{-1} (dále jako Intenzita_{2930}) (viz *Tabulka 5.2*).

Tabulka 5.2: Intenzity maxim pásů pro jednotlivé komponenty polykrystalického thiramu

vlnočet (cm^{-1})	Intenzita Intenzita ₂₉₃₀			
	Thir A	Thir B	Thir C	Thir D
111	0,32	1,14	0,87	1,15
178	0,33	0,74	0,68	0,92
316	0,43	0,29	0,33	0,52
361	0,23	0,43	0,37	0,42
395	0,44	1,65	1,36	1,71
560	2,45	3,22	2,81	3,23
851	0,48	0,32	0,34	0,34
975	1,31	0,73	0,87	1,11
1375	1,16	0,61	0,73	0,75
2930	1,00	1,00	1,00	1,00

Oblast **a**) se nejvíce liší u komponenty **Thir A**. Výrazné je oproti ostatním komponentám téměř vymizení pásu na pozici 111 cm^{-1} . Stejně tak je výrazně odlišná komponenta **Thir A** i v případě oblasti **b**), kde je možné oproti ostatním komponentám pozorovat vyšší intenzitu u pásů odpovídajících 851 , 975 a především 1375 cm^{-1} . Oblast **c**) má (po provedené korekci pozadí) v případě všech komponent shodný tvar. Celkově však lze říci, že spektrální změny mezi jednotlivými komponentami jsou spíše menšího charakteru a omezují se téměř výhradně na změny relativní intenzity několika pásů.

5.2 Měření kapalných vzorků

Z předvybraných a změřených rozpouštědel byla nakonec pro měření roztoků kontaminantů vybrána taková, v nichž bylo možné dosáhnout měřitelné koncentrace kontaminantu a zároveň byly vibrační pásy tohoto rozpouštědla na vhodných pozicích (tj. aby bylo možné kombinací měření získat celé spektrum kontaminantu).

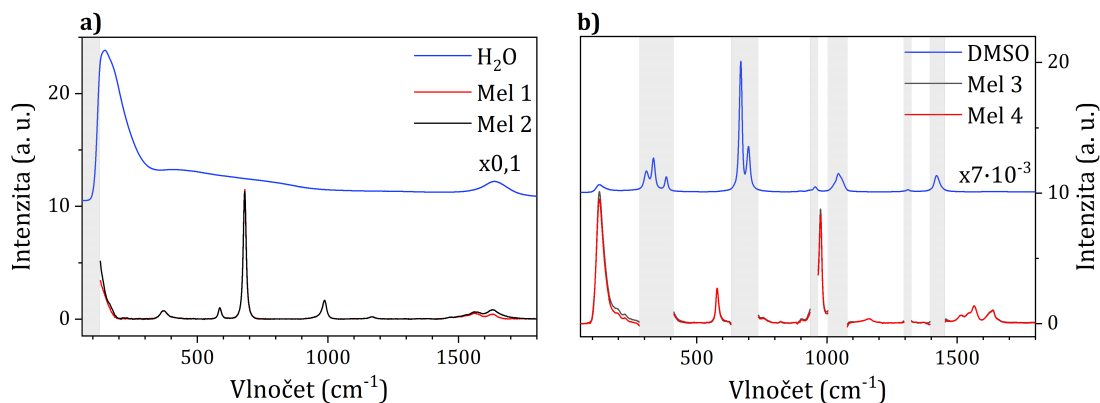
5.2.1 Roztoky s melaminem

Roztok melaminu ve vodě byl dohromady měřen čtyřikrát a to při koncentracích $\leq 2,5$ nebo $2,25 \text{ mg/ml}$ za účelem získání co nejkvalitnějšího Ramanova spektra. Ze tří měření při koncentraci $\leq 2,5 \text{ mg/ml}$ bylo nutné vyřadit hodinové měření (viz *Tabulka 4.1*), protože v porovnání s ostatními měřeními bylo toto spektrum zatíženo příliš vysokým šumem. Spektra z půlhodinového (dále jako Mel 1) a devítihodinového (dále jako Mel 2) měření se po provedené korekci pozadí téměř úplně překrývají (viz *Obrázek 5.5*). Jako nepatrně lepší z nich však bylo pro další zpracování vybráno spektrum z půlhodinového měření.

Roztok melaminu v DMSO byl měřen dvakrát - při koncentracích ≤ 20 a $20,15 \text{ mg/ml}$. U spektra z měření při koncentraci $\leq 20 \text{ mg/ml}$ byly vyzkoušeny dva způsoby korekce pozadí (dále jako Mel 3 a Mel 4), výsledná spektra jsou však téměř totožná (viz *Obrázek 5.5*) a dokládají míru reprodukovatelnosti provedeného zpracování naměřených spekter, kdy bylo nejprve odečteno spektrum rozpouštědla a

poté ještě od výsledku odečteno pozadí s využitím kubických spline křivek.

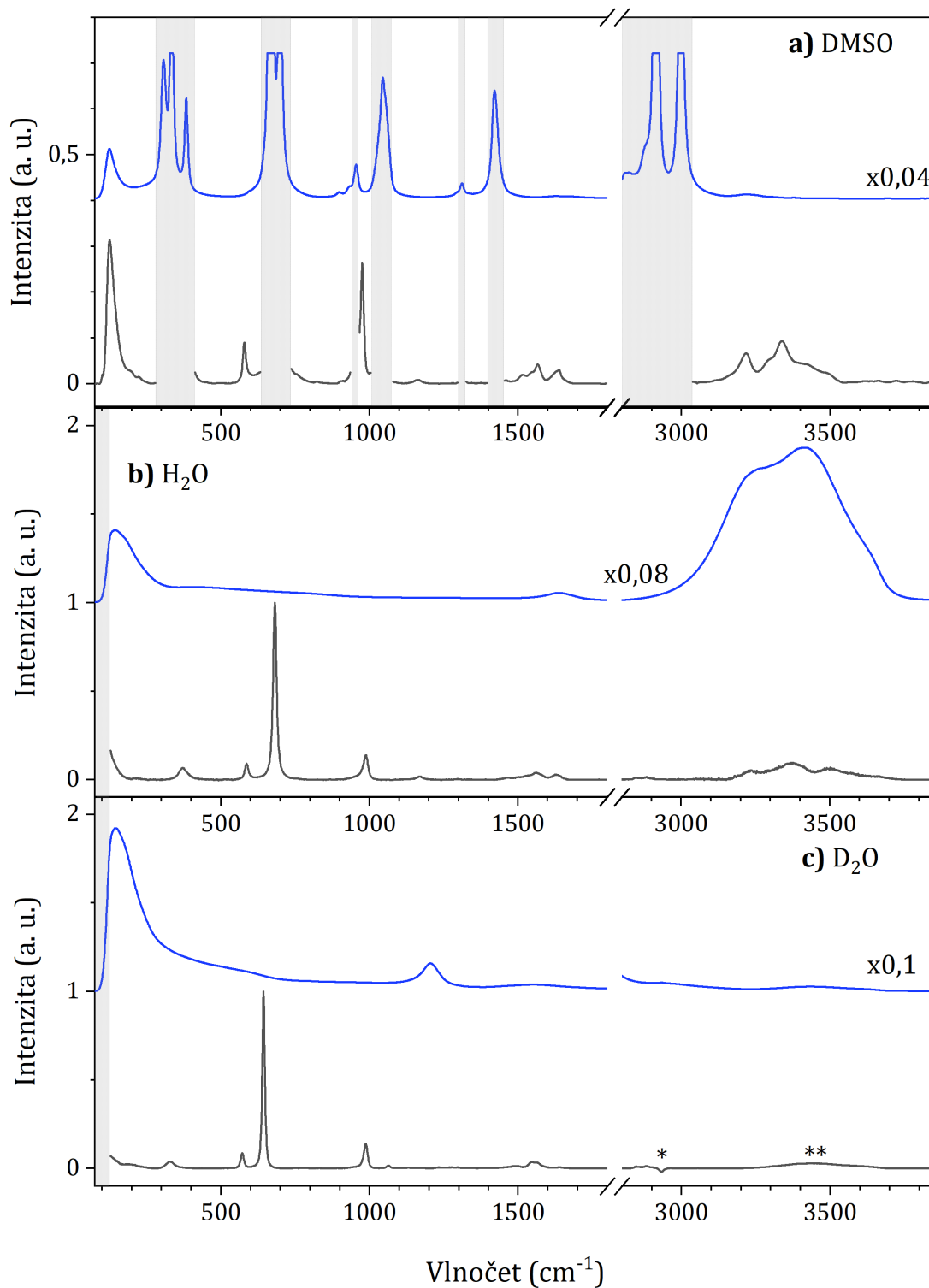
Výsledky z měření ve vodě poskytují větší část Ramanova spektra melaminu než výsledky z měření v DMSO a v dobré kvalitě. Z roztoku v DMSO je však možné získat informace o oblasti do přibližně 130 cm^{-1} , která byla v případě vody vymaskována. Roztoky obou rozpouštědel tedy poskytují komplementární informaci.



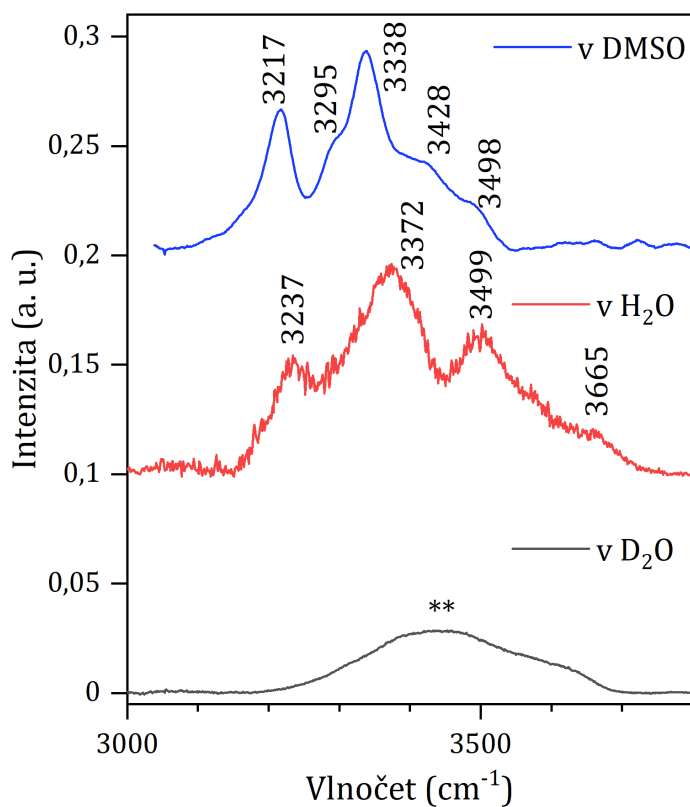
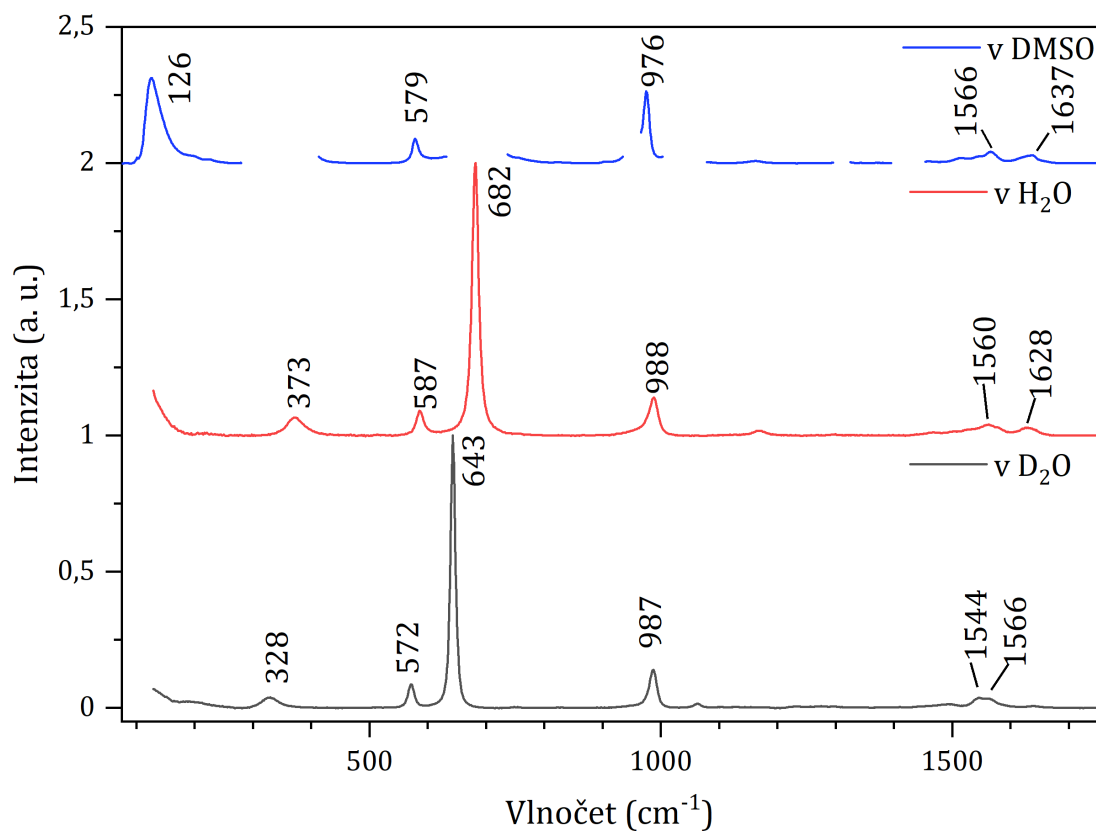
Obrázek 5.5: Ramanova spektra melaminu **a)** při koncentraci $\leq 2,5\text{ mg/ml}$ v H_2O (dvě různá měření), **b)** při koncentraci $\leq 20\text{ mg/ml}$ v DMSO (dvě různé korekce pozadí); modře Ramanovo spektrum rozpouštědla; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku

Následující měření ve vodě při koncentraci $2,25\text{ mg/ml}$ a v DMSO při koncentraci $20,15$ byla provedena za účelem získání Ramanova spektra melaminu v celé oblasti fundamentálních molekulových vibrací, tj. přibližně až do 3870 cm^{-1} , taktéž bylo v tomto rozsahu získáno Ramanovo spektrum melaminu v těžké vodě a to při koncentraci $2,30\text{ mg/ml}$ (viz *Obrázek 5.6*).

Pro lepší srovnání byla tato spektra normována na maximum pásu nacházejícího se přibližně na 682 cm^{-1} , resp. na 643 cm^{-1} v případě těžké vody. Byly identifikovány nejvýraznější vibrační pásy, které jsou v *Obrázku 5.7* označeny příslušným vlnočtem.

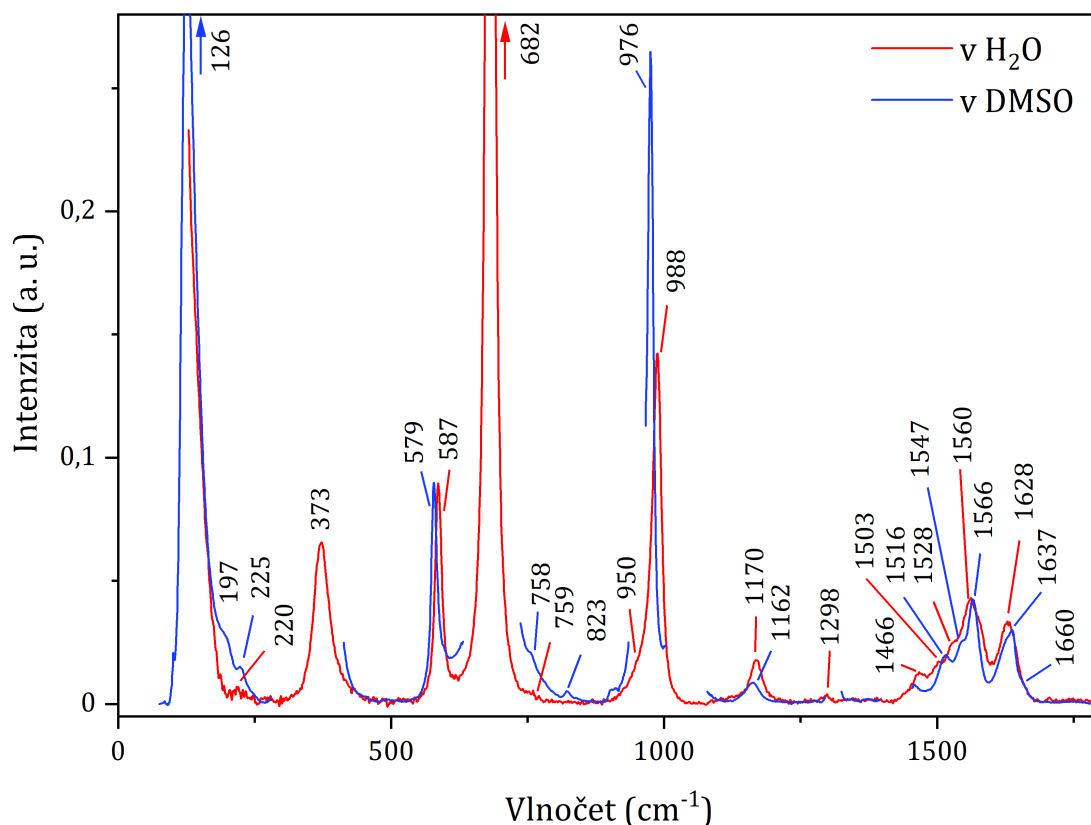


Obrázek 5.6: Ramanova spektra melaminu **a)** při koncentraci 20,15 mg/ml v DMSO, **b)** při koncentraci 2,25 mg/ml v H₂O, **c)** při koncentraci 2,30 mg/ml v D₂O; modře Ramanovo spektrum rozpouštědla; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku; *reziduální signál rozpouštědla; **nečistoty H₂O v D₂O



Obrázek 5.7: Ramanova spektra melaminu: při koncentraci 20,15 mg/ml v DMSO, při koncentraci 2,25 mg/ml v H₂O, při koncentraci 2,30 mg/ml v D₂O; ** signál od nečistot H₂O v D₂O

Z těchto nejvýraznějších vibračních pásů je ve vodě možné identifikovat dva odpovídající 373 a 682 cm^{-1} , které nebyly naměřeny v DMSO kvůli překryvu s jeho vibračním spektrem. Spektrum melaminu v DMSO naopak poskytuje vibrační pás na 126 cm^{-1} , což odpovídá vymaskované oblasti ze spektra ve vodě. U pásů na 579 a 976 cm^{-1} ze spektra v DMSO je možné oproti vodě pozorovat posun do nižších vlnočtů a to o 8 a 12 cm^{-1} , naopak pásy na pozicích 1566 a 1637 cm^{-1} se v porovnání s vodou posunuly do vyšších vlnočtů a to konkrétně o 6 a 9 cm^{-1} . Oblast nad 3000 cm^{-1} byla kvalitněji naměřena v DMSO, měření ve vodě poskytuje více „zašuměné“ spektrum, ve kterém se podařilo rozlišit čtyři vibrační pásy, zatímco z měření v DMSO bylo získáno pásů pět. Tvar spektra v této oblasti se navíc v obou rozpouštědlech liší, a není tak zcela jasné, jaké pásy si odpovídají. Při detailnějším rozboru oblasti do 1800 cm^{-1} , pro který bylo zprůměrováno Ramanovo spektrum z měření ve vodě při koncentraci $20,25\text{ mg/ml}$ a spektrum z půlhodinového měření při koncentraci $\leq 2,5\text{ mg/ml}$, bylo dohromady rozeznáno 13 vibračních pásů melaminu v DMSO a 14 vibračních pásů melaminu ve vodě (viz *Obrázek 5.8*). Přiřazení těchto pásů jednotlivým vibračním pohybům molekuly melaminu je možné nalézt v *Sekci 5.5.6*.



Obrázek 5.8: Detail Ramanových spekter melaminu: při koncentraci $20,15\text{ mg/ml}$ v DMSO, průměrné spektrum z výsledků získaných při koncentraci $20,25\text{ mg/ml}$ a z půlhodinového měření při koncentraci $\leq 2,5\text{ mg/ml}$ v H_2O

Jednotlivé rysy obou spekter na *Obrázku 5.8* lze rozdělit podle dvou hledisek – a) doplnění spektrální informace z oblastí, které jsou v daném rozpouštědle nedostupné, b) srovnání polohy a intenzity vibračních pásů v oblastech, které se

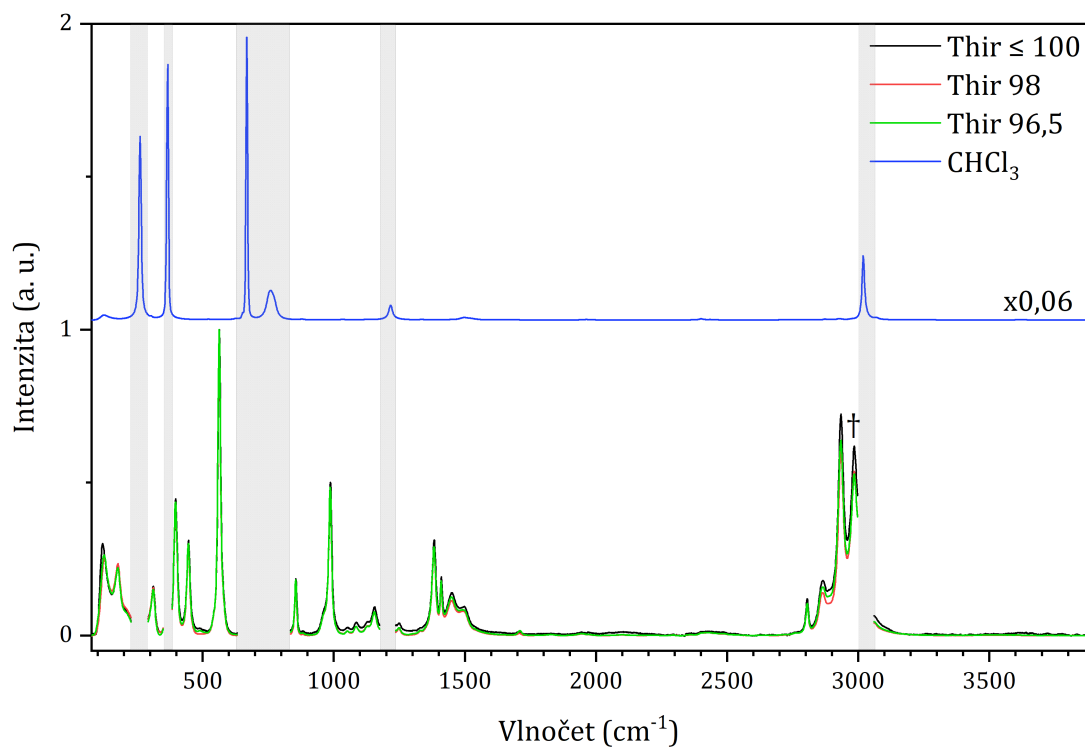
podářilo získat v obou solventech. V prvním případě měření ve vodě poskytuje pás na 1298 cm^{-1} , který nebyl získán z měření v DMSO kvůli překrytí s jeho vibračním spektrem, podobně je možné pozorovat shoulder na 950 cm^{-1} a pás na pozici 1466 cm^{-1} . Díky měření v DMSO naopak bylo možné označit shouldery na pozicích 197 a 1660 cm^{-1} , které nejsou ve spektru při měření s vodou vidět hlavně kvůli vysokému šumu, a pás na 823 cm^{-1} . V druhém případě je možné pozorovat posuny mezi odpovídajícími si pásy z měření v DMSO a ve vodě, které jsou ale menší než 20 cm^{-1} . Původ těchto posunů lze připsat různému charakteru obou použitých rozpouštědel. Zatímco voda je protické polární rozpouštědlo, které je zároveň donorem i akceptorem vodíkových vazeb, DMSO je aprotické polární rozpouštědlo, a tedy může figurovat pouze jako akceptor vodíkových vazeb. Zajímavé je porovnání měření ve vodě a v těžké vodě (D_2O) na *Obrázku 5.7*. Při rozpouštění melaminu v těžké vodě dojde na primárních a sekundárních aminových skupinách k protium–deuteriové výměně. Protože je deuterium přibližně dvakrát těžší než protium, poklesne pak frekvence (vlnčet) vibračních módů, které mají velký příspěvek N-H (N-D) a N-H₂ (N-D₂) pohybů. Nejvýraznější posun - o 39 cm^{-1} - je možné pozorovat u dýchací vibrace melaminu nacházející se ve vodě původně na 682 cm^{-1} a po deuteraci na 643 cm^{-1} . Této vibrace se účastní všechny tři přítomné ND₂ skupiny.

Vibrační pásy na 3237 , 3372 , 3499 a 3655 cm^{-1} , které jsou vidět ve vodě, se po deuterizaci posunuly až do oblasti mezi 2250 a 2580 cm^{-1} , kde má však těžká voda silný signál, který byl navíc při měření přesycen, a informace o nich tedy byla ztracena. V oblasti nad 3000 cm^{-1} je však stále možné pozorovat signál. Jeho původ je způsoben buď nečistotou samotné použité D_2O (tj. reziduální signál HOD a H₂O), popř. nedokonale rozpuštěným melaminem. V takovém případě by nebyly měřeny individuální molekuly, ale solvatované klastry, u nichž by protium–deuteriová výměna proběhla pouze na povrchu, ale ne uvnitř.

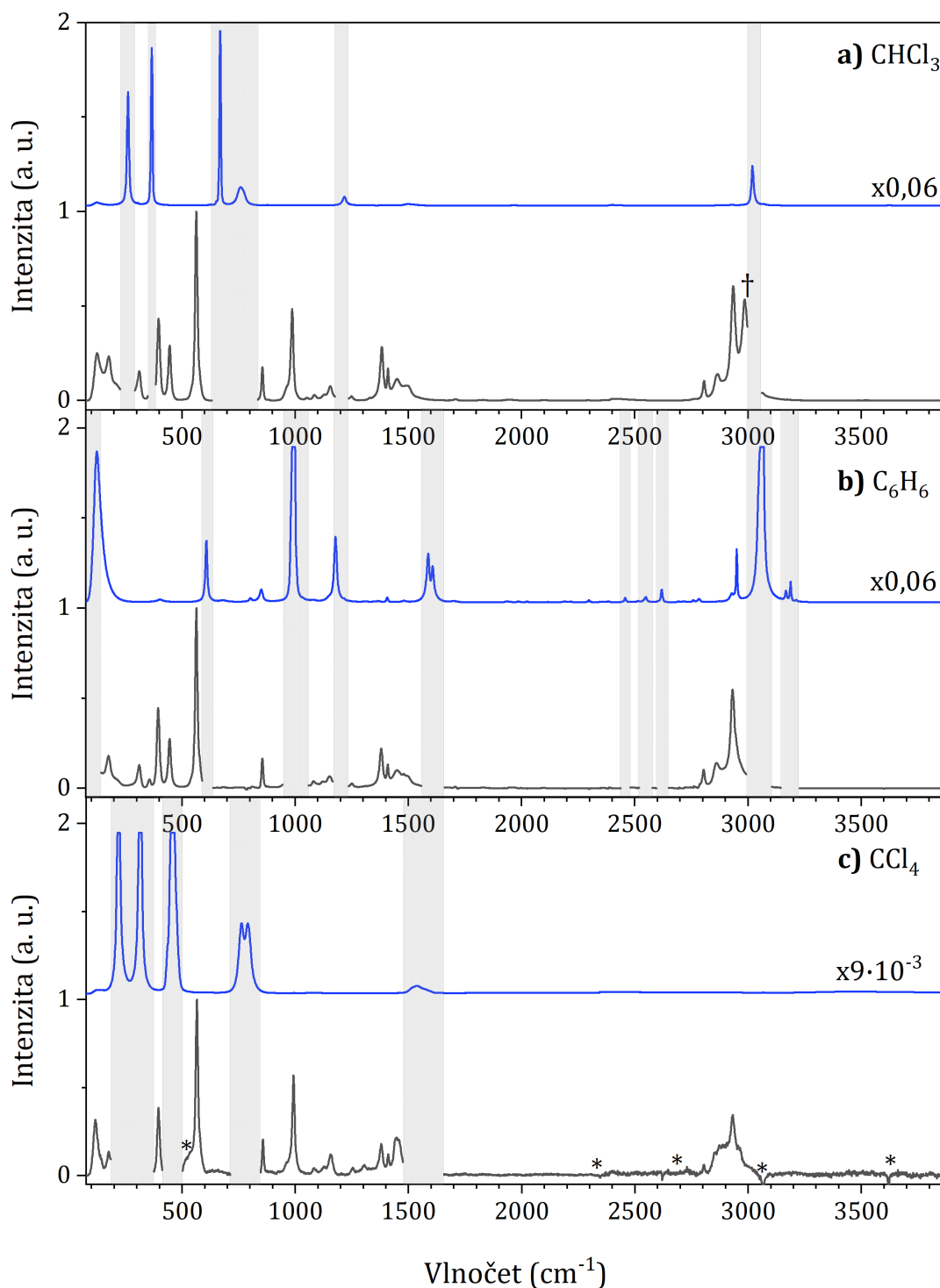
5.2.2 Roztoky s thiramem

Měření thiramu probíhalo ve třech různých rozpouštědlech - benzenu (C_6H_6), chloroformu (CHCl_3) a tetrachlormethanu (CCl_4). V chloroformu bylo navíc provedeno měření s třemi různými vzorky thiramu za účelem porovnání případných rozdílů mezi nimi. Chloroform byl jako nejvhodnější rozpouštědlo pro toto pozorování zvolen díky dobré rozpustnosti kontaminantu i svému Ramanovu spektru, jehož signál byl v odečteném spektru problematický pouze v šesti oblastech intenzivních úzkých ostrých pásů, které byly posléze vymaskovány. Spektra získaná pro různé vzorky thiramu se po odečtu signálu rozpouštědla, korekci pozadí a normování na intenzitu maxima pásu na pozici 563 cm^{-1} ukázala jako téměř totožná (viz *Obrázek 5.9*). Případné rozdíly je možné vysvětlit nepatrně odlišnou koncentrací¹ a lehce odlišným odečtem signálu rozpouštědla a odlišnou korekcí pozadí. Žádný ze vzorků neobsahoval nečistoty ani příměsi, které by nějak ovlivňovaly měřený signál. Pro další experimenty pak byl vybrán vzorek thiramu s produktovým číslem 45689 (Thir 98) (viz *Obrázek 5.10*).

¹Všechny tři roztoky byly připraveny s koncentrací 100 mg/ml , ale jejich reálná koncentrace nebyla shodná.



Obrázek 5.9: Ramanova spektra tří vzorků thiramu při koncentraci 100 mg/ml v CHCl_3 ; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku; †posun valenční C-H vibrace CHCl_3 způsobený navázáním na molekulu thiramu

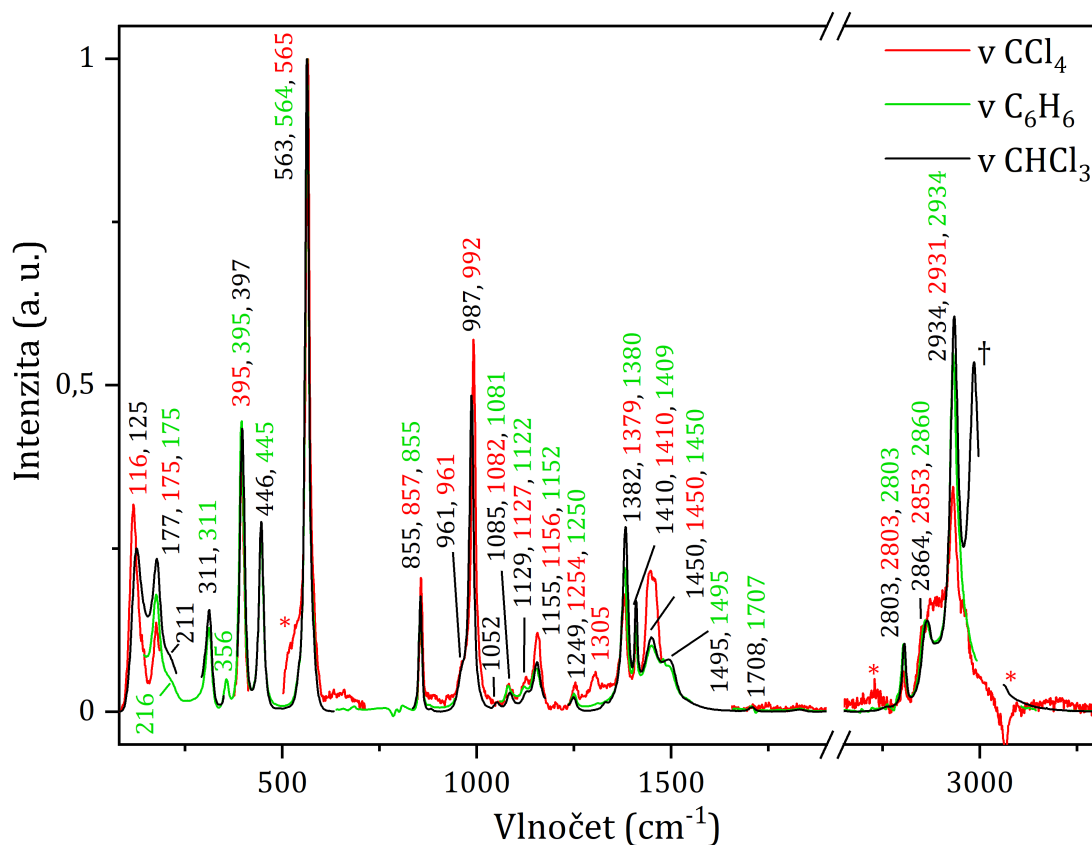


Obrázek 5.10: Ramanova spektra thiramu **a)** při koncentraci 100 mg/ml v CHCl_3 , **b)** při koncentraci 100 mg/ml v C_6H_6 , **c)** při koncentraci ≤ 100 mg/ml v CCl_4 ; modře Ramanovo spektrum rozpouštědla; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku; *reziduální signál rozpouštědla; †posun valenční C-H vibrace CHCl_3 způsobený navázáním na molekulu thiramu

Přestože oblastí, které bylo nutné vymaskovat, nebylo ve spektru z měření v CHCl_3 příliš, kvůli dvěma výrazným vibračním pásům CHCl_3 v něm chybí široká oblast mezi 633 a 834 cm^{-1} . Tuto část Ramanova spektra thiramu však bylo možné získat z měření v C_6H_6 , jehož Ramanovo spektrum ovšem obsahovalo více výraznějších vibračních pásů, jež bylo nutné vymaskovat (některé byly při měření úmyslně přesyceny, tj. měly vyšší intenzitu, než bylo možné při daném nastavení detekovat), kvůli čemuž byla ztracena informace o oblasti převážně kolem 1000 , 1600 cm^{-1} a 3050 cm^{-1} a v oblasti valenčních vodíkových vibrací.

Pro doplnění chybějící informace o tvaru experimentálního spektra v oblasti okolo 1200 cm^{-1} , kterou nebylo možno získat ani v chloroformu ani v benzenu, byl vzorek proměřen ještě v tetrachlormetanu. V tomto rozpouštědle se však vzorek o poznání hůře rozpouštěl. Koncentrace thiramu v CCl_4 nedosáhla stejné hodnoty jako v CHCl_3 a C_6H_6 a signál thiramu byl při měření velmi slabý (na úrovni cca 1% signálu rozpouštědla); získané spektrum thiramu má tak poměrně špatný poměr signálu k šumu a vykazuje několik artefaktů po odečtu signálu rozpouštědla. I tak je však možné považovat výsledek z měření v CCl_4 za vydařený.

Detailnějším srovnáním získaných spekter (viz *Obrázek 5.11*) se podařilo získat Ramanovo spektrum thiramu v rozsahu přibližně 75 až 3870 cm^{-1} , z čehož spektra získaná z měření v CHCl_3 a C_6H_6 poskytují kvalitní a téměř kompletní informaci o oblasti fundamentálních vibrací. Přiřazení těchto pásů jednotlivým vibračním pohybům molekuly thiramu je možné nalézt v *Sekci 5.6.2*.



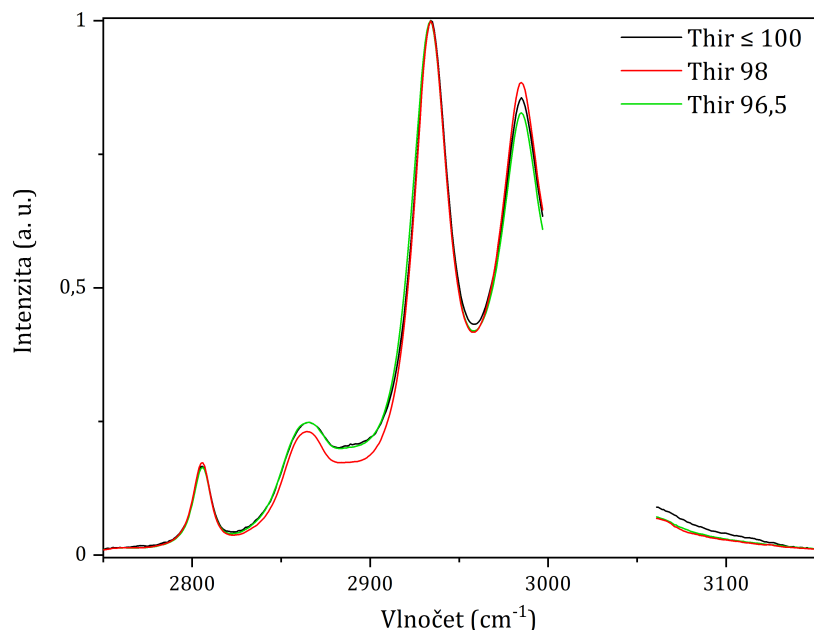
Obrázek 5.11: Ramanova spektra thiramu: při koncentraci 100 mg/ml v CHCl_3 , při koncentraci 100 mg/ml v C_6H_6 , při koncentraci ≤ 100 mg/ml v CCl_4 ; *rezi-duální signál rozpouštědla; †posun valenční C-H vibrace CHCl_3 způsobený navá-záním na molekulu thiramu

Ze srovnání spekter na *Obrázku 5.11* je zřejmé, že thiram není výrazně ovlivněn interakcí s rozpouštědlem. Posuny ve vlnočtech se pohybují nejčastěji v řádech jednotek cm^{-1} , nebo k nim vůbec nedochází.

Celkově se těmito měřeními podařilo získat kvalitní Ramanova spektra thiramu a to především z měření v CHCl_3 nebo C_6H_6 . Získání spektra z roztoku v CCl_4 bylo obtížnější, ale vydařené a vyplnilo chybějící informace z měření v obou předešlých rozpouštědlech. Přestože se jedná o měření v organických rozpouštědlech, kdy je měření Ramanova spektra obtížné, jde o výsledky kvalitní a reprodukovatelné.

Ve všech spektrech z měření v CHCl_3 bylo možné pozorovat pás na pozici 2985 cm^{-1} , jenž však nebyl přítomný při měření v C_6H_6 ani CCl_4 , což naznačuje, že se nejedná o pás odpovídající vibraci thiramu. Tento pás jsme identifikovali jako pás C-H valenční vibrace CHCl_3 na 3019 cm^{-1} posunutý k nižším vlnočtům v důsledku navázání na atom síry v molekule thiramu prostřednictvím slabé vodíkové vazby. Pro detailnější analýzu byla spektra normována na intenzitu maxima vedlejšího pásu (na 2934 cm^{-1}), který byl přiřazen thiramu (viz *Obrázek 5.12*). Spolu s touto normalizací se srovnal pro všechny tři vzorky pás thiramu na 2803 cm^{-1} , u pásu na pozici 2864 cm^{-1} došlo k překrytí pouze pro vzorky s produktovými čísly 43966 a 45689, to je však pravděpodobně možné vysvětlit mírně rozdílnou korekcí pozadí. Naopak u zkoumaného pásu na pozici 2985 cm^{-1} je

možné pozorovat pro každý ze vzorků různou maximální intenzitu, což by mohlo být vysvětleno, třebaže nepříliš, rozdílnou koncentrací thiramu v jednotlivých roztocích CHCl_3 , a tedy rozdílným počtem molekul thiramu, u kterých dojde k navázání na molekulu CHCl_3 , které by pak bylo možné pozorovat právě u pásu na 2985 cm^{-1} .



Obrázek 5.12: Detail Ramanova spektra tří vzorků thiramu při koncentraci 100 mg/ml v CHCl_3 v oblasti $2750\text{--}3150 \text{ cm}^{-1}$, normováno na intenzitu maxima pásu na 2934 cm^{-1}

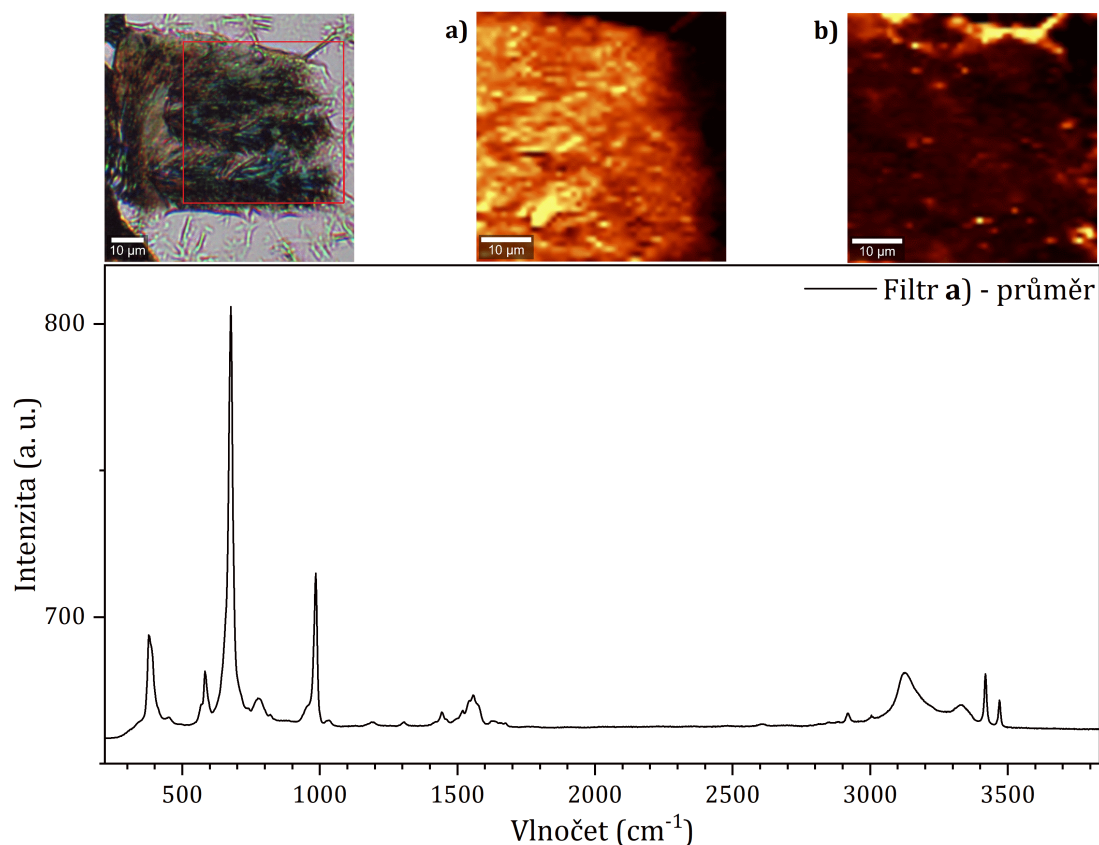
5.3 Měření DCDR spekter

Měření DCDR spekter kontaminantů probíhalo z vyschlých kapek roztoků melaminu v H_2O , D_2O a DMSO a thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 o koncentracích 1 mg/ml, 0,1 mg/ml nebo 0,01 mg/ml. Výsledná spektra byla získána jako průměr nejvíce intenzivních oblastí vybraných zvoleným filtrem, signál pozadí byl vybrán filtrem o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1} .

5.3.1 Vyschlé kapky melaminu

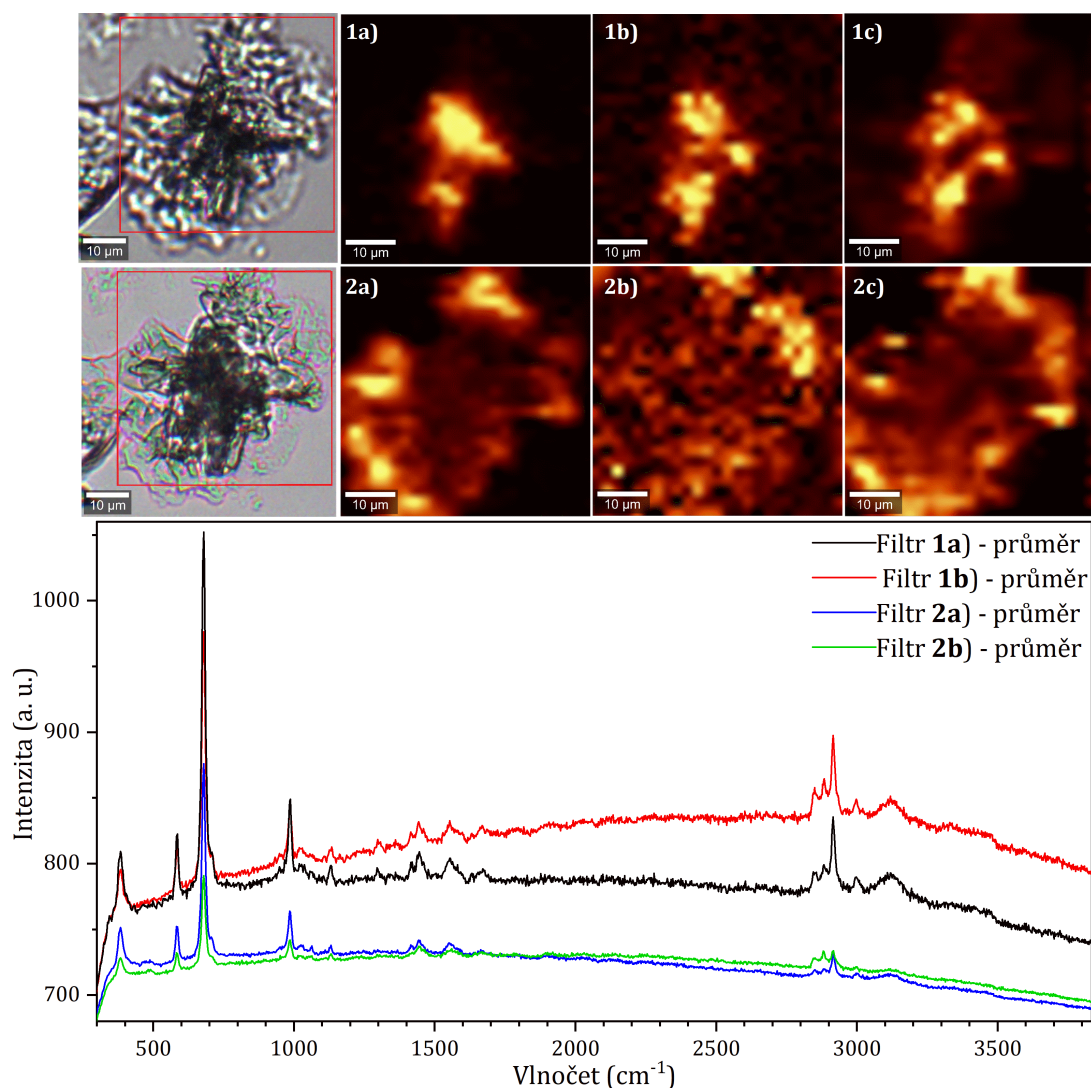
Signál melaminu byl hledán prvotně podle intenzity výrazného pásu na $\sim 676 \text{ cm}^{-1}$ odpovídajícího dýchací vibraci molekuly.

Kapky z roztoku melaminu v DMSO o koncentraci 1 mg/ml vytvořily po uschnutí typický útvar podobný kroužku po vyschnutí kávové kapky, kdy na okraji došlo k výraznějšímu nahromadění látky než uprostřed. Pro měření byly primárně vybírány oblasti, které měly amorfni charakter, tj. nebyly zde vidět výrazné krystalické struktury (viz *Obrázek 5.13*). Spektrum odpovídající melaminu (filtr a) bylo možné získat z celé měřené struktury s výjimkou úzkých výběžků, kde byla detekována zvýšená fluorescence připomínající signál pozadí, ale pásy melaminu zde chyběly.



Obrázek 5.13: Ramanovo spektrum melaminu z vyschlé kapky roztoku v DMSO o koncentraci 1 mg/ml (7,93 mM); oblast **a)** v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 90 cm^{-1} na pozici 677 cm^{-1} , oblast **b)** pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1}

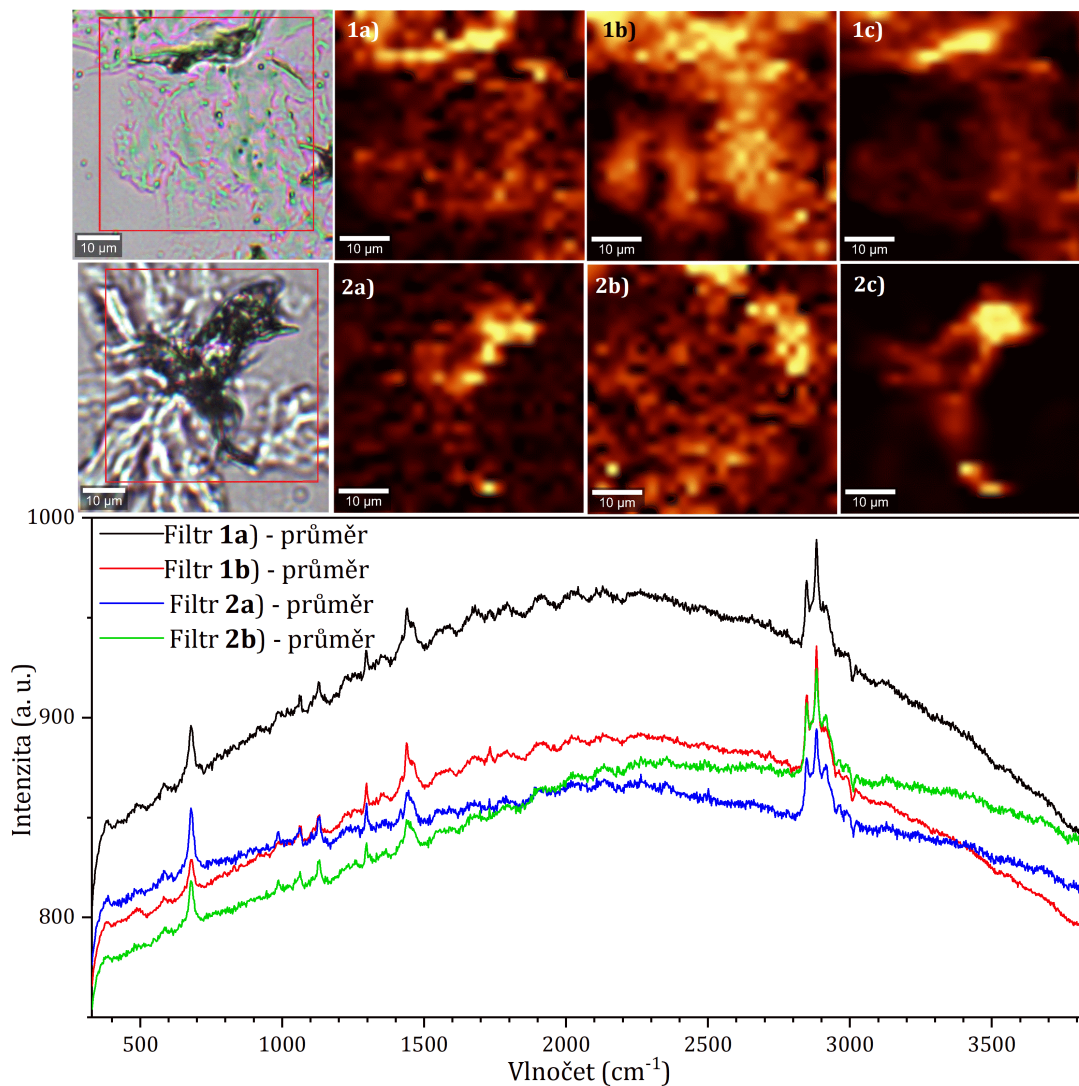
I kapky z roztoku melaminu v DMSO o koncentraci 0,1 mg/ml vytvořily po uschnutí kruhovou skvrnu, na jejímž okraji se místy nahromadilo více látky. U některých kapek bylo hromadění látky možné pozorovat i v oblastech uprostřed. Na vytvořených shlucích bylo místy možné pozorovat ostré linie připomínající krystalickou strukturu. Vybraný shluk byl měřen dvakrát a to při zaostření do rozdílné hloubky, nejdříve na vrcholek, podruhé blíže k povrchu sklička, na němž kapka zasychala (viz *Obrázek 5.14*). Signál odpovídající dýchací vibraci melaminu, v tomto případě na 679 cm^{-1} , se podařilo získat a pozorovali jsme i další pásy odpovídající molekule melaminu. Zároveň se však ve spektru objevila nová pásová struktura v oblasti C-H valenčních vibrací kolem 2900 cm^{-1} , odpovídající parazitickému signálu. Pro nové pásy byly vytvořeny filtry s označením **b)**. Ukázalo se však, že oblasti získané pomocí filtrů se výrazně překrývají, a tudíž se je tímto způsobem zpracování nepodařilo separovat. Domníváme se, že parazitický signál odpovídá nějak částečně degradovanému melaminu, nejspíše po odtržení aminové skupiny a jejího nahrazení vodíkem – nové pásy ve spektru totiž leží přímo v oblasti C-H vibrací.



Obrázek 5.14: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v DMSO o koncentraci 0,1 mg/ml (0,79 mM) (dvě měření); oblast **1a**), resp. **2a**), v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm^{-1} na pozici 687, resp. 684 cm^{-1} , oblast **1b**), resp. **2b**), zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 120, resp. 200 cm^{-1} na pozici 2884, resp. 2894 cm^{-1} , oblasti **1c**) a **2c**) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1}

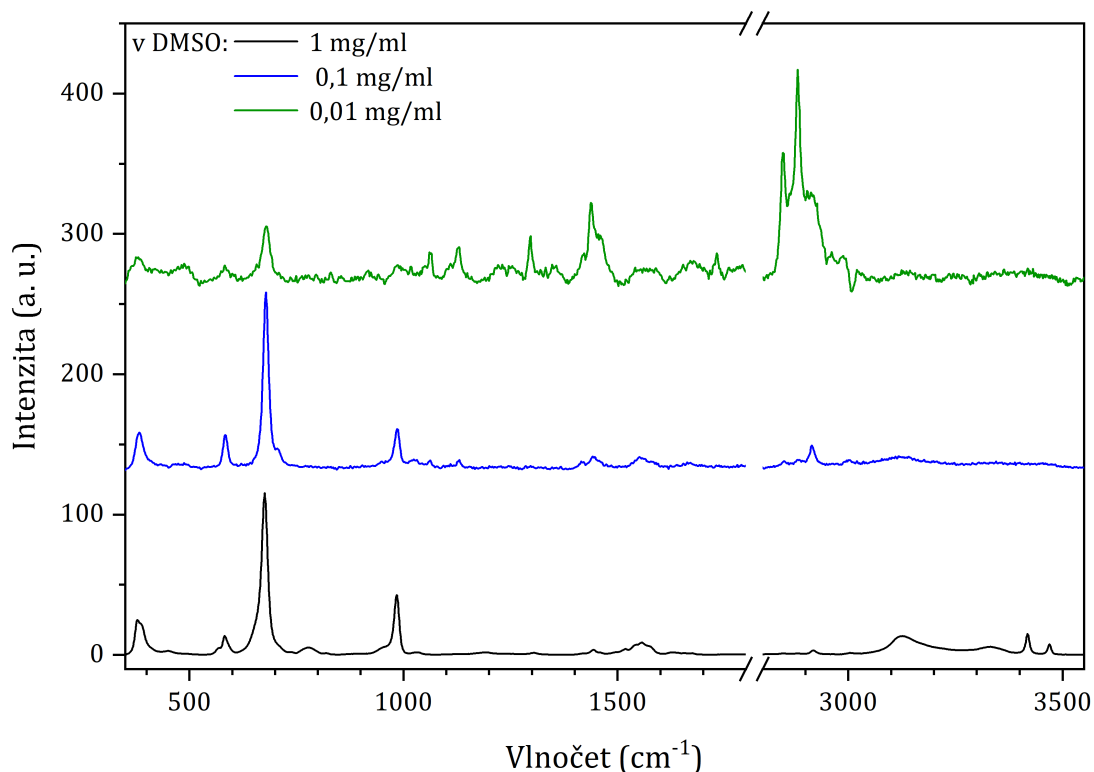
Kapky z roztoku melaminu v DMSO o koncentraci 0,01 mg/ml po uschnutí už na krajích koncentrovaný kruh nevytvořily, stejně tak se však netvořily ani krystalky. Kapka se při usychání rozpadla na malé shluky – ostrůvky – a místy zůstal na sklíčku tenoučký film. Pro měření byly vybrány dvě různé oblasti – jedna s filmem a druhá se shlukem (viz *Obrázek 5.15*). Signál odpovídající dýchací vibraci melaminu, i v tomto případě na 679 cm^{-1} , se podařilo získat, viditelně však koreluje se signálem pozadí, signál pásové struktury v oblasti kolem 2900 cm^{-1} je opět přítomný, navíc v případě prvního měření je možné vidět, že je ho kromě samotného shluku možné získat z celé oblasti pokryté filmem po vyschnutí kapky (oblast **1b**)), spektrum ze vzniklého filmu však poskytuje vysoké pozadí, které má fluorescenční charakter. Neočekávaný je výskyt zvlnění pozadí (či objevení

se pásů) v oblasti $1900\text{--}2100\text{ cm}^{-1}$, který může být další indikací degradace melaminu. Spektra získaná z obou měření jsou až na rozdílný tvar pozadí (v obou případech však vypovídající o fluorescenci) identická. Ani v tomto případě se nepodařilo signály oblastí dýchací vibrace a pásové struktury v oblasti kolem 2900 cm^{-1} separovat.



Obrázek 5.15: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v DMSO o koncentraci $0,01\text{ mg/ml}$ ($0,08\text{ mM}$) (dvě měření); oblast **1a**), resp. **2a**), v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm^{-1} na pozici 677 , resp. 684 , cm^{-1} , oblast **1b**), resp. **2b**), zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 200 cm^{-1} na pozici 2900 , resp. 2892 , cm^{-1} , oblasti **1c**) a **2c**) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1}

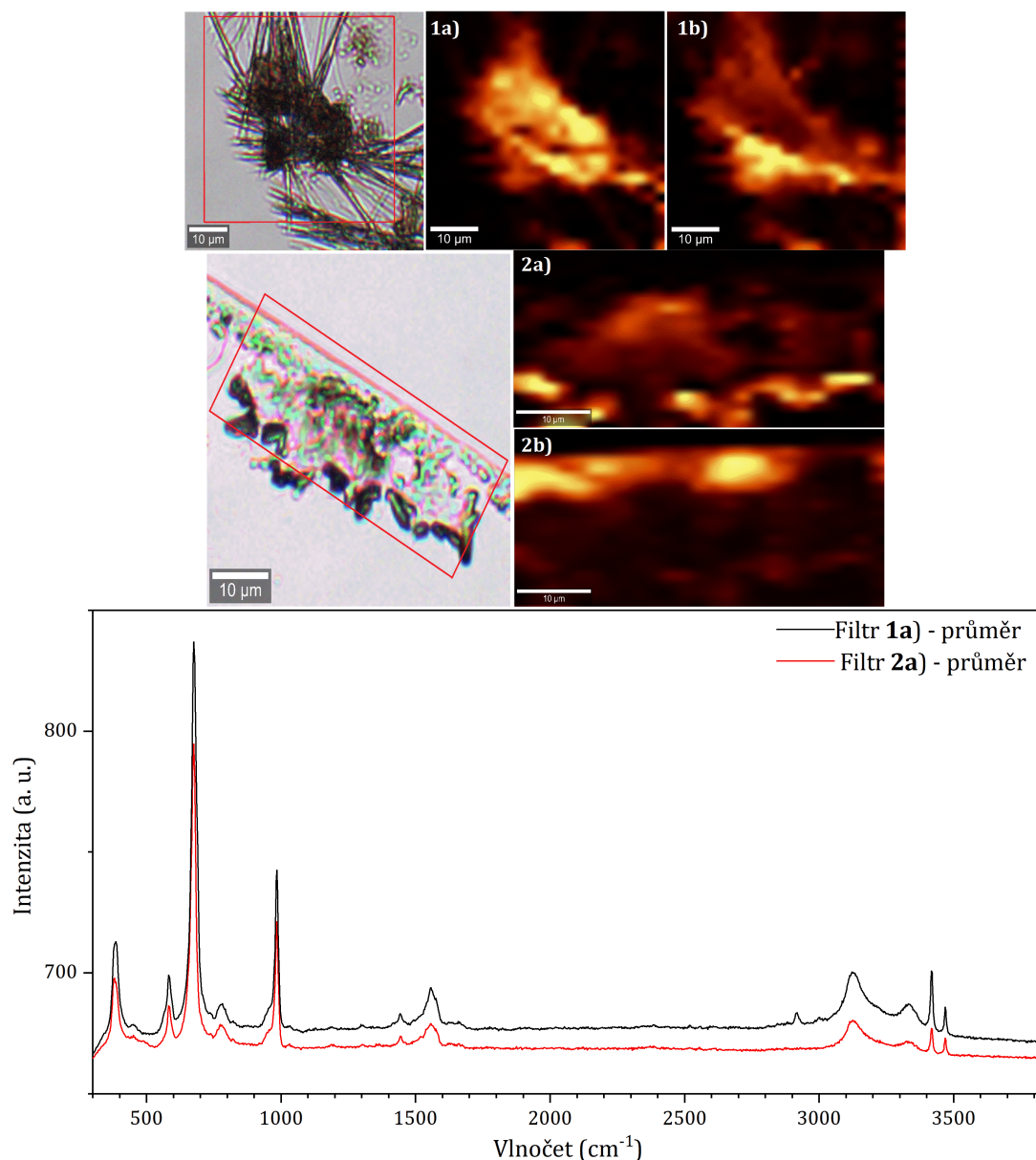
Za účelem detailnějšího porovnání rozdílů mezi spektry z měření z kapek z roztoku v DMSO při různých koncentracích byla u spekter vybraných pomocí filtru kolem pásu na 676 cm^{-1} (tedy vždy filtru **a**)) provedena korekce pozadí (viz *Obrázek 5.16*).



Obrázek 5.16: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v DMSO o koncentracích 1 mg/ml (7,93 mM), 0,1 mg/ml (0,79 mM) a 0,01 mg/ml (0,08 mM)

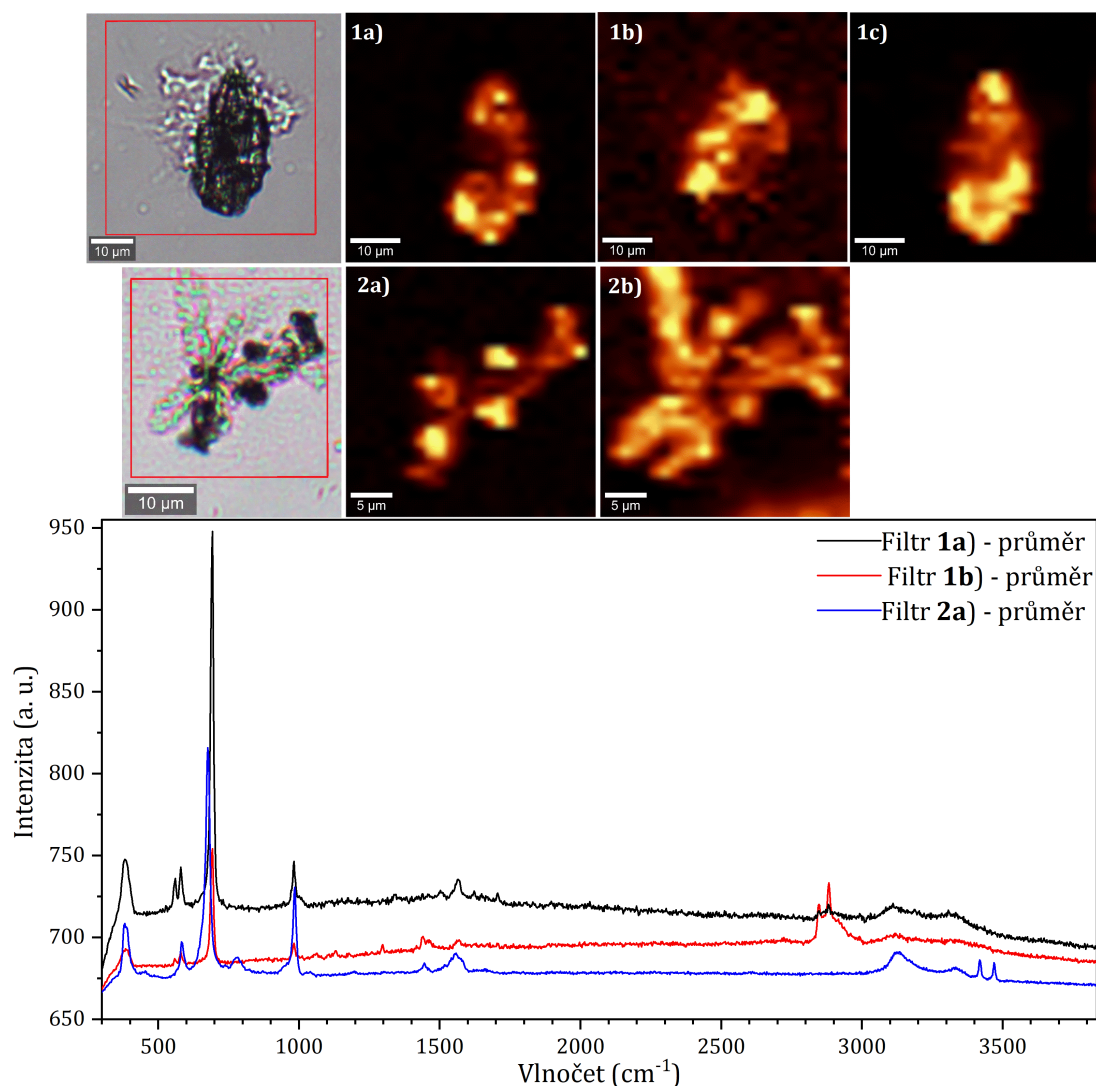
Přestože si spektra získaná při koncentracích 1 mg/ml a 0,1 mg/ml přibližně zachovávají celkový tvar, vykazují variabilitu spočívající převážně ve štěpení či vymizení vibračních pásů. Za zmínku stojí především chybějící dvojice pásů (3418 a 3469 cm^{-1}) v N-H valenční oblasti. Spektrum získané ze zaschlé kapky z 0,1 mg/ml roztoku je tak více podobné spektru melaminu v kapalně fázi (roztoku), zatímco spektrum získané z kapky pocházející z 1 mg/ml roztoku se více podobá spektru práškového vzorku. Spektrum získané při koncentraci 0,01 mg/ml je zatíženo vyšší mírou šumu a má již odlišný celkový tvar s dominantní „parazitní“ strukturou v oblasti kolem 2900 cm^{-1} , jejíž náznaky však bylo možné pozorovat v obou předchozích koncentracích. Značné odlišnosti oproti předešlým dvěma spektrům je možné identifikovat v oblasti mezi 1000 a 1600 cm^{-1} . Navíc pás odpovídající dýchací vibraci melaminu již nedominuje celému spektru. To vše dohromady naznačuje, že melamin při procesu zasychání nějakým způsobem částečně zdegradoval.

Kapky z roztoku melaminu v H_2O o koncentraci 0,1 mg/ml po uschnutí vytvořily kruhovou skvrnu, na okrajích bylo možné pozorovat nahromadění látky. Měření bylo provedeno dvakrát právě na okraji vyschlé kapky (viz *Obrázek 5.17*). S využitím filtrů se podařilo v obou případech získat dvě komponenty, odpovídající signálu melaminu s pásem dýchací vibrace na 676 cm^{-1} a pozadí.



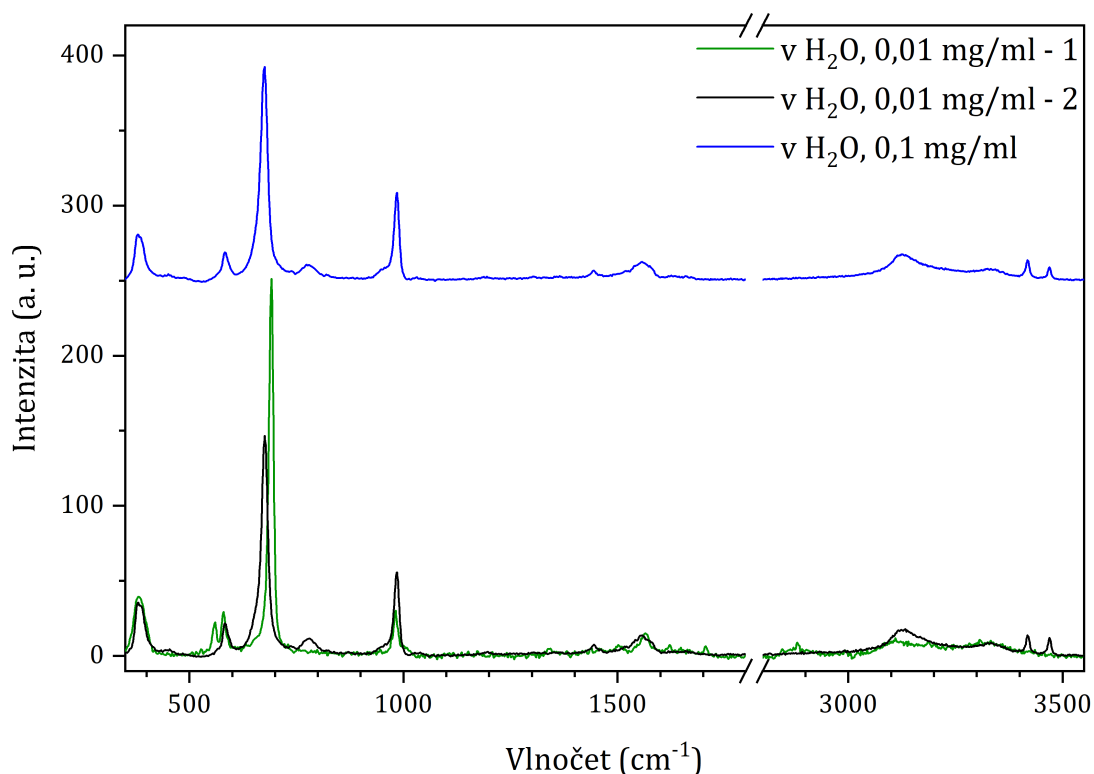
Obrázek 5.17: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H_2O o koncentraci 0,1 mg/ml (0,79 mM); oblast **1a)**, resp. **2a)**, v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm^{-1} na pozici 684, resp. 677, oblasti **1b)** a **2b)** pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1}

Kapky z roztoku melaminu v H_2O o koncentraci 0,01 mg/ml po uschnutí vytvořily tenký film kruhového tvaru, ve kterém bylo možné najít několik osamocенých shluků látky. Dva tyto shluky byly vybrány k měření (viz *Obrázek 5.18*). V obou případech se podařilo získat spektrum melaminu, v prvním případě byl však nalezen i parazitický signál v oblasti kolem 2900 cm^{-1} , který se podařilo separovat, neboť byl nejsilnější na jiných místech měřené hrudky. V případě druhého měření je tenký film obklopující hrudku silným zdrojem signálu fluorescenčního pozadí. Velmi zajímavý je rozdíl mezi spektry hlavní komponenty z obou měřených míst, který je více diskutován na *Obrázku 5.19*.



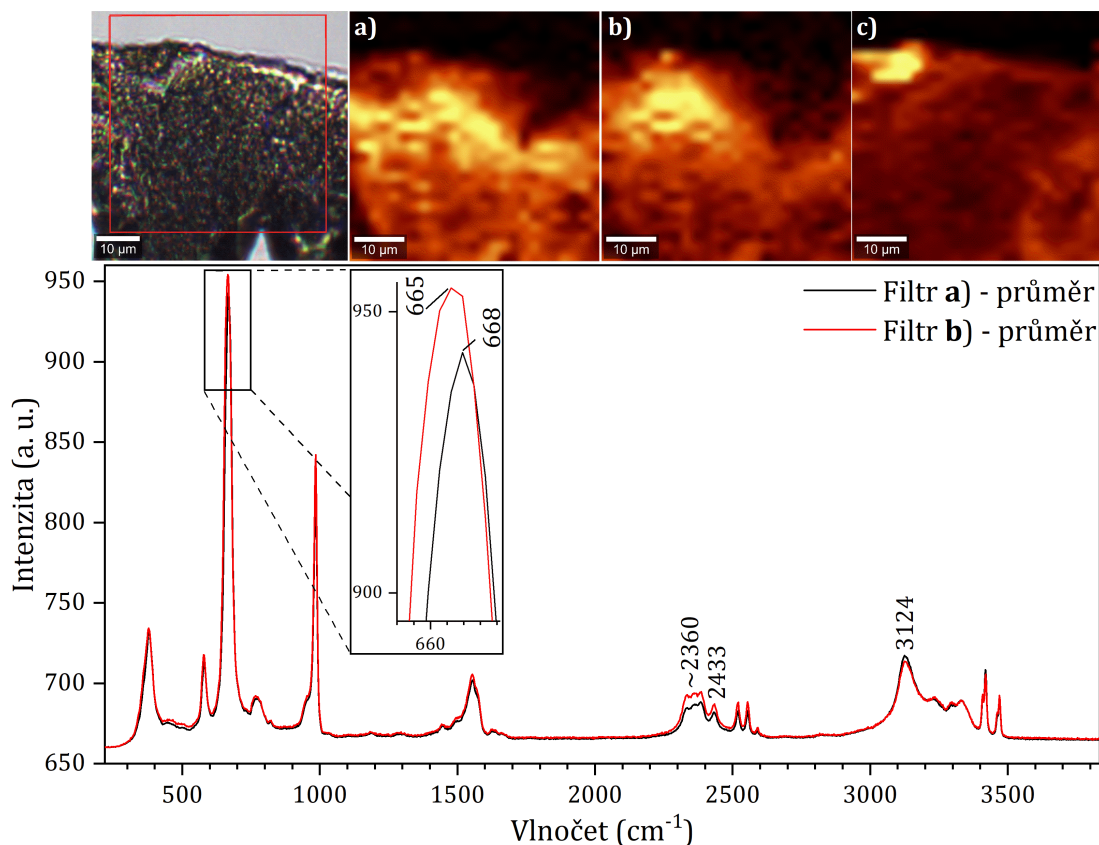
Obrázek 5.18: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H_2O o koncentraci $0,01 \text{ mg/ml}$ ($0,08 \text{ mM}$); oblast **1a**), resp. **2a**), v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm^{-1} na pozici 692 , resp. $677, \text{ cm}^{-1}$, oblast **1b**) zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 200 cm^{-1} na pozici 2900 cm^{-1} , oblast **1c**) a **2b**) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1}

Detailnější porovnání spekter melaminu z měření z kapek z roztoku v H_2O při koncentracích $0,1 \text{ mg/ml}$ a $0,01 \text{ mg/ml}$ po korekci pozadí je znázorněno na *Obrázku 5.19*. Ve srovnání s DMSO se voda jeví jako vhodnější rozpouštědlo – spektra nevykazují „parazitický“ signál v C-H valenční oblasti. Zdá se, že tedy nedochází k výrazné degradaci vzorku. Velmi zajímavý je rozdíl mezi oběma spektry získanými ze zaschlých kapek o $0,01 \text{ mg/ml}$ koncentraci. Zatímco černé spektrum je prakticky identické s tím, které bylo získáno z kapky o koncentraci $0,1 \text{ mg/ml}$, zelené spektrum je značně odlišné. Vedle pásu na 583 cm^{-1} se objevil nový na 560 cm^{-1} , zároveň došlo k posunutí hlavního vibračního pásu z 676 cm^{-1} na 692 cm^{-1} , vymizení pásu na 782 cm^{-1} , změně tvaru spektra v oblasti nad 3000 cm^{-1} a vymizení dvou ostrých pásů na cca 3418 a 3469 cm^{-1} .



Obrázek 5.19: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H_2O o koncentracích 0,1 mg/ml (0,79 mM) a 0,01 mg/ml (0,08 mM) (dvě měření)

Pro zajímavost byla změřena DCDR spektra i z kroužku/vyschlé kapky, která pocházela z 1 mg/ml roztoku melaminu v D_2O . Signál byl opět detekován z oblasti, která neměla viditelně výraznou krystalickou texturu (viz *Obrázek 5.20*). Vytvořeny byly dva filtry na oblast kolem 3250 cm^{-1} , která odpovídá oblasti N-H valenčních vibrací, a kolem 2400 cm^{-1} , kde bylo možné pozorovat nové vibrační pásy odpovídající N-D valenčním vibracím, které se kvůli větší hmotnosti deuteria v porovnání s vodíkem posunou do nižších vlnocetů. Přítomnost obou oblastí indikuje, že pravděpodobně nedošlo při přípravě vzorků k dokonalému rozpuštění melaminu v D_2O , molekuly melaminu tvořily klastry, a část vodíků tak nebyla nahrazena deuteriem. Rozdíl v intenzitách pásů u spekter z obou filtrů navíc implikuje rozdílnou míru vystavení molekulám/kontaktu s molekulami rozpouštědla. Tomu odpovídá i posun dýchací vibrace do nižších vlnocetů, který je však výraznější pro spektrum s vyšší intenzitou pásů odpovídajících vibracím, kterých se účastní deuterium (např. pásy na 2360 cm^{-1} a pás na 2433 cm^{-1}), a naopak nižší intenzitou v oblasti N-H valenčních vibrací (např. na 3124 cm^{-1}). Tendence k nedokonalému rozpouštění/klastrování melaminu ve vodě byla již dobře popsána i v literatuře, viz např. (Chattaraj a Paul, 2018).

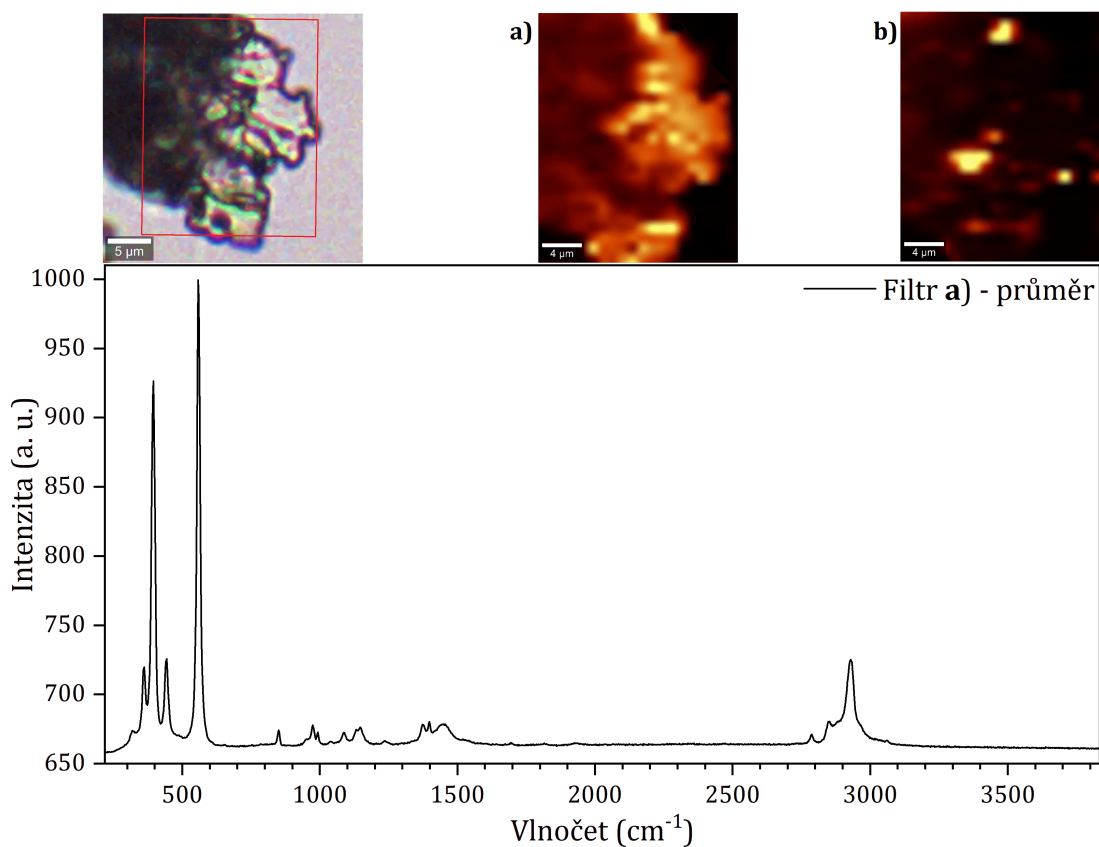


Obrázek 5.20: Ramanova spektra melaminu z vyschlé kapky roztoku v D_2O o koncentraci 1 mg/ml (7,93 mM); oblast **a**) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 450 cm^{-1} na pozici 3218 cm^{-1} , oblast **b**) zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 400 cm^{-1} na pozici 2389 cm^{-1} , oblast **c**) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm^{-1} na pozici 2100 cm^{-1}

5.3.2 Vyschlé kapky thiramu

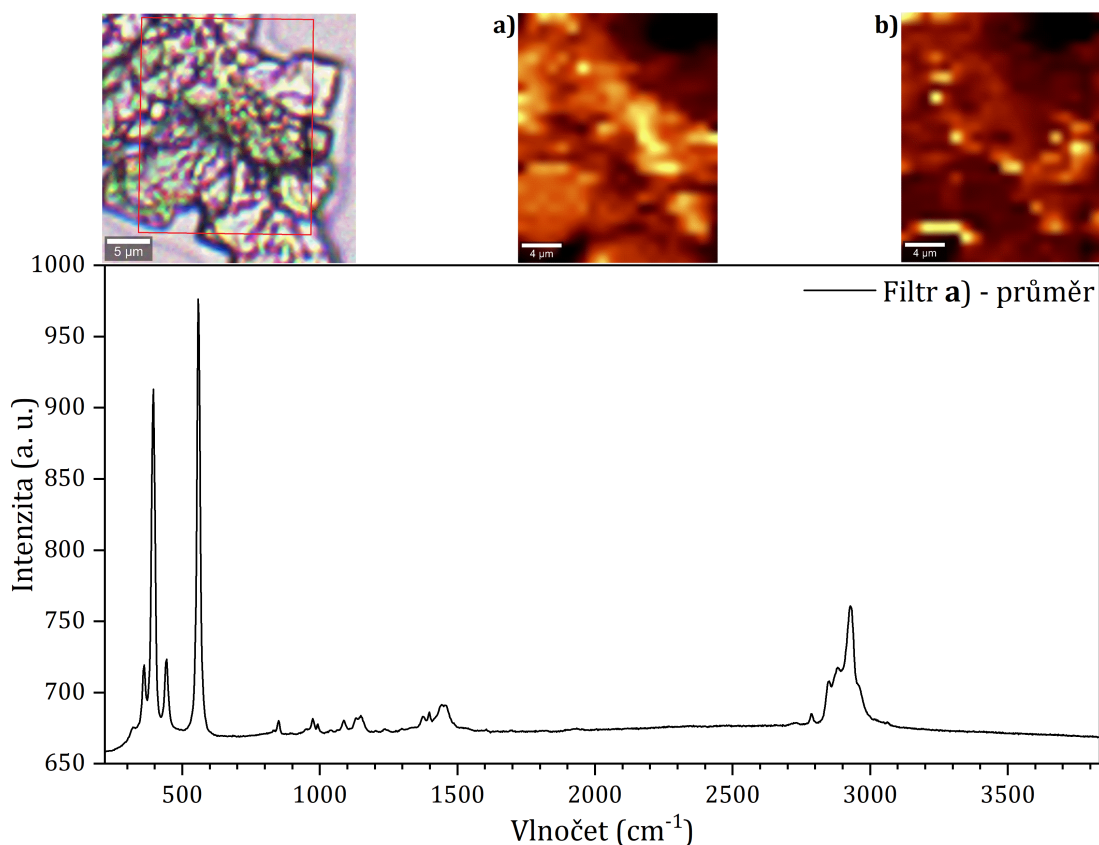
Signál thiramu byl hledán podle intenzity výrazného pásu přibližně na 557 cm^{-1} odpovídajícího S-S vibraci. Kapky z roztoků thiramu v C_6H_6 a $CHCl_3$ vytvořily po uschnutí shluky koncentrované převážně uprostřed původní kapky, nikoli na okrajích, jak tomu bylo v případě melaminu.

Pro měření z roztoku thiramu v C_6H_6 o koncentraci 1 mg/ml byla vybrána oblast na okraji shluku, která se postupně ztenčovala (viz *Obrázek 5.21*). Signál odpovídající S-S vibraci, zde na 557 cm^{-1} , bylo možné získat z celé oblasti. Signál pozadí pocházel převážně od tří malých oblastí, které nebyly na shluku vizuálně odlišné.



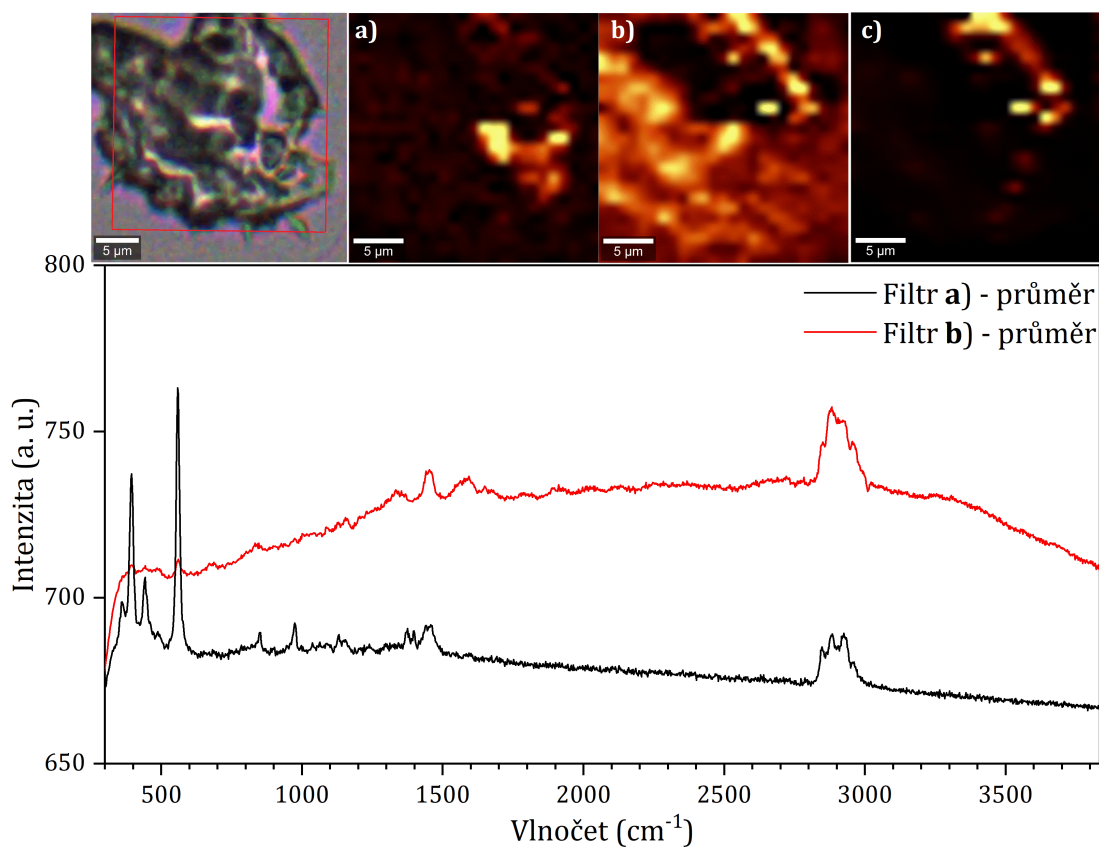
Obrázek 5.21: Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v C_6H_6 o koncentraci 1 mg/ml (4,16 mM); oblast **a)** v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 558 cm^{-1} , oblast **b)** pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}

Pro měření z roztoku thiramu v C_6H_6 o koncentraci 0,1 mg/ml byla vybrána tenčí oblast, která měla charakter mikrokryсталů či plátek (viz *Obrázek 5.22*). Signál odpovídající S-S vibraci, i zde na 557 cm^{-1} , bylo opět možné získat z celé oblasti.



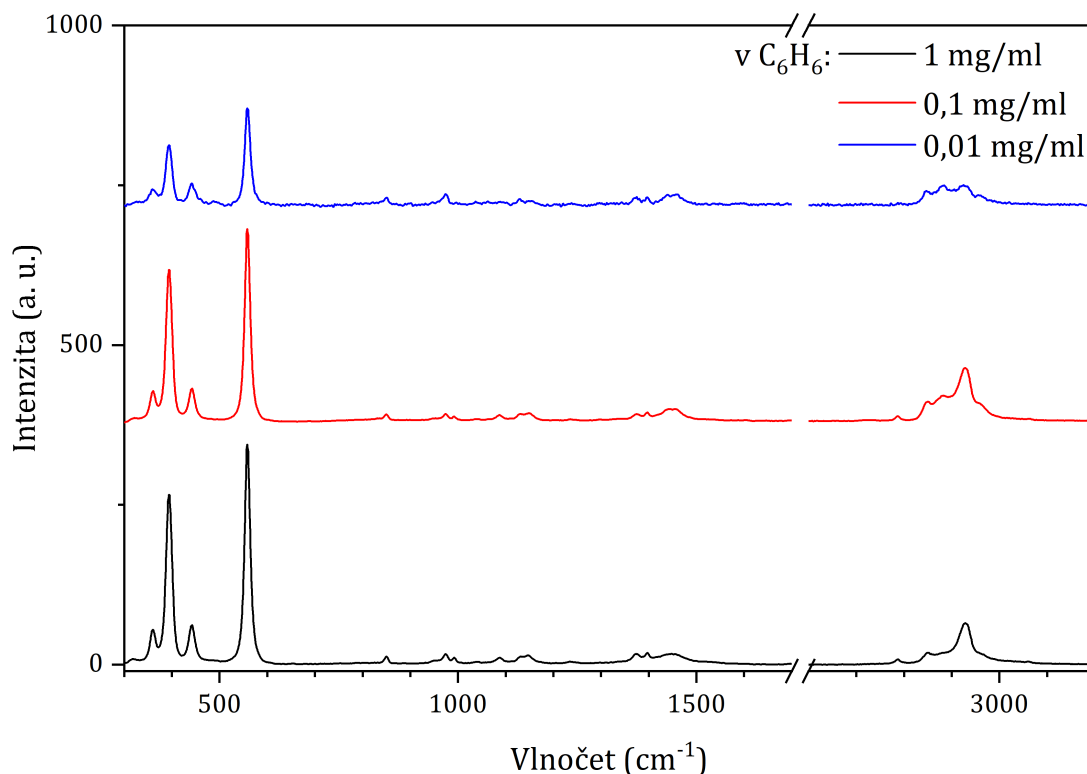
Obrázek 5.22: Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v C_6H_6 o koncentraci 0,1 mg/ml (0,42 mM); oblast **a**) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 586 cm^{-1} , oblast **b**) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}

Pro měření z roztoku thiramu v C_6H_6 o koncentraci 0,01 mg/ml byl vybrán malý shluk (viz *Obrázek 5.23*). Signál odpovídající S-S vibraci, opět na 557 cm^{-1} , bylo možné získat pouze z malé, kompaktní oblasti, zároveň je však možné pozorovat změnu tvaru spektra v oblasti C-H valenčních vibrací. Naopak z téměř celé oblasti bylo získáno spektrum, které vykazuje intenzivní signál kolem 2900 cm^{-1} v oblasti C-H valenčních vibrací, ale téměř zcela chybí pás odpovídající S-S valenční vibraci na cca 557 cm^{-1} . Velmi pravděpodobně toto spektrum odpovídá zdegradované molekule thiramu, kdy došlo k rozpadu S-S vazby a vznikly dva dimetyldithiokarbamátové ionty.



Obrázek 5.23: Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v C_6H_6 o koncentraci 0,01 mg/ml (0,04 mM); oblast **a)** v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 564 cm^{-1} , oblast **b)** zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 200 cm^{-1} na pozici 2904 cm^{-1} , oblast **c)** pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}

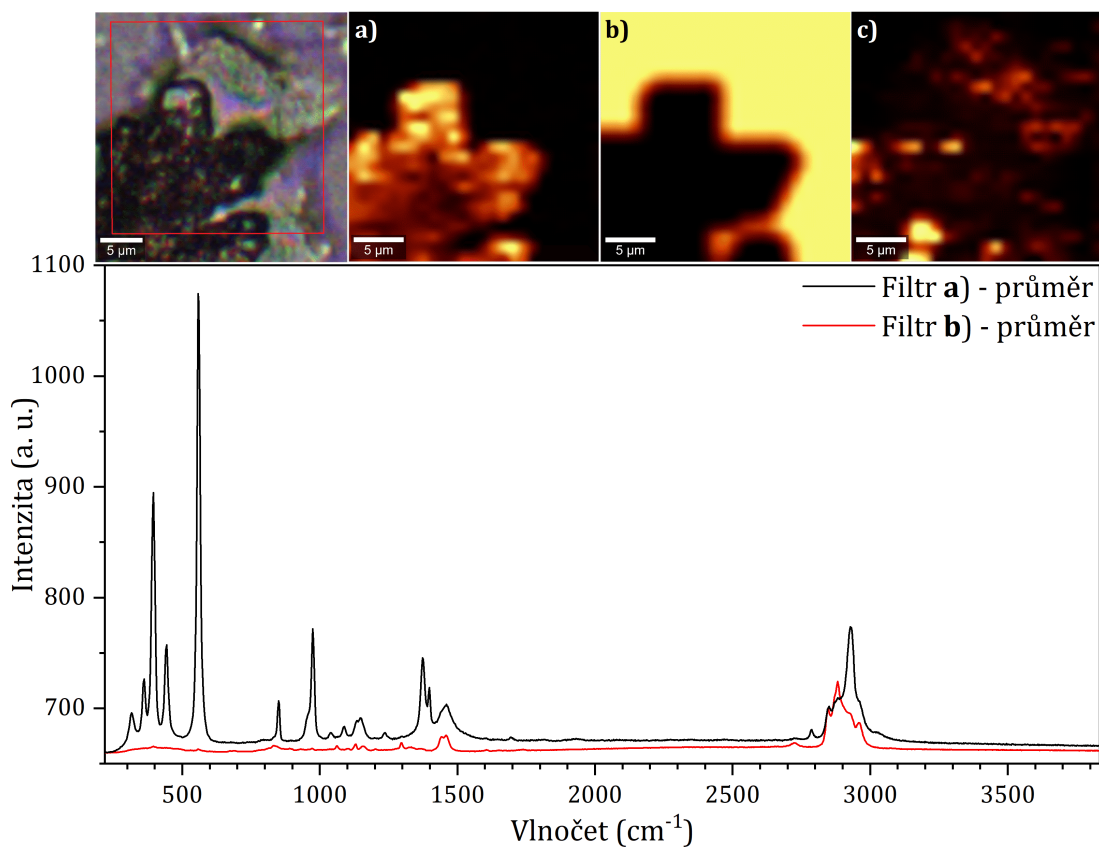
Za účelem detailnějšího porovnání rozdílů mezi spektry z měření z kapek z roztoku v C_6H_6 při různých koncentracích thiramu byla u všech spekter vybraných pomocí filtru kolem pásu na 557 cm^{-1} (tedy ve všech případech filtru **a)**) provedena korekce pozadí (viz *Obrázek 5.24*).



Obrázek 5.24: Ramanova spektra thiramu z vyschlých kapek roztoku v C_6H_6 o koncentracích 1 mg/ml (4,16 mM), 0,1 mg/ml (0,42 mM) a 0,01 mg/ml (0,04 mM)

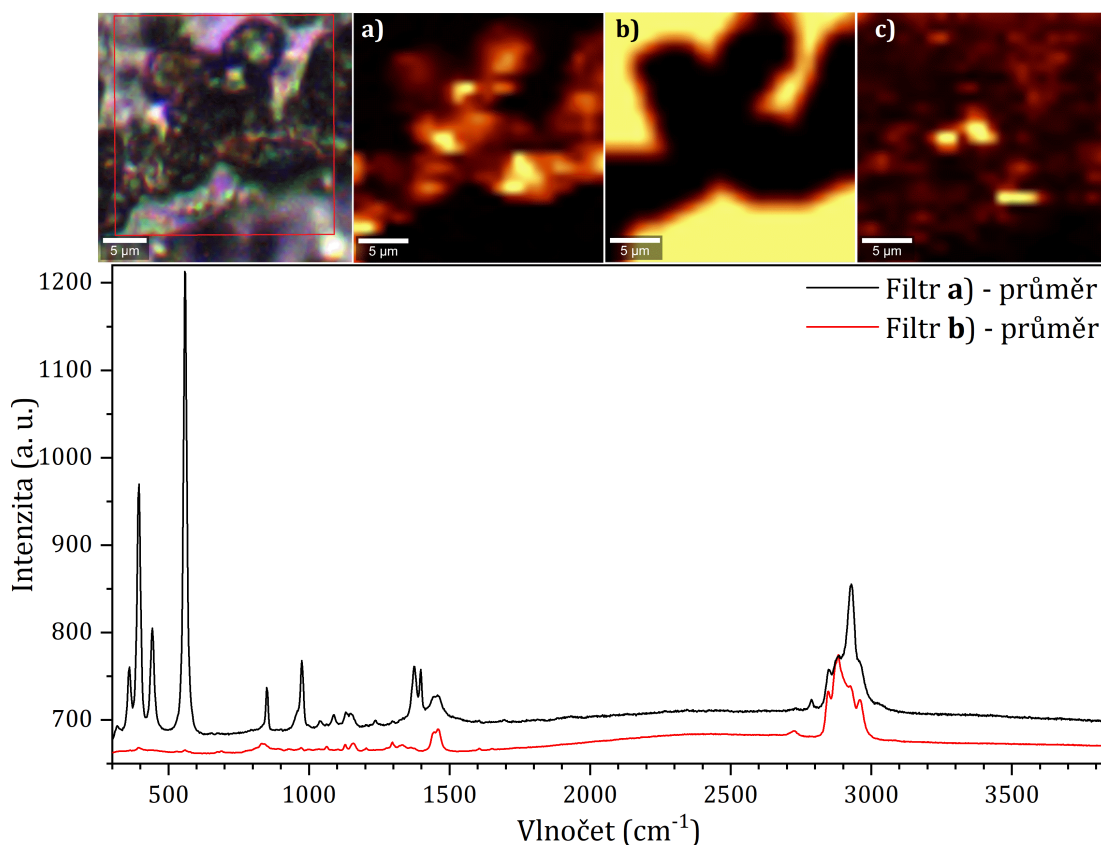
Čtyři pásy postupně na 360 cm^{-1} , 395 cm^{-1} , 442 cm^{-1} a 557 cm^{-1} zůstávají přítomny při všech třech koncentracích a nemění svoji pozici. V rozmezí mezi 600 a 1000 cm^{-1} nejsou při koncentracích 1 mg/ml a 0,1 mg/ml pozorovatelné téměř žádné změny, v případě koncentrace 0,01 mg/ml však došlo k vymizení drobného pásu na 992 cm^{-1} a několika pásů mezi 1060 a 1175 cm^{-1} . U vibračních pásů v oblasti nad 2750 cm^{-1} dochází se změnou koncentrace k výrazným proměnám intenzit, a v důsledku ke změně tvaru spektra. Celkově lze tedy říci, že benzen představuje vhodné rozpouštědlo pro thiram, které příliš nevede k jeho degradaci a umožňuje naměření kvalitních DCDR při výchozí koncentraci 0,04 mM (a pravděpodobně i nižší) bez jakéhokoli speciálního povrchu.

Pro měření z roztoku thiramu v $CHCl_3$ o nejvyšší koncentraci 1 mg/ml byl vybrán malý shluk obklopený tenkým filmem (viz *Obrázek 5.25*). Kvalitní signál odpovídající S-S vibraci, opět na 557 cm^{-1} , bylo možné získat z oblasti silnější vrstvy vzorku, tenký film byl naopak silným zdrojem signálu odpovídajícího vibrační struktury v oblasti kolem 2900 cm^{-1} , kde však došlo k vymizení S-S vibračního pásu a některých dalších pásů. Částečné vymizení S-S vibrace, které však bylo pozorováno v případě C_6H_6 až při koncentraci 0,01 mg/ml, by mohlo implikovat výraznější interakci molekuly thiramu s molekulami $CHCl_3$, která vede ke zvýšené míře degradace.



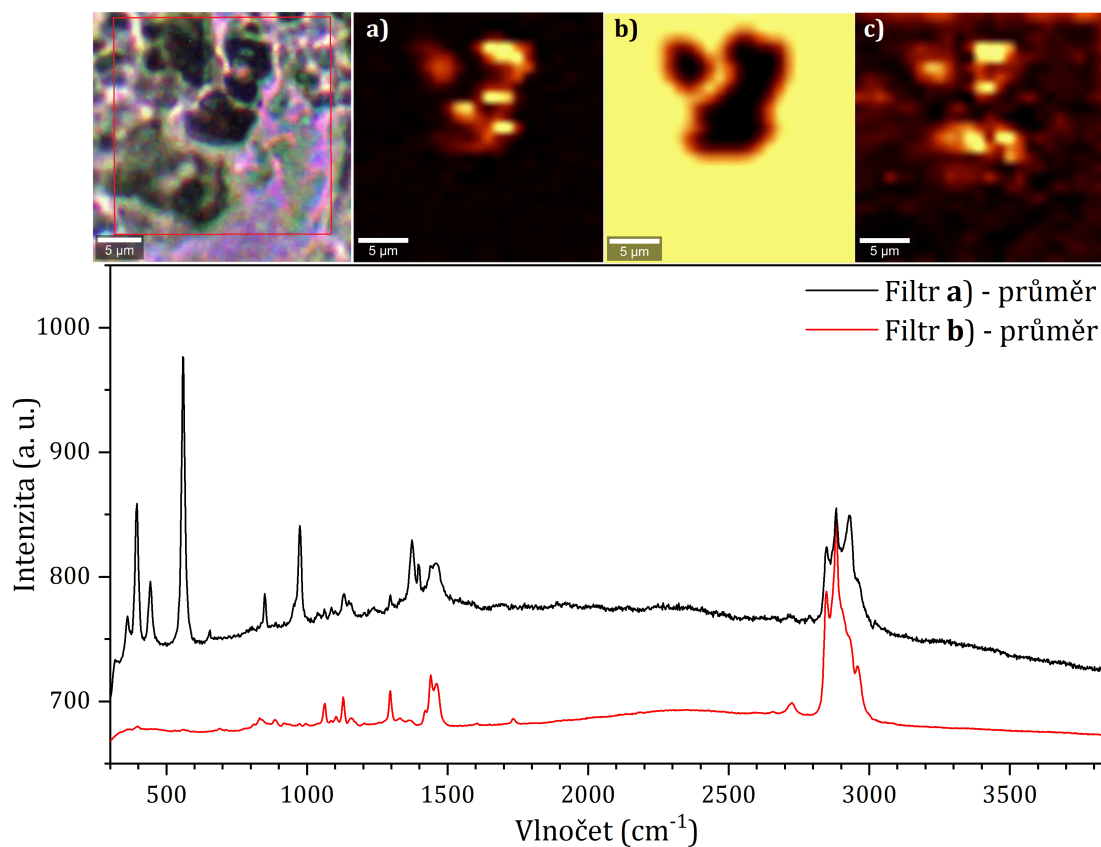
Obrázek 5.25: Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v CHCl_3 o koncentraci 1 mg/ml (4,16 mM); oblast **a)** v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 556 cm^{-1} , oblast **b)** zobrazuje inverzní filtr k filtru a), oblast **c)** pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}

Pro měření z roztoku thiramu v CHCl_3 o koncentraci 0,1 mg/ml bylo vybráno místo, kde bylo větší nahloučení vzorku (viz *Obrázek 5.26*). Podobně jako v předchozím případě byl kvalitní signál odpovídající S-S vibraci, tentokrát na 560 cm^{-1} , získán z oblasti silnější vrstvy, z celého vzorku bylo možné získat signál odpovídajícího vibrační struktury v oblasti kolem 2900 cm^{-1} , kde však došlo k vymizení S-S vibračního pásu a některých dalších pásů.



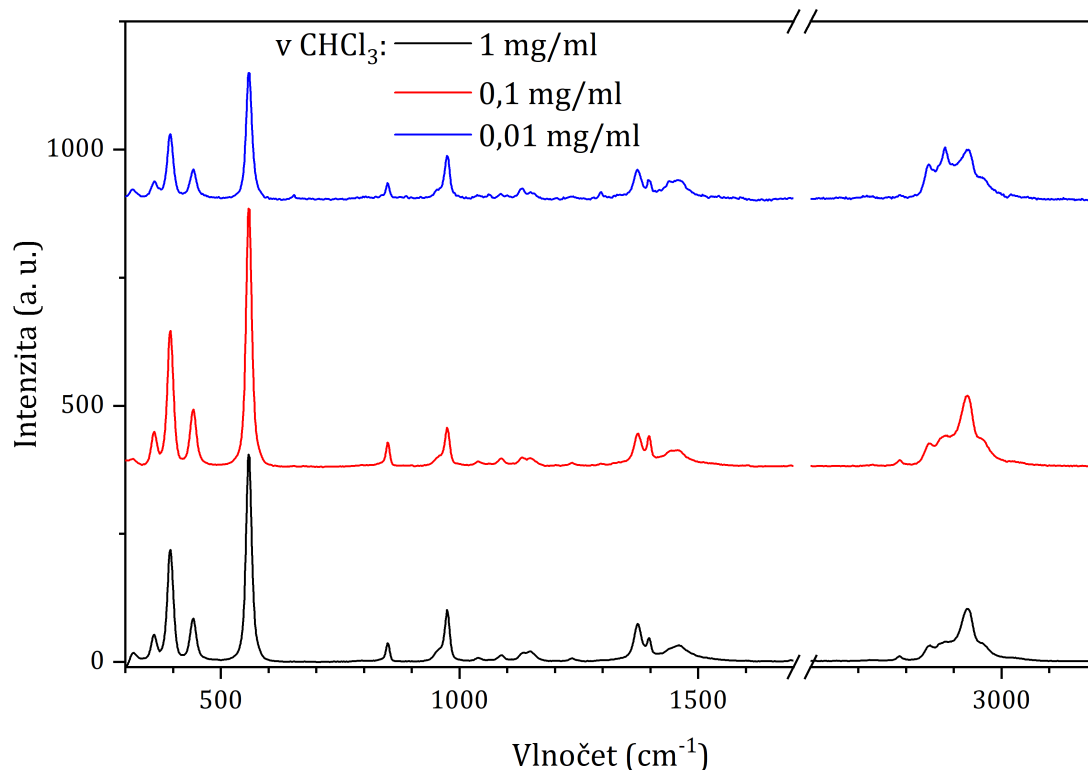
Obrázek 5.26: Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v CHCl_3 o koncentraci 0,1 mg/ml (0,42 mM); oblast **a)** v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 563 cm^{-1} , oblast **b)** zobrazuje inverzní filtr k filtru a), oblast **c)** pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}

Pro měření z roztoku thiramu v CHCl_3 o koncentraci 0,01 mg/ml bylo vybráno místo s několika shluky (viz *Obrázek 5.27*). I zde byl signál odpovídající S-S vibraci na 560 cm^{-1} lokalizován v místech, kde byl vzorek tmavší, a tedy vrstva nánosu zjevně tlustší. Šum ve spektru byl však už podstatně větší. Získat signál odpovídající vibrační struktuře v oblasti kolem 2900 cm^{-1} bylo možné z celého vzorku s výjimkou míst odpovídajících signálu S-S vibrace, a obě spektra tak bylo možné separovat.



Obrázek 5.27: Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v CHCl_3 o koncentraci 0,01 mg/ml (0,04 mM); oblast **a)** v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 556 cm^{-1} , oblast **b)** zobrazuje inverzní filtr k filtru a), oblast **c)** pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}

I v tomto případě byla za účelem detailnějšího porovnání rozdílů mezi spektry z měření z kapek z roztoku v CHCl_3 při různých koncentracích thiramu u všech spekter vybraných pomocí filtru **a)** provedena korekce pozadí (viz *Obrázek 5.28*).



Obrázek 5.28: Ramanova spektra thiramu z vyschlých kapek roztoku v CHCl_3 o koncentracích 1 mg/ml (4,16 mM), 0,1 mg/ml (0,42 mM) a 0,01 mg/ml (0,04 mM)

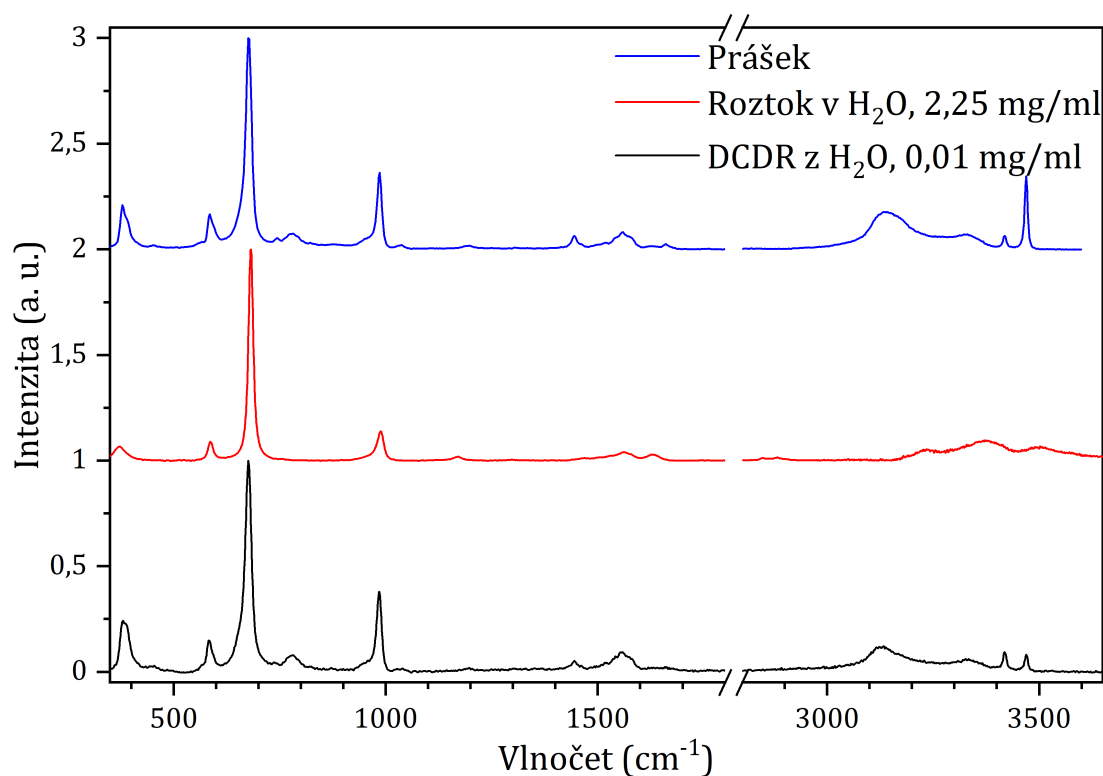
V případě koncentrací 1 mg/ml a 0,1 mg/ml jsou spektra téměř totožná. Pokud dochází ke změně, tak v intenzitách - například se mění poměr intenzit pásů na 1373 cm^{-1} a 1397 cm^{-1} . Taktéž je při koncentraci 0,1 mg/ml zřetelnější prezenze pásu na 2885 cm^{-1} . U koncentrace 0,01 mg/ml jsou změny v poměru intenzit vibračních pásů zřetelné převážně v oblasti nad 2750 cm^{-1} , kde dochází ke změně tvaru celé oblasti, i když jednotlivé pásy zůstávají stále dobře rozlišitelné a přiřaditelné odpovídajícím pásům pozorovaným i v případě předchozích koncentrací. Ač nebyl problém při všech výchozích koncentracích najít na zaschlých kapičkách místo, ze kterého se dal získat kvalitní signál thiramu, je zřejmé, že v případě použití chloroformu jako rozpouštědla dochází k větší míře degradace vzorku než při použití benzenu. Degradovaný vzorek má tendenci při usychání vytvářet tenký film, zatímco neporušený thiram nacházíme spíše v tlustějších shlucích.

5.4 Srovnání Ramanových spekter kontaminantů v různých fázích

Za účelem podrobnější analýzy byla porovnána Ramanova spektra obou kontaminantů získaná z práškových vzorků, z měření v roztocích i z vyschlých kapek.

5.4.1 Ramanova spektra melaminu v různých fázích

U spektra polykrystalického melaminu, spektra získaného z roztoku v H_2O při koncentraci 100 mg/ml a spektra z vyschlé kapky roztoku melaminu v H_2O o koncentraci 0,01 mg/ml byla provedena korekce pozadí a normování na maximální intenzitu pásu příslušejícího dýchací vibraci nacházející se postupně na 678 cm^{-1} , 682 cm^{-1} a 676 cm^{-1} (viz *Obrázek 5.29*).

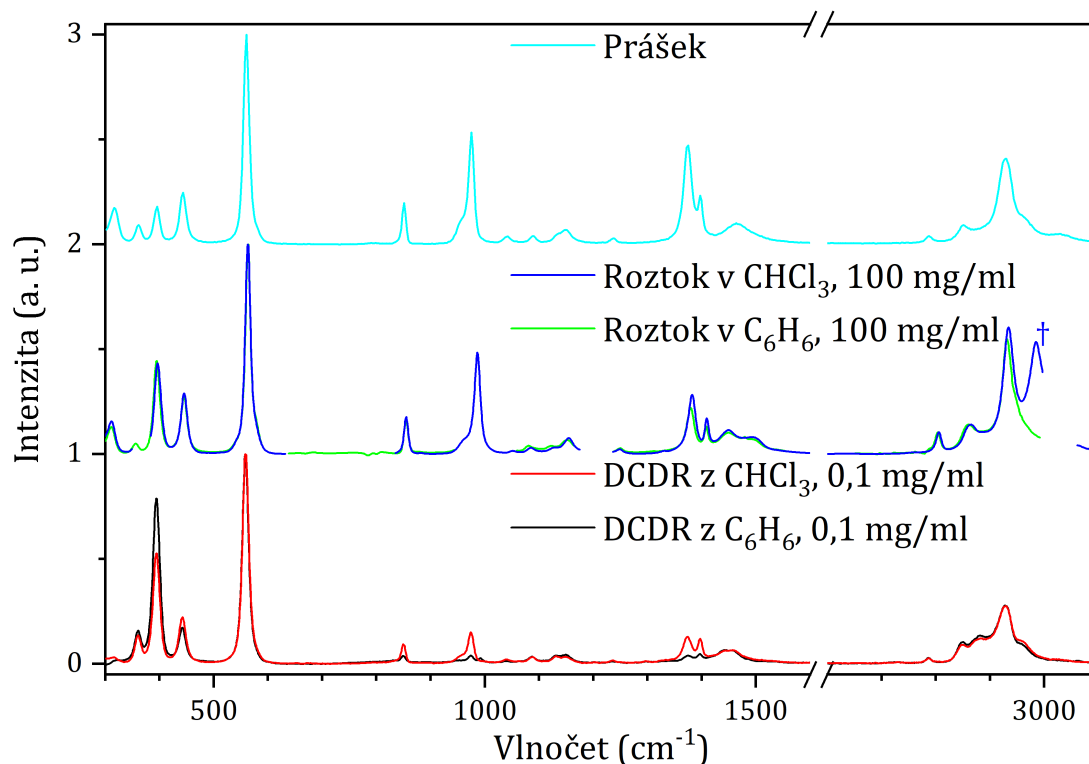


Obrázek 5.29: Ramanova spektra: polykrystalického melaminu, z roztoku melaminu v H_2O při koncentraci 2,25 mg/ml (17,84 mM), z vyschlé kapky roztoku melaminu v H_2O o koncentraci 0,01 mg/ml (0,08 mM)

Spektrum získané z prášku a spektrum z DCDR měření jsou vzájemně jen málo odlišná - jmenovitě jde o vymizení nízkého pásu na 1660 cm^{-1} v případě DCDR, celkově trochu jiný tvar v oblasti kolem 1500 cm^{-1} a změnu v poměru intenzit ostrých pásů v oblasti N-H valenčních vibrací. Velmi jasná podobnost však naznačuje, že spolu s vypařováním rozpouštědla docházelo k rekrystalizaci melaminu. Spektrum v kapalně fázi je více odlišné. Opět jde o oblast kolem 1500 cm^{-1} , která výrazně změnila tvar, a navíc vymizelo několik pásů (např. pás na 780 cm^{-1}). Nejvíce rozdílná je však oblast N-H valenčních vibrací. Dá se tak vyvozovat, že byl melamin při měření v H_2O dobře rozpuštěn a že spektrum izolované solvatované molekuly je tak v této oblasti poměrně značně odlišné od spektra melaminových molekul, které jsou navzájem provázané N-H...N vodíkovými můstky.

5.4.2 Ramanova spektra thiramu v různých fázích

U spektra polykrystalického thiramu, spekter z roztoků thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 při koncentracích 100 mg/ml a spekter z vyschlých kapek roztoků thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 o koncentracích 0,1 mg/ml byla provedena korekce pozadí a normování na maximální intenzitu pásu příslušejícího S-S vibraci nacházející se postupně na 560 cm^{-1} , 563 cm^{-1} , 564 cm^{-1} a 558 cm^{-1} (viz *Obrázek 5.30*).



Obrázek 5.30: Ramanova spektra: polykrystalického thiramu, z roztoků thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 při koncentracích 100 mg/ml (0,42 M), z vyschlých kapek roztoků thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 o koncentracích 0,1 mg/ml (0,42 mM); †posun valenční C-H vibrace CHCl_3 způsobený navázáním na molekulu thiramu

Spektra ve všech třech fázích jsou si velmi podobná. Nejvýraznější rozdíly je možné pozorovat především v oblasti C-H valenčních vibrací. V případě rozdílu mezi roztokem v CHCl_3 a práškem je vysvětlením pravděpodobně interakce atomů síry v molekule thiramu s molekulami rozpouštědla, která způsobí posunutí pásu C-H valenční vibrace CHCl_3 na 3019 cm^{-1} k nižším vlnovým číslům. V případě spekter z DCDR měření se objevuje nový pás na 2880 cm^{-1} . V oblasti kolem 1450 cm^{-1} je mezi fázemi možné pozorovat drobné změny tvaru spektra. V oblasti kolem 400 cm^{-1} dochází ke změnám poměru intenzit jednotlivých pásů. V roztoku a ve vyschlé kapce došlo oproti prášku k oddělení pásů na 1382 cm^{-1} a 1410 cm^{-1} . K zániku nebo objevení nových pásů dochází ojediněle. Celkově vzato jsou Ramanova spektra ze všech fází – pevné (polykrystaly), kapalné (roztok) a amorfni (DCDR, vyschlé kapky) – velmi podobná až téměř identická.

Zdá se tedy, že thiram nevytváří klastry. Problémem při práci s ním však může být jeho degradace, při které dochází k zániku jednoduché S-S vazby.

5.4.3 Souhrn experimentálních výsledků

A. Melamin

- (a) V pevné fázi (prášku) vykazuje melamin polykrystalickou strukturu, která se v Ramanových spektrech projevuje odlišnostmi v relativních intenzitách pásů v nízkofrekvenční oblasti (pod 300 cm^{-1}) a změnách intenzity dvou ostrých pásů v C-H oblasti
- (b) V kapalně fázi (roztoku) byla provedena měření ve vodě (koncentrace přibližně $2,25\text{ mg/ml}$, blízko limitu rozpustnosti) a DMSO (koncentrace přibližně 20 mg/ml). V obou rozpouštědlech byla získána kvalitní spektra, která si velmi dobře odpovídala. Kvůli velmi silnému Ramanovu signálu samotného DMSO však bylo spektrum melaminu ochuzeno o řadu charakteristických pásů, které se překrývaly s intenzivními pásy samotného DMSO (odečet signálu rozpouštědla nevedl ke kýženému výsledku). Odlišnosti mezi spektry melaminu ve vodě a DMSO byly malé – za zmínku stojí lépe rozlišené pásy v oblasti kolem 1500 cm^{-1} a v N-H valenční oblasti v DMSO, neboť zde nedochází k překryvu signálem O-H vibrací vody. Zdá se, že se nám úspěšně podařilo odečíst signál vody a získat signál N-H valenčních vibrací při měření ve vodě – viz *Obrázek 5.6* a srovnání s měřením v DMSO.
- (c) Při měření v těžké vodě došlo k výměně vodíků na aminových skupinách za deuteria, což mělo za následek posun vibračních pásů. Nejmarkantnější to bylo u dýchací vibrace melaminu, která se posunula o téměř 40 cm^{-1} . Reziduální signál v C-H (N-H) valenční oblasti svědčí o tom, že výměna nemusela být ideální (tj. ne všechny vodíky byly vyměněny). Jedno z možných vysvětlení tohoto chování je tendence melaminu vytvářet ve vodním prostředí aglomeráty (oligomery) provázané vodíkovými můstky mezi aminovými skupinami. V takovém případě by některé aminové vodíky byly chráněny před protium-deuteriovou výměnou. Toto pozorování bylo potvrzené i při následných DCDR měřeních, kdy po rozpuštění melaminu v těžké vodě a následném zaschnutí kapky byly pozorovány vibrace odpovídající N-H i N-D skupinám.
- (d) Při měření z kapek byla použita dvě rozpouštědla (DMSO a voda) a tři různé výchozí koncentrace látky (přibližně 8 mM , $0,8\text{ mM}$ a $80\text{ }\mu\text{M}$). Nebyl použitý žádný speciální povrch, kapky zasychaly volně na skleněném podložním mikroskopickém sklíčku. Zaschlé depozity měly charakter typický pro nízkomolekulární látky, tj. nevytvořily se kávové kroužky, ale spíše shluky. Při použití DMSO byla u nejvyšší koncentrace vidět tendence k rekrystalizaci spíše než vytváření amorfni struktury. U střední koncentrace již nebyla rekrystalizace patrná. V případě nejnižší koncentrace byla spektra zatížena vysokým šumem. Naprosto zřetelně pak bylo možné pozorovat degradaci vzorku, která byla výraznější u nižších koncentrací a projevovala se nárůstem signálu v C-H valenční oblasti a posléze i změnou tvaru signálu v oblasti $1100\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$. Domníváme se, že to svědčí o (částečném) odštípnutí primárních aminových skupin z molekuly melaminu a jejich nahrazení vodíkem. Při měření ve vodě byla rekrystalizace vzorku výraznější – pozorovali jsme ji při všech koncentracích.

racích. Zároveň však nedocházelo k tak vysoké míře degradace vzorku. Navíc se ukázalo, že melamin a jeho degradovaná forma byly na depozitu prostorově separovány. Podařilo se nám naměřit i spektrum v amorfní fázi, která nevykazovala ostré pásy v N-H oblasti spektra. Tato forma vykazovala výrazné spektrální změny v oblasti otisku prstu – dýchací vibrace byla posunutá o cca 16 cm^{-1} k vyšším vlnočtům a středně intenzivní pás na 583 cm^{-1} se rozdělil na dva. Pro DCDR měření se jako vhodnější rozpouštědlo jeví voda a domníváme se, že by bylo možné bez použití speciálního povrchu identifikovat melamin v koncentraci ještě o řád nižší.

B. Thiram

- (a) V pevné fázi (prášku) vykazoval thiram menší variabilitu mezi různými oblastmi vzorku než tomu bylo u melaminu. Změny v Ramanových spektrech byly drobnějšího charakteru a omezené na nejnižší nízkofrekvenční oblast (pod 150 cm^{-1}). Větší odlišnosti byly dány změnou intenzity fluorescenčního pozadí.
- (b) V kapalně fázi (roztoku) byla provedena měření v chloroformu, benzenu a tetrachlormethanu v koncentracích přibližně 100 mg/ml . Zároveň byly porovnány tři různé vzorky thiramu lišící se deklarovanou čistotou. Mezi nimi nebyly pozorovány žádné odlišnosti, jejich Ramanova spektra byla identická. Kvůli nízké rozpustnosti thiramu ve vodě bylo nutné pro měření v kapalně fázi použít organická rozpouštědla, která však obecně mají intenzivní signály – kvůli tomu pak nelze v jednom rozpouštědle získat informaci o všech vibračních pásech studovaného vzorku a je nutné kombinovat rozpouštědla, která mají vlastní vibrace v odlišných spektrálních oblastech. Ukázalo se, že při kombinaci spekter z benzenu a chloroformu jsme schopni získat spektrum thiramu v téměř celé oblasti fundamentálních molekulových vibrací s výjimkou úzkého intervalu mezi 1160 a 1240 cm^{-1} . Tuto oblast se nám ale podařilo získat z měření v tetrachlormethanu, kde však byla rozpustnost thiramu nižší, a získané spektrum tak bylo zatíženo vysokou mírou šumu. Spektra z různých rozpouštědel jsou velmi podobná až identická. Volba rozpouštědla tedy neměla vliv na konformační preference molekuly thiramu.
- (c) Při měření v chloroformu jsme v C-H valenční oblasti pozorovali nový pás, který se zde v jiných rozpouštědlech nevyskytoval. Domníváme se, že přísluší valenční vibraci C-H vazby v molekule chloroformu, pokud se tato účastní vodíkové vazby na thio skupinu v molekule thiramu.
- (d) Při měření z kapek byla i v případě thiramu použita dvě rozpouštědla (benzen a chloroform) a tři různé výchozí koncentrace kontaminantu (přibližně 4 mM , $0,4\text{ mM}$ a $40\text{ }\mu\text{M}$). Opět nebyl použit žádný speciální povrch, kapky zasychaly volně na skleněném podložním mikroskopickém sklíčku. Zaschlé depozity byly převážně shlukového charakteru, často jsme však mezi shluky pozorovali i tenký film. Charakteristická spektra thiramu se nám podařilo získat při použití obou rozpouštědel a při všech koncentracích. Jejich kvalita byla i při $40\text{ }\mu\text{M}$ počáteční koncentraci vzorku velmi dobrá a dá se předpokládat, že bychom mohli (i

na sklíčku) identifikovat thiram i o koncentraci o řád či dva nižší. Jednoznačnou komplikací měření však byla značná míra degradace vzorku – thiram má tendenci podléhat štěpení S-S vazby a vzniknou dva dimethylthiokarbamátové ionty (ty mohou dále degradovat až na dimethylamin a sirouhlík). Toto chování bylo možné v Ramanových spektrech dobře identifikovat, neboť bylo spojeno s vymizením specifického pásu S-S vibrace a posunem pásů v oblasti C-H valenčních vibrací. Z porovnání obou rozpouštědel se zdá, že míra degradace je v případě benzenu o něco nižší. Toto chování by mohlo souviset s existencí vodíkových vazeb mezi thiramem a chloroformem.

5.5 Výpočet Ramanova spektra molekuly melaminu

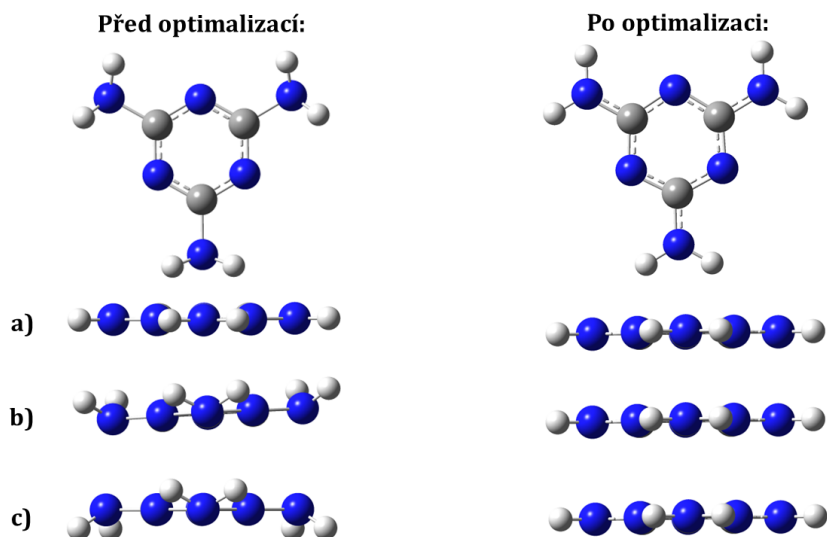
Abychom detailně porozuměli Ramanovu spektru melaminu a byli schopni přiřadit jednotlivé pásy konkrétním vibračním pohybům této molekuly, pustili jsme se do kvantově mechanických výpočtů. Konkrétně pomocí metody hustotního funkcionalu, která dobře zahrnuje korelační efekty vlastní víceelektronovým systémům a přitom není zdaleka tak náročná na výpočetní čas jako klasické post Hartree-Fockovské metody. Zprvu se zdálo, že výpočet Ramanova spektra melaminu bude jednoduchá úloha, neboť se jedná o jednoduchou rigidní symetrickou molekulu, a že nebude problém dobře vystihnout experimentální spektra. Situaci však značně zkomplikovala tendence melaminu vytvářet aglomeráty a výrazně interagovat s rozpouštědlem, jak je ukázáno v následujících podkapitolách.

5.5.1 Optimalizace struktury melaminu

Odrasovým můstkem pro naše spektrální simulace byly výpočty, které provedli Mircescu a kol. (2012). Ti pozorovali, že při použití funkcionalu B3LYP a báze 6-311++G(d,p) dostávají pro jednou protonovaný kationt melaminu planární strukturu, ale neutrální molekula melaminu byla na této úrovni po provedení geometrické optimalizace neplanární. Jak však sami ve své práci uvádějí, předcházející studie využívající stejné metody předpověděla obě varianty planární.

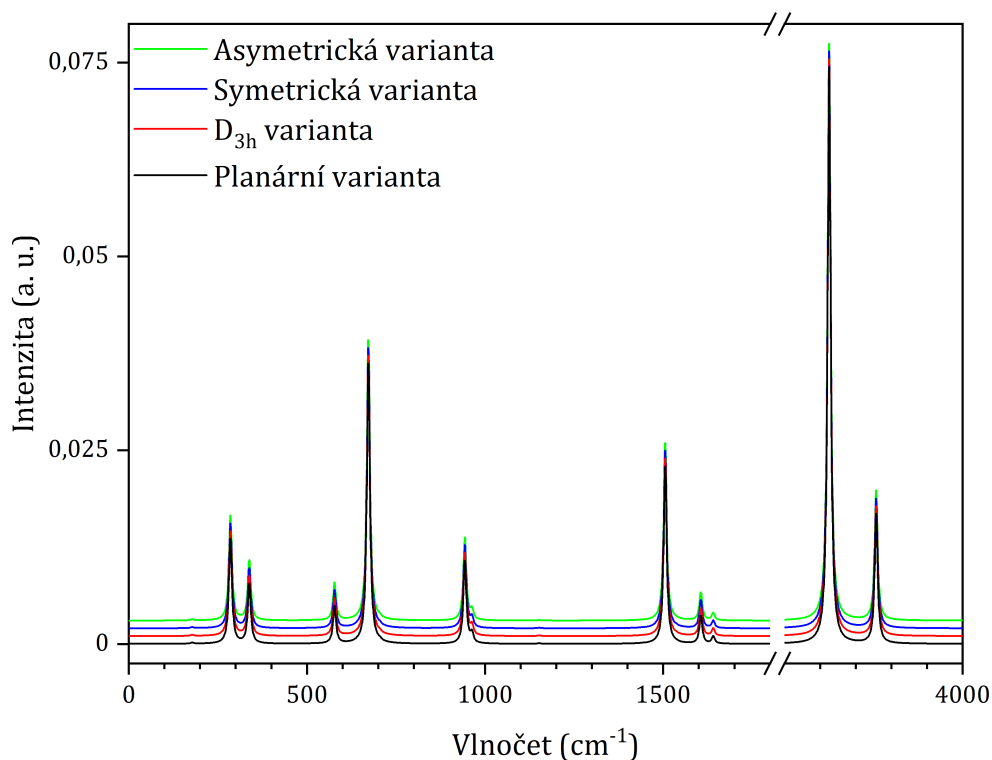
Abychom tato pozorování potvrdili či vyvrátili, vyrobili jsme několik variant výchozích geometrií molekuly melaminu pro optimalizaci. Konkrétně se jednalo o zcela planární strukturu bez neurčené fixní bodové grupy, o strukturu, pro kterou byla zvolena bodová grupa D_{3h} , o strukturu se všemi vodíky v NH_2 skupinách vychýlenými z roviny na jednu stranu (dále označeno jako symetrická varianta) a o strukturu s vodíky ze dvou NH_2 skupin vychýlenými z roviny na jednu stranu a s vodíky ze zbývajících NH_2 skupin na druhou stranu (dále označeno jako asymetrická varianta) (viz *Obrázek 5.31*, vlevo). Tyto struktury jsme poté optimalizovali při použití funkcionalu B3LYP a různých velikých bazových setů počínaje double- ζ bází 6-31G* a konče triple- ζ bází 6-311++G(3d2f,3p2d) s množstvím přidávaných polarizačních funkcí na těžších atomech i vodících a také s přidávanými difúzními funkcemi. Solvent byl do výpočtů zahrnut prostřednictvím implicitního modelu rozpouštědla - cpcm(voda). Přitom jsme pozorovali, že při zvětšování báze je sys-

tém po optimalizaci stále více a více planární, až při největší použité bázi se jeví zcela planární – dusíky primárních aminů se účastní aromatické konjugace (viz *Obrázek 5.31*, vpravo). Nezávisle na výchozí geometrii všechny modely dokonvergovaly do stejného planárního uspořádání. Jediná drobná odlišnost byla, že se zoptimalizované modely lišily bodovou grupou symetrie (ač na pohled vypadaly stejně). Výpočetní software identifikoval postupně bodové grupy C_{2v} (planární var.), C_{2v} (D_{3h} var.), C_s (symetrická var.) a C_s (asymetrická var.).



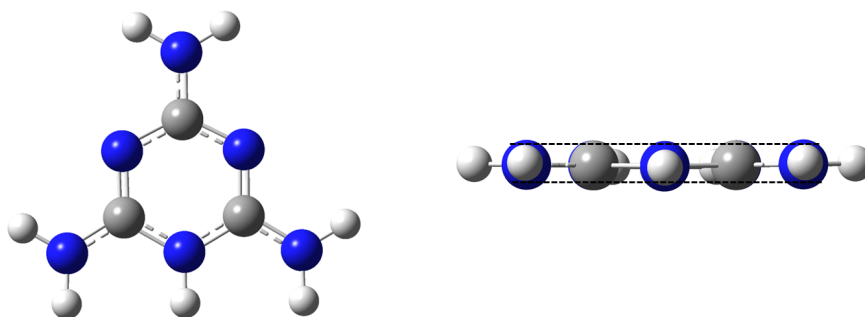
Obrázek 5.31: Výchozí geometrie pro optimalizaci neutrální molekuly thiramu a výsledky optimalizace: **a)** planární, **b)** neplanární - symetrická varianta, **c)** neplanární - asymetrická varianta; pohled shora pro variantu b); úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G(3d2f,3p2d), cpcm(voda)

Srovnání vypočítaných Ramanových spekter pro zoptimalizované struktury je vidět na *Obrázku 5.32*. Jednotlivá spektra byla pro názornost umístěna nad sebe (odsazení je po 0,001 a. u.), neboť se dokonale překrývala. Rozdíl mezi finální bodovou grupou C_{2v} a C_s není ve spektrech pozorovatelný. Pro následné výpočty jsme se rozhodli používat kombinaci funkcionálu a báze B3LYP/6-311++G**. Na této úrovni jsme konzistentně získávali dobrou shodu mezi experimentálními a teoreticky určenými vlnovky jednotlivých vibračních pásů. Přidávání dalších polarizačních funkcí sice vedlo k větší planaritě zoptimalizovaných struktur, jak je zmíněno výše, ale vypočtené vibrační frekvence experimentu již tak dobře neodpovídaly.



Obrázek 5.32: Nasimulovaná Ramanova spektra neutrální molekuly melaminu pro různé počáteční geometrie; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G(3d2f,3p2d), cpcm(voda)

Podobný postup jako pro neutrální molekulu byl zvolen i pro jednu protonovanou formu melaminu. V tomto případě však optimalizace ani s tou největší bází atomových orbitalů (6-311++G(3d2f,3p2d)) nevedla k dokonale planární struktuře. Na *Obrázku 5.33* je z bočního pohledu zřetelné, že mezi vodíky na primárních a sekundární aminové skupině je repulze a že se snaží vyklonit z planárního uspořádání.



Obrázek 5.33: Výsledek optimalizace jednou protonované molekuly melaminu; vlevo pohled shora, vpravo pohled ze strany; čárkované čáry znázorňují vychýlení vodíků; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

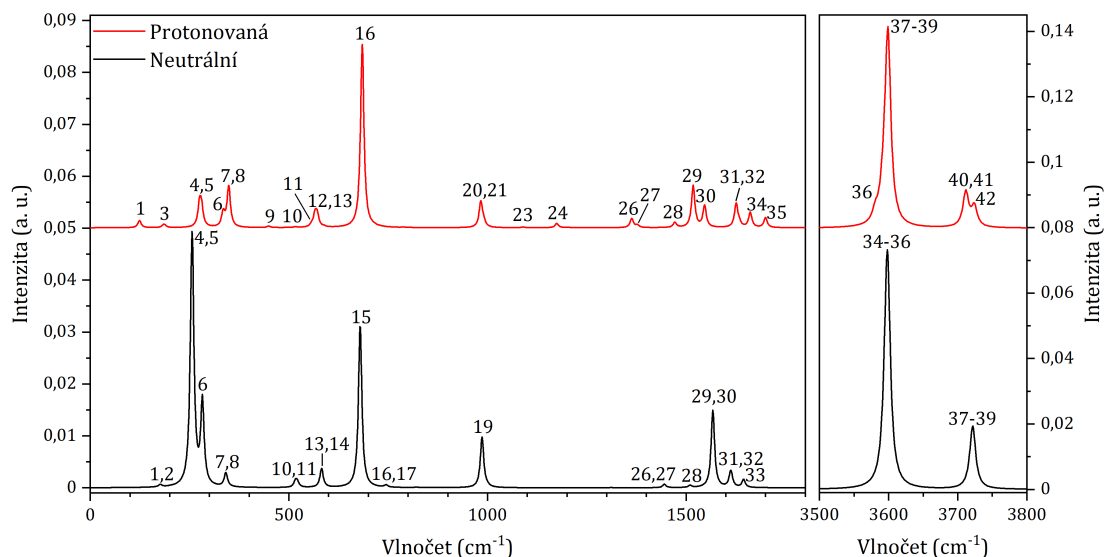
5.5.2 Vibrační analýza monomeru neutrálního a jednou protonovaného melaminu

Pro zoptimalizované struktury melaminu v neutrální i jednou protonované formě byly provedeny výpočty jejich Ramanových spekter a detailní analýza jednotlivých vibračních módů (viz *Tabulka 5.3* a *Obrázek 5.34*).

Tabulka 5.3: Vibrační analýza neutrální a jednou protonované formy molekuly melaminu

Neutrální		Mód	Protonovaná	
DFT Vlnočet (cm ⁻¹)	Vibrace		DFT Vlnočet (cm ⁻¹)	Vibrace
176 vw	$\gamma(\text{C-N-C-NH}_2)$ op	1	124 w	$\gamma(\text{C-N-C-NH}_2)$ op
176 w	$\gamma(\text{C-N-C-NH}_2)$ op	2	184 vw	$\gamma(\text{C-NH}_2)$ ip
202 \emptyset	$\gamma(\text{C-NH}_2)$ ip	3	187 w	$\gamma(\text{C-N-C-NH}_2)$ op
256 s	$\delta(\text{NH}_2)$ vějířová op	4	277 m	$\delta(\text{NH}_2)$ vějířová ip + $\gamma(\text{N-H})$ op
258 s	$\delta(\text{NH}_2)$ vějířová op	5	283 m	$\delta(\text{NH}_2)$ vějířová op
283 s	$\delta(\text{NH}_2)$ vějířová ip	6	334 w	$\delta(\text{NH}_2)$ vějířová
341 m	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$	7	348 m	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$
342 m	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$	8	349 m	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$
504 \emptyset	$\delta(\text{NH}_2)$ kroutivá ip	9	449 w	$\gamma(\text{N-H}) + \delta(\text{NH}_2)$ kroutivá
516 m	$\delta(\text{NH}_2)$ kroutivá op	10	518 w	$\delta(\text{NH}_2)$ kroutivá op
521 m	$\delta(\text{NH}_2)$ kroutivá op	11	557 w	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$ ip
555 \emptyset	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$ ip	12	566 m	$\delta(\text{CNCN})$
583 m	$\delta(\text{CNCN})$	13	571 w	$\delta(\text{CNCN})$
583 m	$\delta(\text{CNCN})$	14	586 vw	$\delta(\text{NH}_2)$ kroutivá
680 s	$\delta(\text{CNCNCN})$ dýchací	15	590 vw	$\gamma(\text{NH}) + \delta(\text{NH}_2)$ kroutivá ip
744 w	$\gamma(\text{CN}_3)$ op	16	685 s	$\delta(\text{CNCNCN})$ dýchací
745 w	$\gamma(\text{CN}_3)$ op	17	714 w	$\gamma(\text{CN}_3)$ op
821 w	$\gamma(\text{CN}_3)$ ip	18	729 w	$\gamma(\text{CN}_3)$ op
986 s	$\delta(\text{NCN})$ v cyklu ip	19	788 w	$\gamma(\text{CN}_3)$ ip
1000 w	$\delta(\text{NCN})$ v cyklu op	20	983 s	$\delta(\text{NCN})$ v cyklu ip
1000 w	$\delta(\text{NCN})$ v cyklu op	21	990 m	$\delta(\text{NCN})$ v cyklu op + $\delta(\text{NH}_2)$ kývavá
1147 \emptyset	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$ ip + $\delta(\text{NH}_2)$ kývavá	22	1003 vw	$\delta(\text{NCN})$ v cyklu op, $\delta(\text{NH}_2)$ kývavá
1170 vw	$\delta(\text{N-C-NH}_2) + \delta(\text{NH}_2)$ kývavá	23	1091 w	$\nu(\text{C-NH}) + \delta(\text{NH}_2)$ kývavá ip
1171 vw	$\delta(\text{N-C-NH}_2)$ ip + $\delta(\text{NH}_2)$ kývavá	24	1174 m	$\nu(\text{C-NH}) + \delta(\text{NH}_2)$ kývavá ip
1311 w	$\nu(\text{C-N})$ v cyklu + $\delta(\text{NH}_2)$ kývavá	25	1203 vw	$\nu(\text{C-N})$ v cyklu + $\delta(\text{NH}_2)$ kývavá ip
1445 m	$\nu(\text{C-NH}_2)$ op	26	1363 m	$\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C-NH}_2)$ op
1445 m	$\nu(\text{C-NH}_2)$ op	27	1378 m	$\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C-N})$ op
1510 m	$\nu(\text{C-NH}_2)$ ip + $\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková ip	28	1472 m	$\nu(\text{C-NH}_2)$ op
1567 s	$\nu(\text{C-N})$ v cyklu	29	1518 s	$\nu(\text{C-N})$ op
1567 s	$\nu(\text{C-N})$ v cyklu	30	1546 s	$\nu(\text{C-NH}_2)$ ip + $\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková ip
1613 s	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková op + $\nu(\text{C-NH}_2)$ ip	31	1626 s	$\nu(\text{C-N})$ v cyklu ip + $\nu(\text{C-NH}_2)$ + $\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková
1614 s	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková op + $\nu(\text{C-NH}_2)$ ip	32	1634 m	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková op, $\nu(\text{C-N})$ ip
1645 m	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková ip + $\nu(\text{C-NH}_2)$ ip	33	1642 vw	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková op + $\delta(\text{N-H})$ op
3598 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. op	34	1662 s	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková op + $\delta(\text{N-H})$ ip
3598 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. op	35	1700 s	$\delta(\text{N-H}_2)$ nůžková ip + $\nu(\text{C-NH}_2)$ ip
3599 s	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. ip	36	3582 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. ip + $\nu(\text{N-H})$ op
3722 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ asym. op	37	3590 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. op
3722 s	$\nu(\text{N-H}_2)$ asym. ip	38	3594 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. + $\nu(\text{N-H})$ op
3722 s	$\nu(\text{N-H}_2)$ asym.	39	3599 s	$\nu(\text{N-H}_2)$ sym. ip + $\nu(\text{N-H})$ ip
		40	3712 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ asym.
		41	3712 s	$\nu(\text{N-H}_2)$ asym.
		42	3724 m	$\nu(\text{N-H}_2)$ asym.

Intenzita: s - silná (35-100%), m - střední (10-35%), w - slabá (3-10%), vw - velmi slabá (1-3%), \emptyset - nepozorované; γ - mimorovinná, δ - deformace, ν - valenční; sym. - symetrická, asym. - asymetrická; ip - ve fázi, op - mimo fázi; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)



Obrázek 5.34: Nasimulovaná Ramanova spektra neutrální a jednou protonované molekuly melaminu; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda); značení pásů odpovídá *Tabulce 5.3*

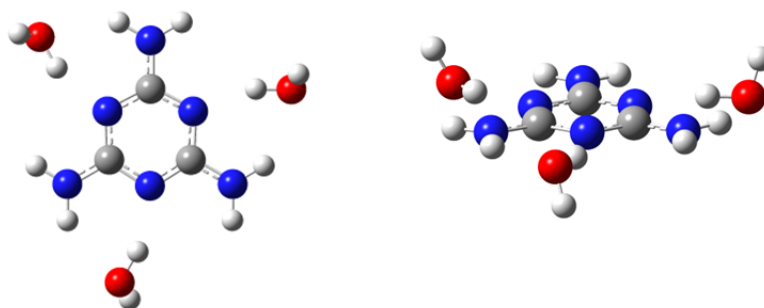
Neutrální molekula melaminu sice nemá trojčetnou osu symetrie (kvůli neplanaritě aminových skupin – viz *Sekce 5.5.1*), ale blíží se k ní. Z tohoto důvodu jsou vibrace stejného typu často pohromadě a tvoří jednu kombinaci ve fázi a dvě mimo fázi, jak si je možné všimnout na několika místech v *Tabulce 5.3*. S touto vysokou symetrií neutrálního melaminu souvisí i neaktivita mnoha vibrací v Ramanově spektru. V případě protonovaného melaminu je situace jiná – sekundární aminová skupina narušuje trojčetnou symetrii a navíc molekula není ani přísně planární (viz *Sekce 5.5.1*). Díky tomu je většina vibrací v Ramanově spektru aktivních.

Hlavní rozdíly mezi spektry obou forem jsou koncentrované do oblasti 1300-1600 cm^{-1} , obsahující pásy odpovídající převážně valenčním C-N vibracím heterocyklu a nůžkovým vibracím N-H₂ skupin (a v případě protonované formy i kývavé vibraci N-H skupiny), a poté do oblasti nízkofrekvenčních vibrací pod 300 cm^{-1} , která obsahuje silné pásy odpovídající vějířovým vibracím celých aminových skupin. Všechny vibrace, které zahrnují pohyby aminových skupin, jsou však velmi citlivé na své okolí, a tedy interakce s rozpouštědlem i případně dalšími molekulami melaminu prostřednictvím vodíkových můstků. Vodíkové vazby mají velmi významný vliv i na tvar pásů v N-H valenční oblasti. V porovnání s experimentem jsou poměrně dobře vystihnuty intenzity a polohy pásů 7-20. Nabízí se otázka, jak vylepšit shodu vypočítaných spekter s experimentem. K tomu jsme zkusili přistoupit třemi různými způsoby – zahrnutím vlivu explicitní solvatace, uvažováním možnosti aglomerace ve větší „mery“ a zhodnocením vlivu jiné úrovně výpočtu.

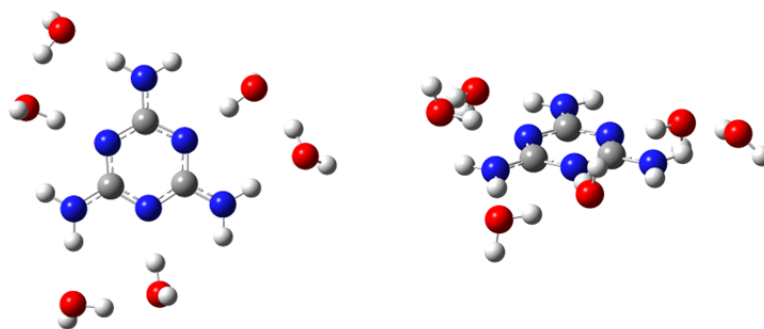
5.5.3 Vliv hybridní solvatace na Ramanova spektra monomeru melaminu

Vliv explicitní solvatace na vypočítané frekvence a intenzity Ramanova rozptylu melaminu byl zkoumán na třech modelech. K molekule melaminu jsme přidali tři, šest a nakonec devět molekul vody z první hydratační sféry, tedy molekuly vody, které se přímo účastní vodíkových vazeb na rozpuštěnec. Byly uvažovány ve formě donoru (vazba na volné elektronové páry dusíku v heterocyklu) i akceptoru (vazba na vodíky aminových skupin) (viz *Obrázek 5.35*).

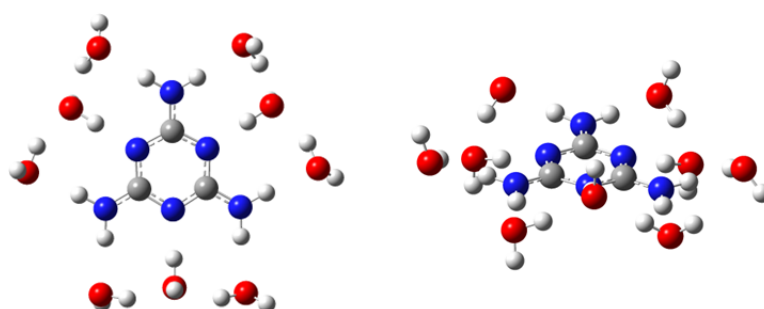
a) 3x H₂O



b) 6x H₂O



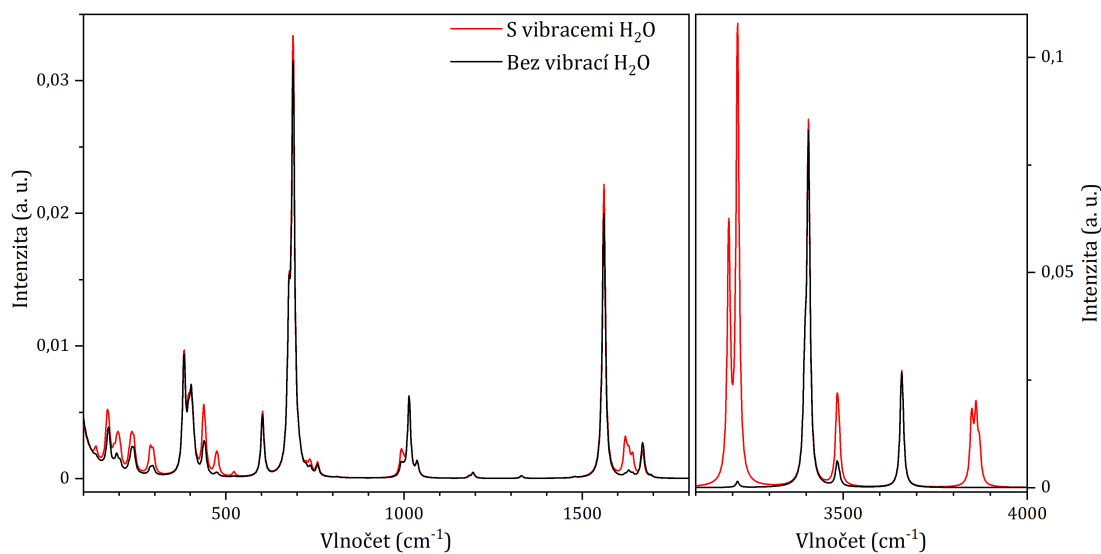
c) 9x H₂O



Obrázek 5.35: Uspořádání neutrální molekuly melaminu a molekul H₂O použité při simulování Ramanova spektra; vlevo pohled shora, vpravo pohled ze strany

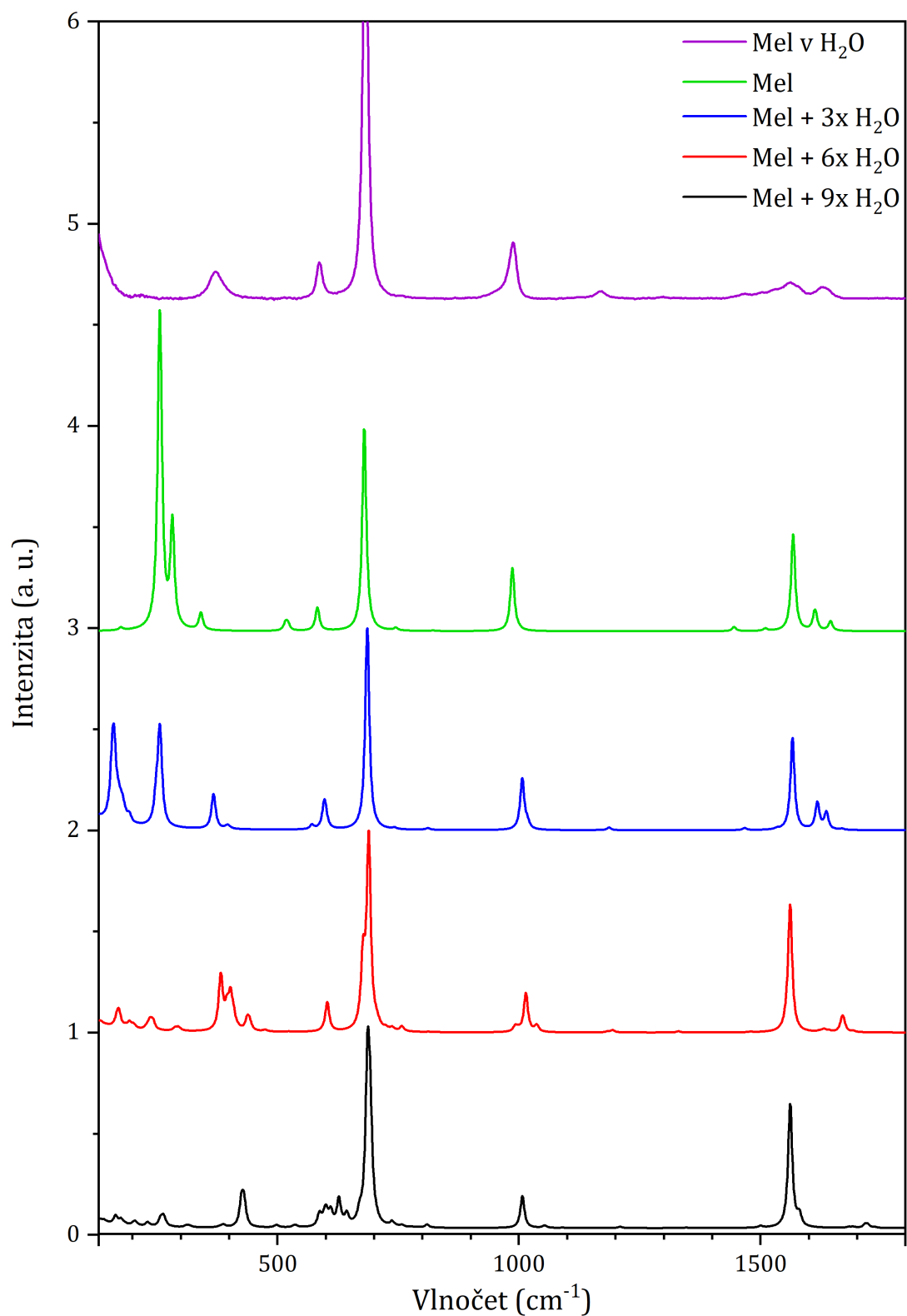
Optimalizace struktur, výpočet frekvencí a intenzit probíhal včetně těchto explicitních vod. Výsledná spektra obsahují kromě vibrací samotného melaminu i vibrace vody, které je ale možné odstranit (zanedbání na úrovni polarizabilit).

Jaký to má vliv na samotné spektrum je ukázáno na *Obrázku 5.36*.



Obrázek 5.36: Nasimulované Ramanovo spektrum neutrální molekuly melaminu a šesti molekul H₂O: s ponechanými vibracemi vody a bez vibrací vody; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

Vypočítaná Ramanova spektra monomeru melaminu pro explicitní solvataci 0, 3, 6 a 9 molekulami vody byla normována na dýchací vibraci nacházející se kolem 680 cm⁻¹ a porovnána s experimentálně získaným, taktéž normovaným, avšak dvakrát zvětšeným, spektrem melaminu ve vodě (viz *Obrázek 5.37*).



Obrázek 5.37: Nasimulovaná Ramanova spektra neutrální molekuly melaminu v přítomnosti různého počtu molekul vody a experimentálně získané spektrum z roztoku v H₂O při koncentraci 2,25 mg/ml - 2x zvětšeno; úroveň výpočtu v případě 0, 3 a 6 molekul H₂O B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda), v případě 9 molekul H₂O B3LYP/6-31+G*, cpcm(voda)

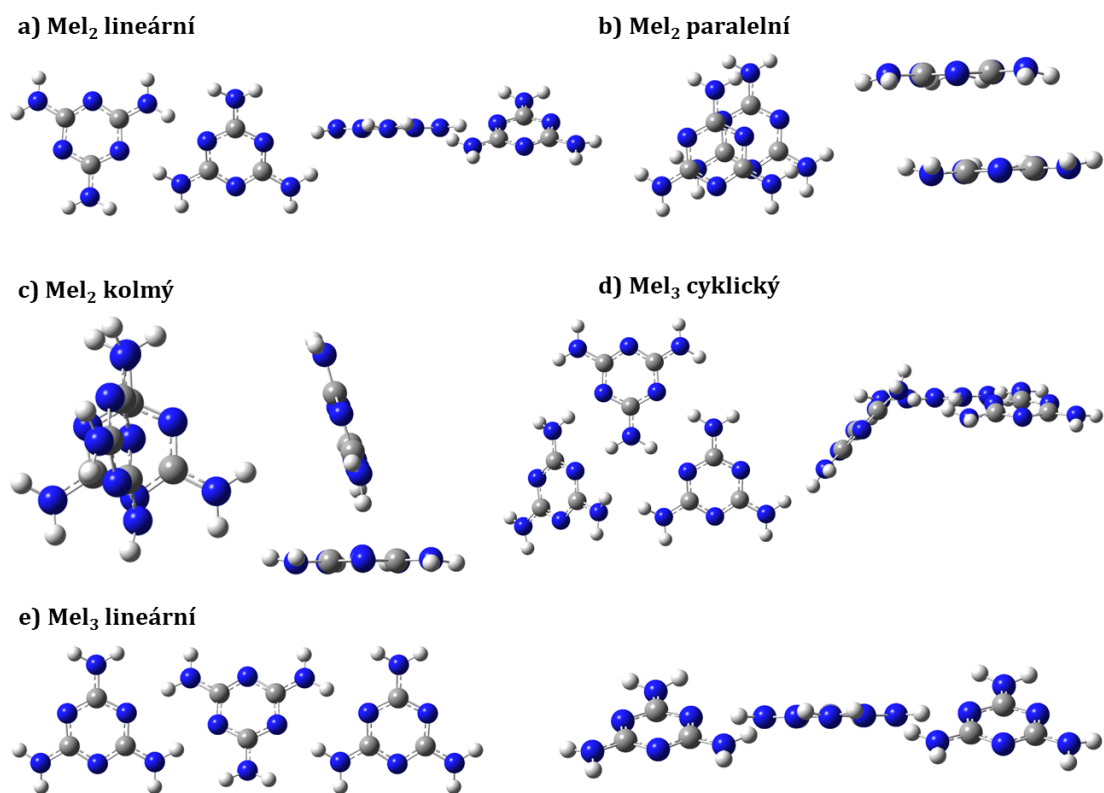
Se vzrůstající explicitní solvatací lze ve vypočítaných spektrech vysledovat čtyři hlavní trendy:

1. Výrazně se vylepšuje shoda s experimentálně získaným spektrem v nízkofrekvenční oblasti. V případě nula a tří molekul explicitní vody je možné vidět v nízkofrekvenční oblasti spektra silné Ramanovské pásy odpovídající mimorovinným vibracím celých aminových skupin vůči rovině centrálního heterocyklu. Při solvataci šesti a devíti explicitními vodami již tyto pásy ztrácejí intenzitu a vypočítaná spektra se více podobají experimentálnímu – zůstane zde pouze jeden dominantní pás na přibližně 350 cm^{-1} .
2. Solvatace má malý až zanedbatelný vliv na frekvenci vibrací mezi přibližně $500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$.
3. Roste poměr intenzity pásu dýchací vibrace (682 cm^{-1} v experimentu) a pásu rovinné deformační vibrace melaminového kruhu (988 cm^{-1} v experimentu). Tento poměr je v pořadí 0:3:6:9 vod roven přibližně 3:4:5:6. V experimentu je tento poměr roven 7.
4. Velmi málo se mění profil spektrální oblasti $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$. Profil pásu na přibližně 1550 cm^{-1} (ve výpočtu) zůstává prakticky identický.

Explicitní solvatace má tedy významný vliv na Ramanova spektra, a to především na nízkofrekvenční oblast. Profil v oblasti $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ se ale téměř nemění – uplatňuje se zde pravděpodobně jiný efekt.

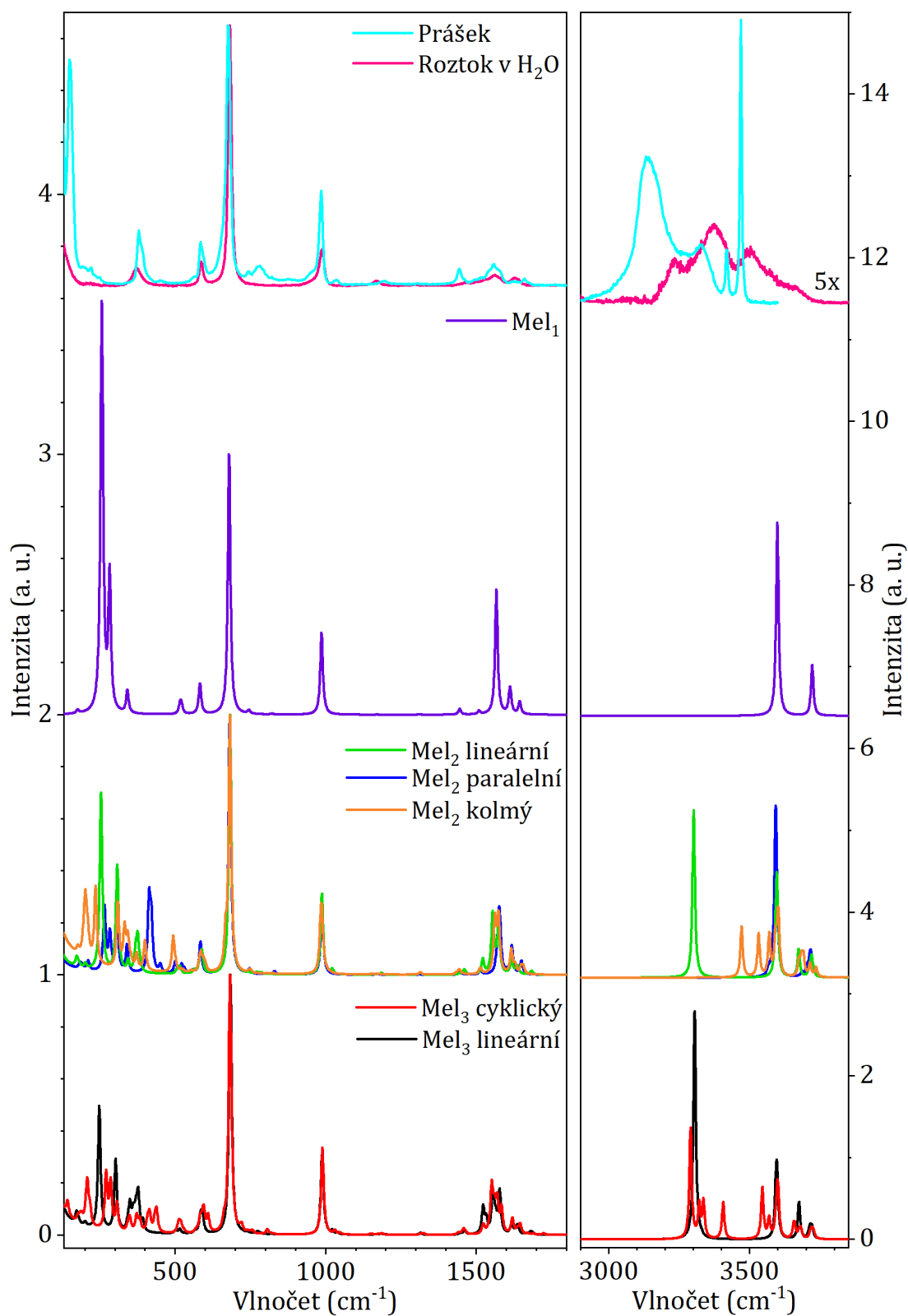
5.5.4 Vliv aglomerace na spektrum melaminu

Kromě solvatace může mít na spektrum melaminu velký vliv asociace jednotlivých molekul melaminu a tvorba klastrů provázaných vodíkovými můstky mezi aminovými skupinami a heterocyklickými dusíky. Na *Obrázku 5.38* jsou znázorněna vybraná uspořádání melaminu do formy dimeru a trimeru. Pro dimer byla uvažována lineární struktura stabilizovaná dvěma vodíkovými můstky, paralelní struktura držící pohromadě díky stohovací interakci (stacking) a kolmá struktura, která je stabilizovaná dvěma vodíkovými můstky ne zcela běžné orientace. V případě trimeru je ukázána jedna lineární a jedna cyklická struktura.



Obrázek 5.38: Uspořádání neutrálních molekul melaminu použité při simulování Ramanova spektra; vlevo pohled shora, vpravo pohled ze strany

Nasimulovaná spektra těchto struktur byla porovnána s experimentálně získanými spektry z měření polykrystalického melaminu a roztoku v H_2O (viz *Obrázek 5.39*), všechna spektra byla normována na dýchací vibraci nacházející se kolem 680 cm^{-1} .



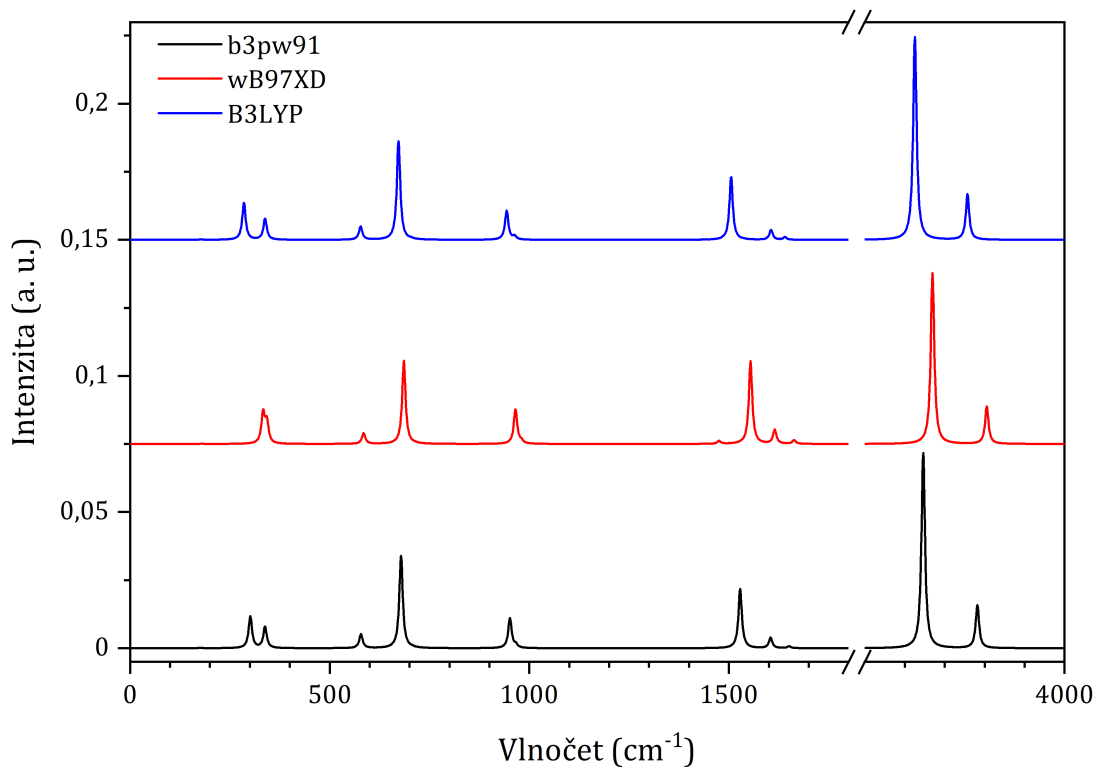
Obrázek 5.39: Nasimulovaná Ramanova spektra různých klastrů neutrálních molekul melaminu a experimentálně získaná spektra z roztoku v H₂O při koncentraci 2,25 mg/ml a z měření polykrystalického vzorku; vysokofrekvenční oblast experimentálních spekter 5x zvětšena; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

Podobně jako v případě solvatace je možné vliv aglomerace na simulovaná Ramanova spektra rozdělit do několika spektrálních oblastí:

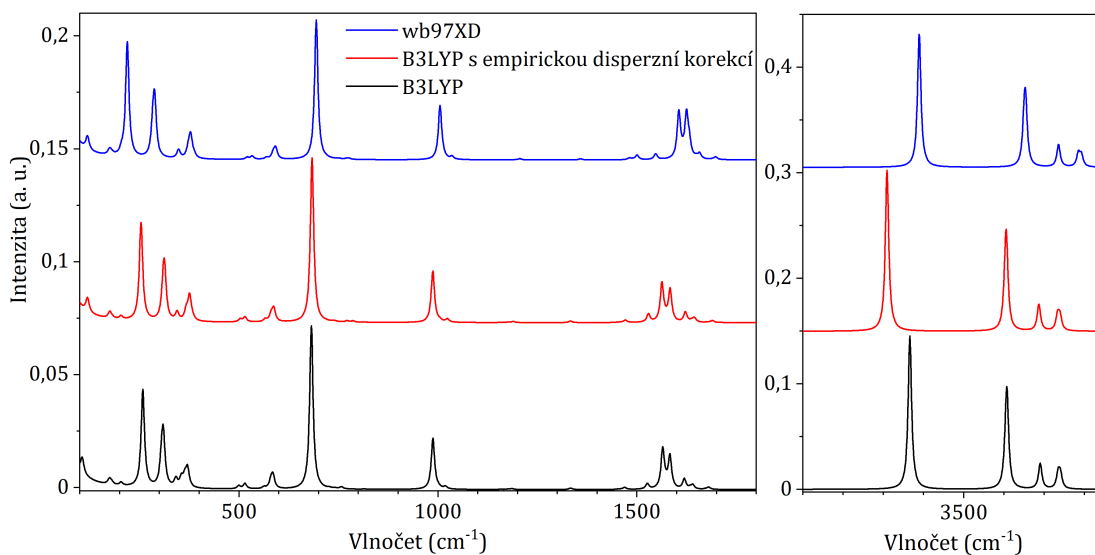
1. 550-1300 cm^{-1} : Pásky v této oblasti zůstávají prakticky neměnné a jejich intenzita ani frekvence nezávisí na stupni aglomerace melaminu. Jedná se především o pás dýchací vibrace na přibližně 680 cm^{-1} , pás odpovídající rovinné deformaci kruhu na přibližně 585 cm^{-1} a pás rovinné deformace úhlu N-C-N uvnitř heretocyklu na cca 985 cm^{-1} , které také dobře odpovídají experimentálnímu spektru.
2. 1400-1700 cm^{-1} : V této oblasti dochází s přibývajícím počtem molekul melaminu k rozštěpení pásů (monomeru) na strukturu více připomínající naměřený profil této oblasti - největší podobnost se spektrem naměřeným v roztoku vody je možné pozorovat nejspíše v případě Mel_3 lineárního klastru (pro detailnější pohled na experimentální spektrum viz *Obrázek 5.8*).
3. 2800-4000 cm^{-1} : Zde má vytváření aglomerátů velký vliv na finální profil Ramanova spektra. Zatímco u monomeru a paralelní varianty dimeru jsou vidět pouze dva pásy odpovídající asymetrickým a symetrickým valenčním vibracím vodíků na primárních aminových skupinách, jakmile dojde k vytvoření vodíkových vazeb mezi molekulami melaminu, každý z těchto pásů se rozštěpí. Ty z vodíků, které se účastní vodíkových vazeb, mají nyní vlnčet valenční vibrace posunutý k nižším hodnotám. Výsledný tvar spektra se dvěma širšími a dvěma užšími pásy dobře vystihuje experimentální spektra.
4. 0-500 cm^{-1} : V této oblasti je možné pozorovat největší odlišnosti mezi experimentálními a vypočítanými spektry. Celkový tvar oblasti se zlepšuje na škále monomer – dimer – trimer, ale i pro největší modely zůstává poměrně špatně reprodukován pod přibližně 300 cm^{-1} . Výrazný pás v experimentálním spektru nacházející se přibližně na 370 cm^{-1} ale začíná být více zřetelný pro lineární variantu dimeru i trimeru.

5.5.5 Vliv volby funkcionálu

Zajímala nás i závislost tvaru spektra na zvoleném funkcionálu. Při volbě báze 6-311++G(3d2f,3p2d) byly proto vyzkoušeny tři různé funkcionály – klasický B3LYP, jemu příbuzný b3pw91, který trochu odlišně započítává příspěvek korelační energie, a funkcionál wB97XD, který by měl lépe zahrnovat vliv disperzních sil a vodíkových můstků. Porovnání vypočítaných Ramanových spekter s těmito funkcionály je vidět na *Obrázku 5.40*. Jednotlivé funkcionály se trochu liší v poloze (vlnčtu) jednotlivých vibračních módů, celkový tvar spektra je ale shodný. Jediná větší odlišnost je ve dvojici pásů mezi 300–400 cm^{-1} , které jsou u funkcionálů B3LYP a b3pw91 dobře oddělené, ale na základě výpočtu s funkcionálem wB97XD téměř splývají. Podobné srovnání bylo provedeno ještě pro spektra dimeru neutrální formy melaminu (viz *Obrázek 5.41*). Zde je zřejmé, že všechny funkcionály poskytují srovnatelné výsledky, frekvence vypočítaných pásů ale o něco lépe odpovídají experimentu pro funkcionál B3LYP. Naše volba provádět většinu výpočtů pomocí tohoto funkcionálu se tak ukázala jako dobrá.



Obrázek 5.40: Nasimulovaná Ramanova neutrální spektra molekuly melaminu při užití různých funkcionálů, úroveň výpočtů 6-311++G(3d2f,3p2d), cpcm(voda)



Obrázek 5.41: Nasimulovaná Ramanova spektra Mel₂ při užití různých funkcionálů; úroveň výpočtů 6-31++G**, cpcm(voda)

5.5.6 Přiřazení vibrací experimentálním pásům melaminu

Na základě předchozích tří podkapitol můžeme vyvodit, že pro získání co nejlepší shody mezi simulacemi a experimentem je třeba do výpočtů zahrnout jak

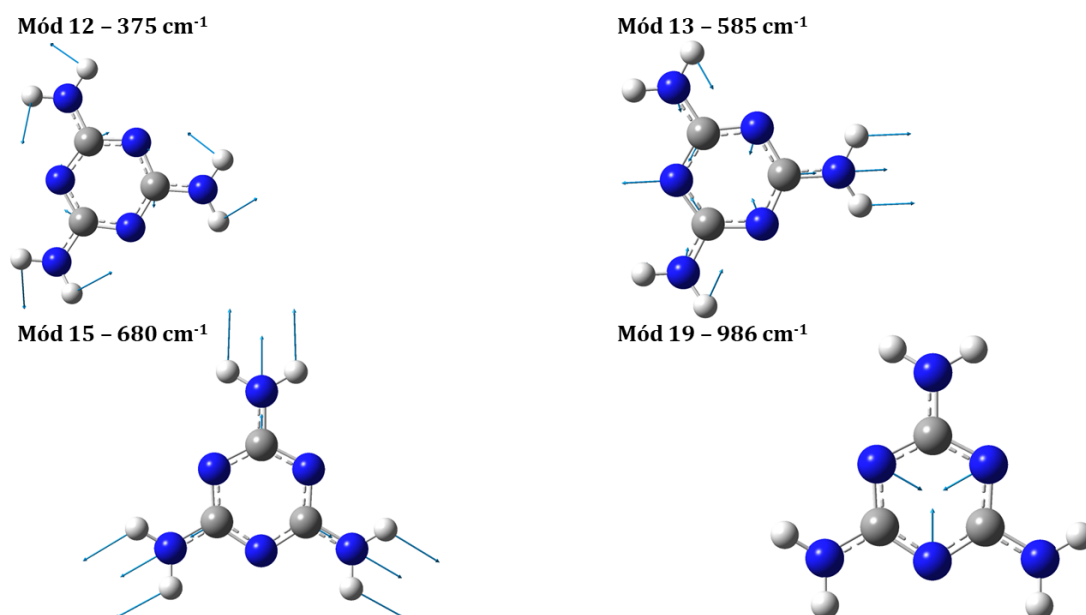
několik explicitních molekul vody, tak aglomerační procesy. Pro dobrou shodu v oblasti pod 500 cm^{-1} je stěžejní solvatace, aglomerace má nižší, i když stále významný efekt. Oblast charakteristických vibrací mezi $500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ je na solvataci i aglomeraci málo citlivá, a pásy v této oblasti tak mohou s výhodou sloužit jako markery přítomnosti melaminu. Pro korektní tvar oblasti $1400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ má hlavní vliv zahrnutí aglomerace, která způsobí rozštěpení a změnu intenzity původně úzkých pásů monomeru. Solvatace má v této oblasti malý efekt. V oblasti N-H valenčních vibrací se uplatňují jak solvatační, tak aglomerační efekty. Vliv aglomerace je velmi dobře viditelný především při porovnání s práškovým vzorkem. Na kombinované výpočty – aglomeráty s explicitní solvatací – nám již v průběhu řešení bakalářské práce nezbyl čas. V *Tabulce 5.4* jsou uvedeny vlnočty odpovídající hlavním experimentálně pozorovatelným pásům melaminu a jejich přiřazení na základě *Tabulky 5.3* a spekter ze *Sekce 5.5.3* a *Sekce 5.5.4*.

Až na oblast nejnižších vlnočtů (pod 200 cm^{-1}), která obsahuje pásy odpovídající vibracím, kdy se vzájemně pohybují celé molekuly melaminu (v agregátech), se nám podařilo přiřadit všechny experimentální pásy konkrétním vibračním pohybům. Nejcharakterističtější vibrační módy, které téměř nemění svou polohu a intenzitu v experimentu nezávisle na fázi a nejsou ovlivněny kvalitou solvatačního modelu a mírou agregace ve výpočtu, jsou ukázány na *Obrázku 5.42*. Domníváme se, že tyto 4 pásy představují velmi vhodné Ramanovské markery melaminu.

Tabulka 5.4: Přiřazení vibračních pásů melaminu pozorovaných v experimentálním Ramanově spektru: z prášku, z roztoku v H₂O o koncentraci 2,25 mg/ml a z roztoku v DMSO o koncentraci 20,15 mg/ml

Prášek	H ₂ O	DMSO	Vibrace
Vlnočty (cm ⁻¹)			
90	-	-	kolektivní vibrace celých molekul
100	-	-	kolektivní vibrace celých molekul
125	122	126	kolektivní vibrace celých molekul
150	-	-	kolektivní vibrace celých molekul
195	-	197	γ (C-N-C-NH ₂) op
220	220	225	δ (NH ₂) vějířová ip
378	373	-	δ (N-C-NH ₂) ip
391	-	-	δ (NH ₂) kroutivá ip
451	-	-	δ (NH ₂) kroutivá op
563	-	-	δ (N-C-NH ₂) ip
585	587	579	δ (CNCN)
677	682	-	δ (CNCNCN) dýchací
745	759	758	γ (CN ₃) op
780	-	-	δ (NH ₂) kroutivá, H-provázané
822	-	823	γ (CN ₃) ip
950	950	953	δ (NCN) v cyklu op
985	988	976	δ (NCN) v cyklu ip
1036	-	-	δ (N-C-NH ₂) + δ (NH ₂) kývavá
1194	1168	1170	δ (N-C-NH ₂) + δ (NH ₂) kývavá
-	1298	-	ν (C-N) v cyklu + δ (NH ₂) kývavá
1444	-	-	ν (C-NH ₂) op
1463	1466	1457	ν (C-NH ₂) op
1496	1503	1516	ν (C-NH ₂) ip + δ (N-H ₂) nůžková
1520	1528	-	ν (C-NH ₂) ip + δ (N-H ₂) nůžková
1543	-	1547	ν (C-N) v cyklu
1558	1560	1566	ν (C-N) v cyklu
1578	1578	-	ν (C-N) v cyklu
1620	1628	1624	δ (N-H ₂) nůžková op + ν (C-NH ₂) ip
1639	1642	1637	δ (N-H ₂) nůžková op + ν (C-NH ₂) ip
1660	1660	1660	δ (N-H ₂) nůžková ip + ν (C-NH ₂) ip
3137	3232	3216	ν (N-H ₂) sym., N-H...N vazba
3263	3318	3291	ν (N-H ₂) asym., N-H...N vazba
3330	3373	3335	ν (N-H ₂) asym., N-H...N vazba
3418	3498	3422	ν (N-H ₂) sym., volné
3469	3655	3490	ν (N-H ₂) asym., volné

- neměřeno či nepozorováno; γ - mimorovinná, δ - deformace, ν - valenční; sym. - symetrická, asym. - asymetrická; ip - ve fázi, op - mimo fázi; šedá barva značí nejvýraznější pásy ve spektrech



Obrázek 5.42: Nejvýznačnější vibrace neutrální molekuly melaminu

5.5.7 Nasimulovaná spektra možných zdegradovaných forem melaminu

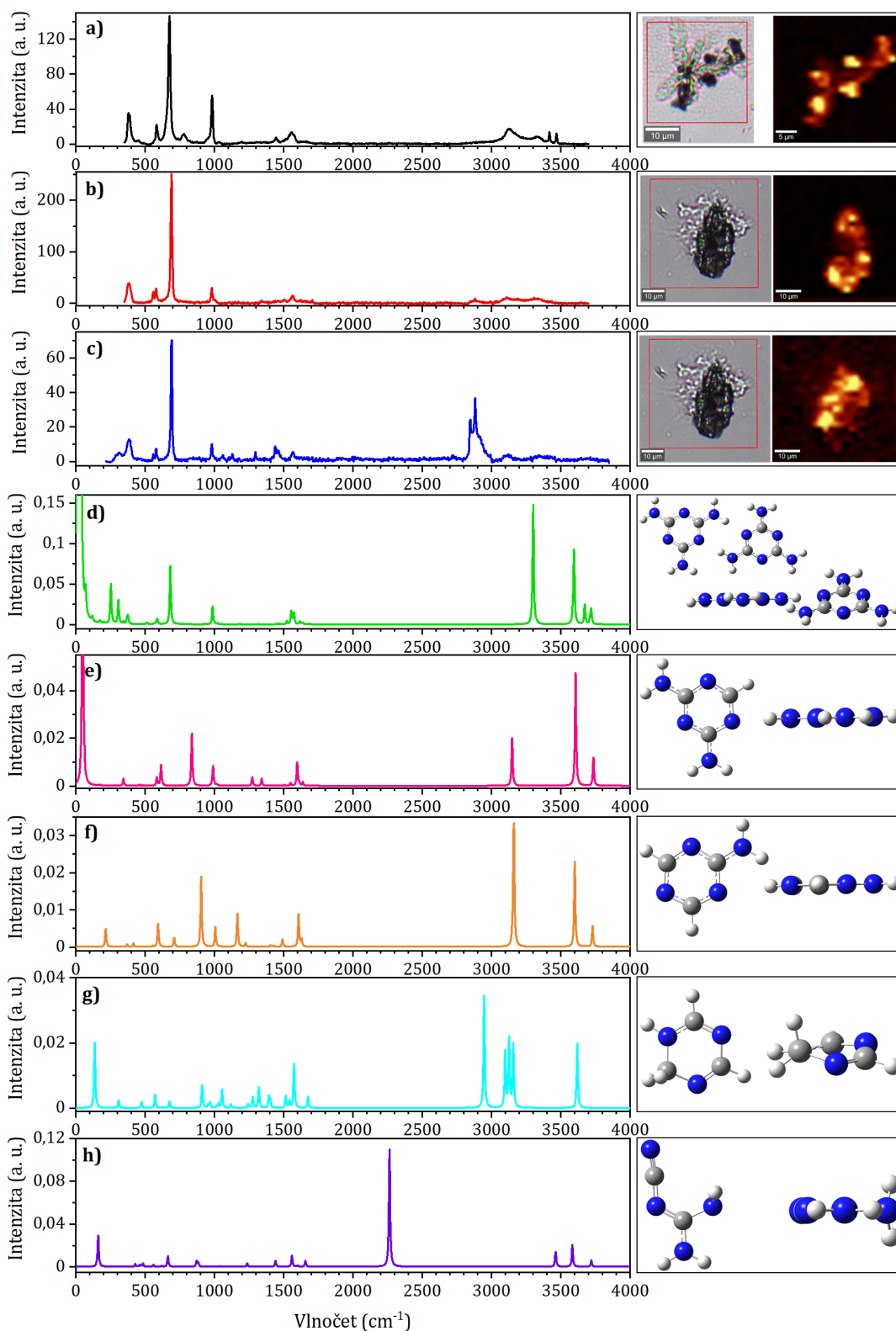
Za účelem vysvětlení nově vzniklých pásů pozorovaných při DCDR měření převážně kolem oblasti 2900 cm^{-1} (viz *Obrázek 5.18*) byly optimalizovány čtyři struktury odpovídající teoreticky možným rozpadům molekuly melaminu (Trasobares a kol., 2003) a vypočtena jejich Ramanova spektra (viz *Obrázek 5.43*).

U první a druhé struktury dochází k odtržení jedné aminové skupiny, resp. dvou aminových skupin, a navázání vodíků na příslušný uhlík, resp. vodíků na uhlíky. V případě třetí struktury (**g**) již dochází k odtržení všech tří aminových skupin a narušení aromatického charakteru heterocyklu nasycením jedné z vazeb, a u čtvrté struktury (**h**) dokonce k rozpojení původně melaminového cyklu.

Při porovnání experimentálních spekter na *Obrázku 5.43* je zřejmé, že zatímco na panelu (**a**) není patrná žádná degradace, na panelu (**b**) již je nějaký náznak zvýšení signálu v oblasti $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Na panelu (**c**) je pak experimentální spektrum vykazující vysokou míru degradace – kromě silného signálu v oblasti $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, polohou odpovídající C-H valenčním vibracím, je možné pozorovat i více bohatější pásovou strukturu v oblasti $1000\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$. Na dalších panelech jsou porovnávána vypočítaná spektra možných zdegradovaných struktur (**e**) – (**h**) se spektrem lineární varianty melaminového dimeru, která dobře vystihuje experimentální Ramanův profil. Při odtržení jedné či dvou aminových skupin je hlavní spektrální změnou nový pás C-H valenčních vibrací přibližně na 3150 cm^{-1} , tj. o přibližně 150 cm^{-1} níže než pásy N-H vibrací v případě dimeru. V oblasti „otisku prstu“ je patrný pokles signálu dýchací vibrace původně přibližně na 690 cm^{-1} a nárůst intenzity pásů v oblasti mezi $1050\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$. Při kompletním nahrazení primárních aminů vodíky a ztrátě aromaticity kruhu (panel **g**) jsou již spektrální změny velmi výrazné – C-H oblast je velmi bohatá a široká a oblast „otisku prstu“ obsahuje velmi mnoho vibračních pásů v oblasti $1000\text{--}1700$

cm^{-1} . Roztržení kruhu a přítomnost nitrilové skupiny (panel **h**) se spektrálně projeví silným pásem na 2265 cm^{-1} , který však v experimentu pozorován nebyl.

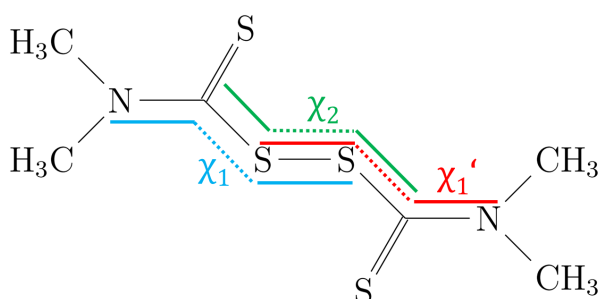
Je tedy pravděpodobné, že pozorovaný nárůst signálu C-H valenčních vibrací ($2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$) a změna charakteru signálu v oblasti $1000\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ souvisí s deaminací melaminu a případně i s (částečným) nasycením jeho aromatického kruhu.



Obrázek 5.43: Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H_2O o koncentraci $0,01 \text{ mg/ml}$ ($0,08 \text{ mM}$): **a**), resp. **b**), filtr o šířce 80 cm^{-1} na pozici 677 , resp. $692, \text{ cm}^{-1}$, **c**) filtr o šířce 200 cm^{-1} na pozici 2900 cm^{-1} ; obrázek vlevo zobrazuje měřenou oblast, vpravo v nepravých barvách intenzitu signálu; nasimulovaná Ramanova spektra: **d**) Mel_2 lineární, **e**), **f**), **g**), **h**) zdegradované struktury; obrázek vlevo pohled shora, vpravo ze strany; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

5.6 Výpočet Ramanova spektra molekuly thiramu

Výsledky experimentálních měření ukázaly, že thiram není citlivý na solvataci a nezdá se, že by agregoval. To značně zjednodušuje výchozí situaci pro simulace jeho Ramanova spektra. Na rozdíl od melaminu se však jedná o molekulu s určitou konformační volností, s níž je potřeba se v simulacích vypořádat. Molekula thiramu je tvořena dvěma diamino-dithiokarbamátovými skupinami, které jsou spojené disulfidickou (S-S) vazbou. Každá z těchto skupin je kvůli rezonanci (podobně jako peptidová skupina) planární, ale kvůli jejich propojení jsou zde tři dihedrální úhly, které mohou nabývat různých hodnot – χ_1 (N-C-S-S), χ_2 (C-S-S-C) a χ_1' (S-S-C-N) (viz *Obrázek 5.44*).

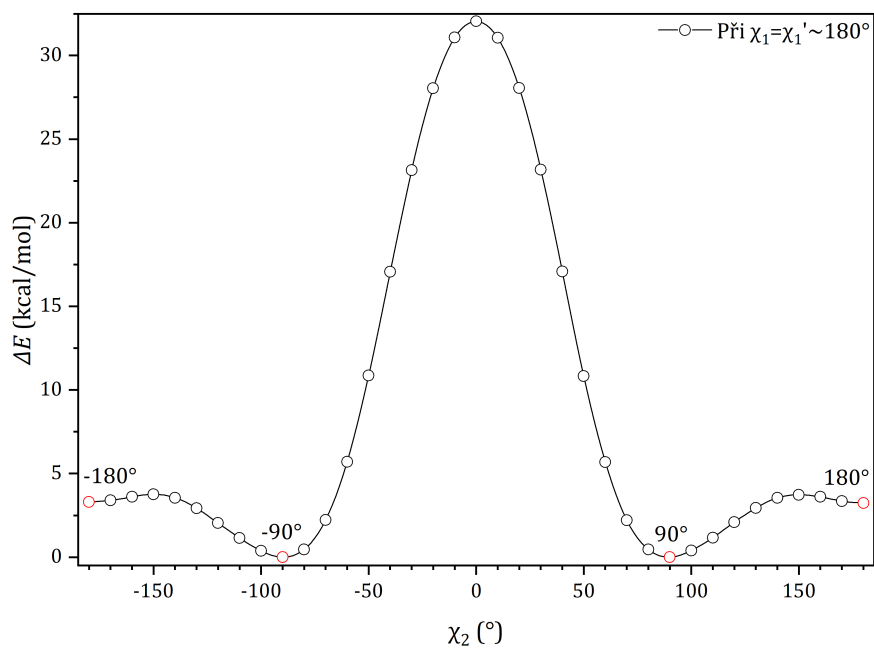


Obrázek 5.44: Dihedrání úhly χ_1 , χ_2 , χ_1' molekuly thiramu

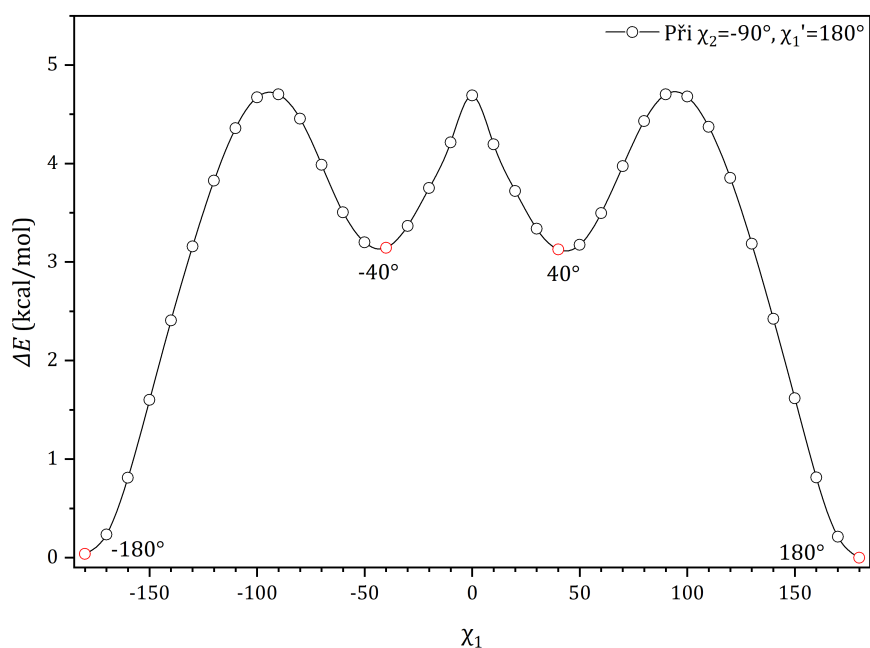
5.6.1 Konformační sken molekuly thiramu

Konformační prostor úhlů χ_1 a χ_1' je kvůli symetrii molekuly thiramu stejný, preference úhlu χ_2 však budou odlišné. Odhad konformačních preferencí jednotlivých úhlů může být proveden pomocí jednodimenzionálních (1D) skenů povrchu potenciální energie molekuly podél zvolené souřadnice – v našem případě dihedrálního úhlu.

Prvotní optimalizace struktury thiramu vedla k „natažené“ struktuře s hodnotami úhlů (χ_1 , χ_2 , χ_1') \sim (180°, -90°, 180°). 1D sken dihedrálního úhlu χ_2 při $\chi_1 = \chi_1' \sim 180$ odhalil ještě další dvě minima na +90° a 180° (viz *Obrázek 5.45*). 1D sken torzního úhlu χ_1 při $\chi_2 = -90^\circ$ a $\chi_1' = 180^\circ$ taktéž identifikoval další dvě minima na cca +40° a -40° (viz *Obrázek 5.46*).



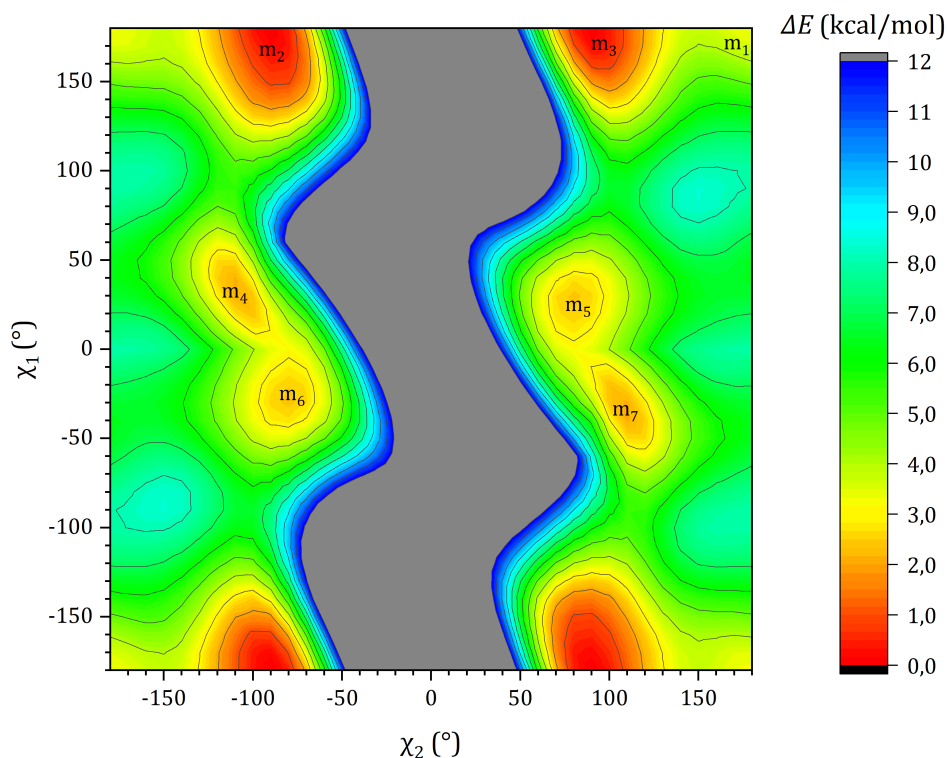
Obrázek 5.45: 1D sken dihedrálního úhlu χ_2 molekuly thiram; ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií; červeně označena minima; úroveň výpočtů B3LYP/6-31+G*, iefpcm(chloroform)



Obrázek 5.46: 1D sken dihedrálního úhlu χ_1 molekuly thiram; ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií; červeně označena minima; úroveň výpočtů B3LYP/6-31+G*, iefpcm(chloroform)

Abychom vzali v úvahu vzájemné ovlivnění konformačních preferencí úhlů χ_1 a χ_2 , provedli jsme také dvoudimenzionální (2D) sken, který odhalil, že při $\chi_1' \sim 180^\circ$ existuje sedm lokálních energetických minim $(\chi_1, \chi_2) \in \{(180^\circ, 180^\circ),$

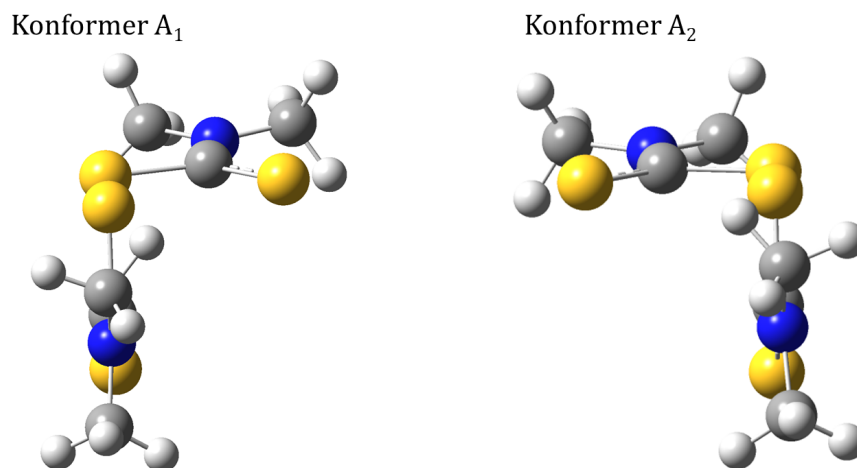
$(180^\circ, -90^\circ)$, $(180^\circ, 90^\circ)$, $(32^\circ, -108^\circ)$, $(28^\circ, 80^\circ)$, $(-28^\circ, -80^\circ)$, $(-32^\circ, 108^\circ)$ (viz Obrázek 5.47).



Obrázek 5.47: 2D sken dihedrálních úhlů χ_1 a χ_2 molekuly thiramu; ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií; m značí minima; úroveň výpočtů B3LYP/6-31+G*, iefpcm(chloroform)

Preference jednotlivých dihedrálních úhlů jsou tedy přibližně -90° , 90° a 180° pro χ_2 a přibližně 180° , -40° a 40° pro χ_1 a χ_1' . Z tohoto důvodu bylo připraveno 27 konformerů pokrývajících všechny možné kombinace těchto úhlů a provedena optimalizace jejich geometrie na vyšší úrovni teorie - B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda).

Po optimalizaci bylo získáno 11 unikátních struktur – pět dvojic, které se vzájemně liší pouze absolutní konfigurací (chiralitou, jedná se o enantiomery) (viz Obrázek 5.48 pro příklad chirálních konformerů označených A_1 a A_2), a jedna nechirální struktura. Ramanův rozptyl nedokáže rozlišit mezi enantiomerními strukturami, takže je možné enantiomery vzájemně sloučit a dále se omezit na šest struktur. Charakterizace 11 zoptimalizovaných struktur je shrnuta v Tabulce 5.5, kde je možné najít konečné hodnoty dihedrálních úhlů pro každou strukturu a její označení. Je zde využíváno konvence, kdy pro úhel χ_1 a χ_1' je používáno označení (t, g^+ , g^-) pro hodnoty úhlů přibližně $(180, +40, -40)$ a pro úhel χ_2 označení (t, d, g) pro hodnoty úhlů přibližně $(180, +90, -90)$.



Obrázek 5.48: Chirální konformery A₁ a A₂

Tabulka 5.5: Získané konformery molekuly thiramu

Konformer	χ_1	χ_2 (°)	χ'_1	Typ	Termodynamika				η			
					ΔE	ΔE_0	ΔH	ΔG	ΔE	ΔE_0	ΔH	ΔG
A ₁	177	91	177	tdt	0,00	0,00	0,00	0,00	80,8	87,2	83,1	95,7
A ₂	-177	-91	-177	tgt								
B ₁	28	81	170	g ⁺ dt	1,27	1,51	1,34	2,28	9,5	6,8	8,7	2,0
B ₂	-170	-81	-28	tgg ⁻								
C ₁	-31	108	179	g ⁻ dt	1,69	1,88	1,75	2,34	4,7	3,7	4,3	1,8
C ₂	-179	-108	31	tgg ⁺								
D ₁	38	80	39	g ⁺ dg ⁺	1,92	2,49	2,11	3,92	3,2	1,3	2,3	0,1
D ₂	-39	-80	-38	g ⁻ gg ⁻								
E ₁	32	100	-38	g ⁺ dg ⁻	2,35	2,82	2,51	4,28	1,5	0,7	1,2	0,1
E ₂	-32	-100	38	g ⁻ gg ⁺								
F	180	-180	180	ttt	3,28	3,27	3,24	3,67	0,3	0,3	0,3	0,2

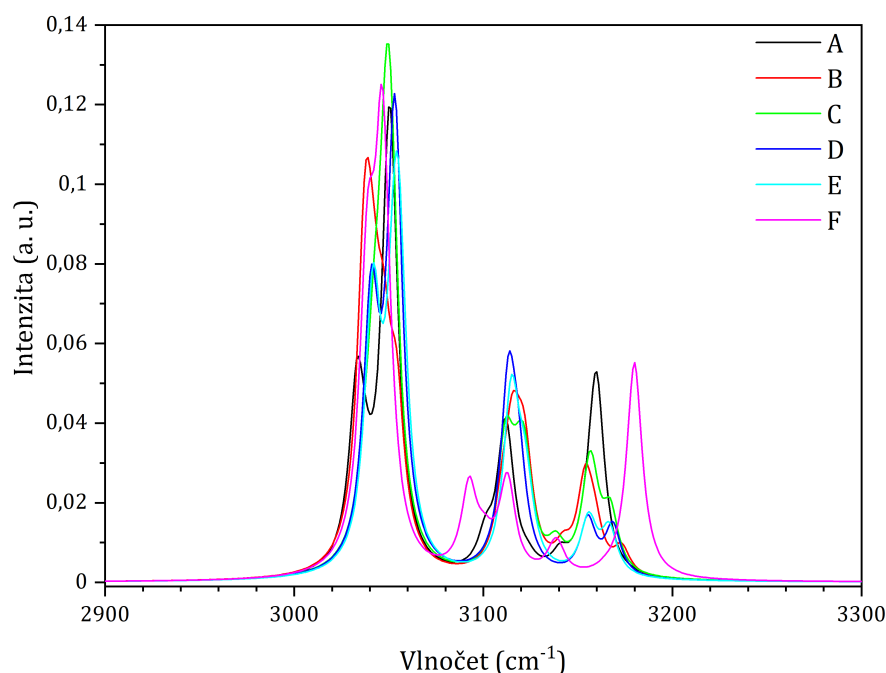
ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií
 ΔE_0 – rozdíl energie základního stavu ΔH – rozdíl entalpie, ΔG – rozdíl Gibbsovy energie, η – zastoupení konformerů vypočítané podle Boltzmannova rozdělení při 20°C, úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

Tabulka 5.5 kromě geometrické charakterizace jednotlivých konformerů obsahuje i vypočítané hodnoty jejich termodynamických parametrů (vztažené ke konformeru o nejnižší energii) a procentuální zastoupení jednotlivých konformerů vypočítané na základě Boltzmannova rozdělení při laboratorní teplotě 20°C. Podle typu použitého termodynamického potenciálu se pravděpodobnosti trochu liší, největší odchylku vidíme pro Gibbsovu energii. Ve všech případech však vychází konformer A mnohonásobně více pravděpodobnější než následující konformery.

Jednotlivé konformace thiramu se však neliší pouze energií, ale i svými spektry Ramanova rozptylu. Pro názornost je vhodné rozdělit oblast fundamentálních molekulárních vibrací na tři oblasti:

1. Oblast C-H valenčních vibrací (2900–3300 cm⁻¹):

Frekvence C-H valenčních vibrací methylových skupin je na celkové konformaci thiramu prakticky nezávislá (s výjimkou konformace F). I intenzita vibrací je pro všechny konformery srovnatelná (viz Obrázek 5.49).

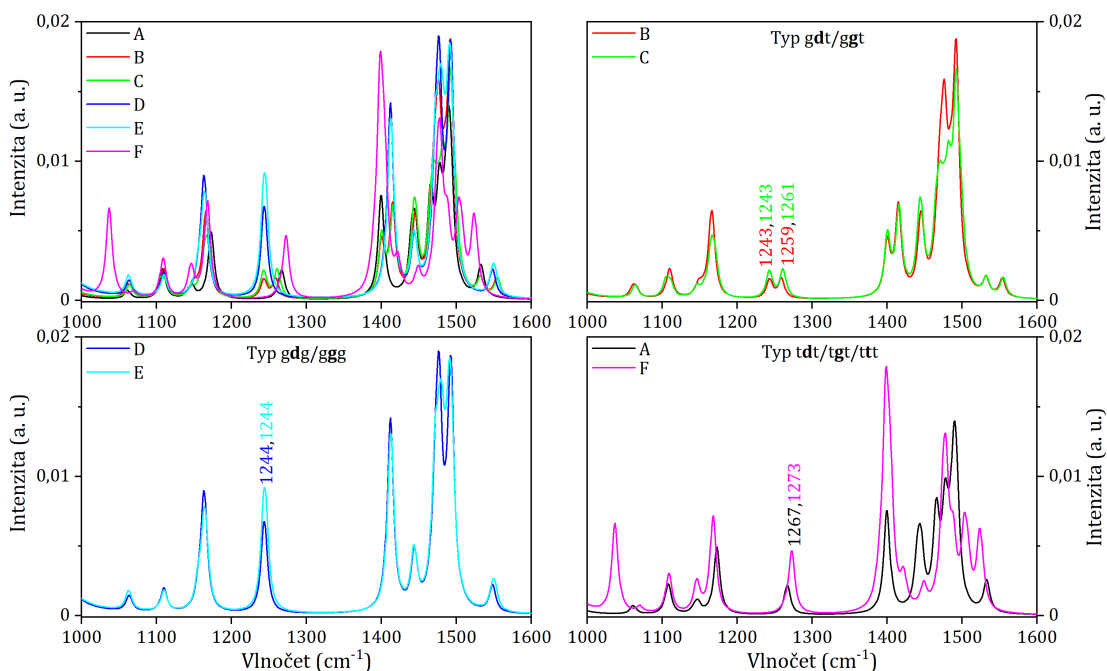


Obrázek 5.49: Ramanova spektra získaných konformerů molekuly thiramu v oblasti od 2900 do 3300 cm^{-1} ; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

2. Oblast C-H deformačních vibrací a thiokarbamátových vibrací (1000-1600 cm^{-1}):

V této oblasti již jsou patrné větší odchylky mezi spektry jednotlivých konformací, které mohou být rozděleny na tři skupiny podle míry „natažení“ (či naopak „sbalení“) celé molekuly thiram (viz *Obrázek 5.50*). První skupinu tvoří „natažené“ konformery A a F (tj. typy **tgt/tdt** a **ttt**), druhou „polosbalené“ konformery B a C (tj. typy **gdt/ggt**) a třetí „sbalené“ konformery D a E (tj. typy **ggg/gdg**). Spektra v první skupině se navzájem více liší, neboť je zde velká změna centrálního torzního úhlu, ale zbylé dvě dvojice spekter si velmi dobře odpovídají. Navíc se ukázalo, že je zde vibrační pás, jehož vlnově je velmi citlivý na konformaci úhlů χ_1 a χ'_1 . Pokud má alespoň jeden z těchto úhlů konformaci t, je vidět pás odpovídající vibračním módům 39 a 40 (viz *Tabulka 5.6*) na 1267 cm^{-1} (konformace A), 1273 cm^{-1} (konformace F) či přibližně 1260 cm^{-1} (konformace B a C). Naopak pokud má alespoň jeden z těchto dvou úhlů konformaci g, pozorujeme pás na přibližně 1243 cm^{-1} . Protože okolní pásy svůj vlnově v závislosti na konformaci thiram příliš nemění, je možné z relativních vzdáleností od nejbližších dvou pásů v experimentálním spektru odhadnout, jakou konformaci thiram skutečně preferuje. Variantu **tdg** či **tgg** je možné rovnou vyloučit, neboť v experimentu pozorujeme pouze jeden pás, nikoliv dvojici. Zbývá tak rozhodnout mezi variantou **ggg** (či **gdg**) a **tgt** (či **tdt**). Měření ve vodě poskytlo trojici pásů na 1155, 1249 a 1382 cm^{-1} , tj. vzdálenosti k nejbližším dvěma pásům 94 a 133 cm^{-1} . Ve výpočtu dostáváme pro konformaci **tgt** odpovídající pásy na 1172, 1266 a 1400 cm^{-1} , tj. vzdálenosti 94 a 134 cm^{-1} . Pro konformaci **ggg** vychází tyto vzdálenosti 81 a 168 cm^{-1} (pásy jsou na 1163, 1244 a 1412 cm^{-1}). Z tohoto porovnání tedy lze usuzovat, že

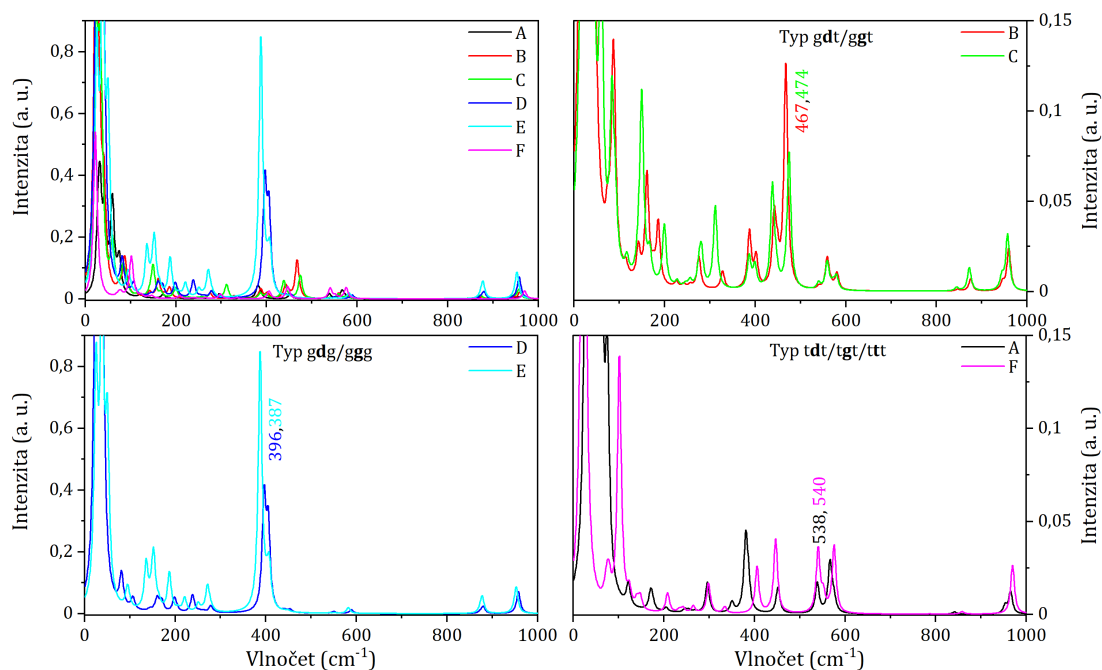
v experimentu je vidět konformace **tgt** (či **tdt**).



Obrázek 5.50: Ramanova spektra získaných konformerů molekuly thiramu v oblasti od 1000 do 1600 cm^{-1} ; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

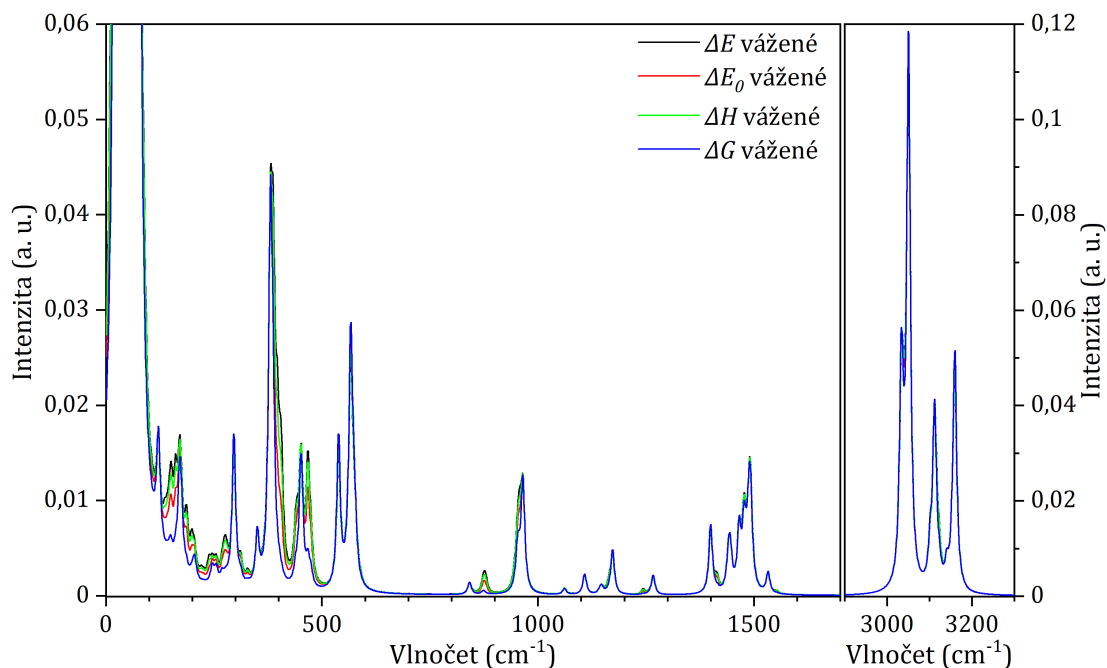
3. Oblast C-S a S-S valenčních a skeletálních vibrací (0-1000 cm^{-1}):

V této oblasti jsou rozdíly mezi spektry jednotlivých konformací nejvíce výrazné. Stejně jako v předešlé oblasti je ale můžeme rozdělit do tří dvojic („protažené“, „polosbalené“ a „sbalené“). Tyto skupiny se navzájem liší jak polohou vibračních pásů (frekvencí), tak jejich intenzitou (viz *Obrázek 5.51*). Nejvýraznější změnou je změna polohy S-S valenční vibrace: u „natažených“ konformerů A a F je na 538, resp. 540, cm^{-1} , u „polosbalených“ konformerů B a C má o něco vyšší intenzitu a je posunuta přibližně o 70 cm^{-1} k nižším vlnočtům na 467, resp. 474, cm^{-1} a u „sbalených“ konformerů D a E má velmi vysokou intenzitu (přibližně 5x vyšší než u A) a je posunuta o dalších přibližně 70 cm^{-1} k nižším vlnočtům na 396, resp. 387, cm^{-1} . V experimentu lze vidět S-S valenční vibraci thiramu na přibližně 564 cm^{-1} , což v souladu s vypočítaným procentuálním zastoupením konformerů v *Tabulce 5.5* ukazuje, že thiram preferuje konformaci A, tedy typ **tgt** či **tdt**. Všechny naše pozorování a analýzy tedy vedou ke stejným výsledkům.



Obrázek 5.51: Ramanova spektra získaných konformerů molekuly thiramu v oblasti od 0 do 1000 cm^{-1} ; grafy vpravo mají oproti grafům vlevo měřítko 6x menší; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

Na *Obrázku 5.52* je srovnání vážených spekter thiramu získaných na základě ΔE , ΔE_0 , ΔH a ΔG jednotlivých konformerů. Spektra jsou si velmi podobná kvůli naprosto převažujícímu příspěvku konformace A a není zde mnoho rozdílů, které by mohly ve srovnání s experimentálním spektrem naznačit, které vážení je nejvhodnější. Mezi vhodné kandidáty patří poměr intenzity pásů na 841 a 874 cm^{-1} , přítomnost pásu na 468 cm^{-1} či rozšíření pásu na 452 cm^{-1} a přítomnost pásu na 276 cm^{-1} . Ani jeden z těchto projevů však v experimentálních spektrech nepozorujeme (viz např. *Obrázek 5.11* nebo *Obrázek 5.30*). Vážení na základě Gibbsovy energie konformerů se tak zdá být nejpřesnější.



Obrázek 5.52: ΔE , ΔE_0 , ΔH a ΔG vážená Ramanova spektra molekuly thiramu; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)

5.6.2 Vibrační analýza thiramu a srovnání nasimulovaných a experimentálních spekter

Analýzou konformačního prostoru thiramu pomocí kvantově mechanických výpočtů bylo zjištěno, že při normálním tlaku a teplotě (20°C) mají nejvyšší pravděpodobnost výskytu (přibližně 90%) „natažené“ konformery *tgt* či *tdt* (A1 a A2). Na základě zoptimalizované struktury těchto konformerů byla provedena detailní analýza jednotlivých vibračních módů (viz *Tabulka 5.6* a *Obrázek 5.53*).

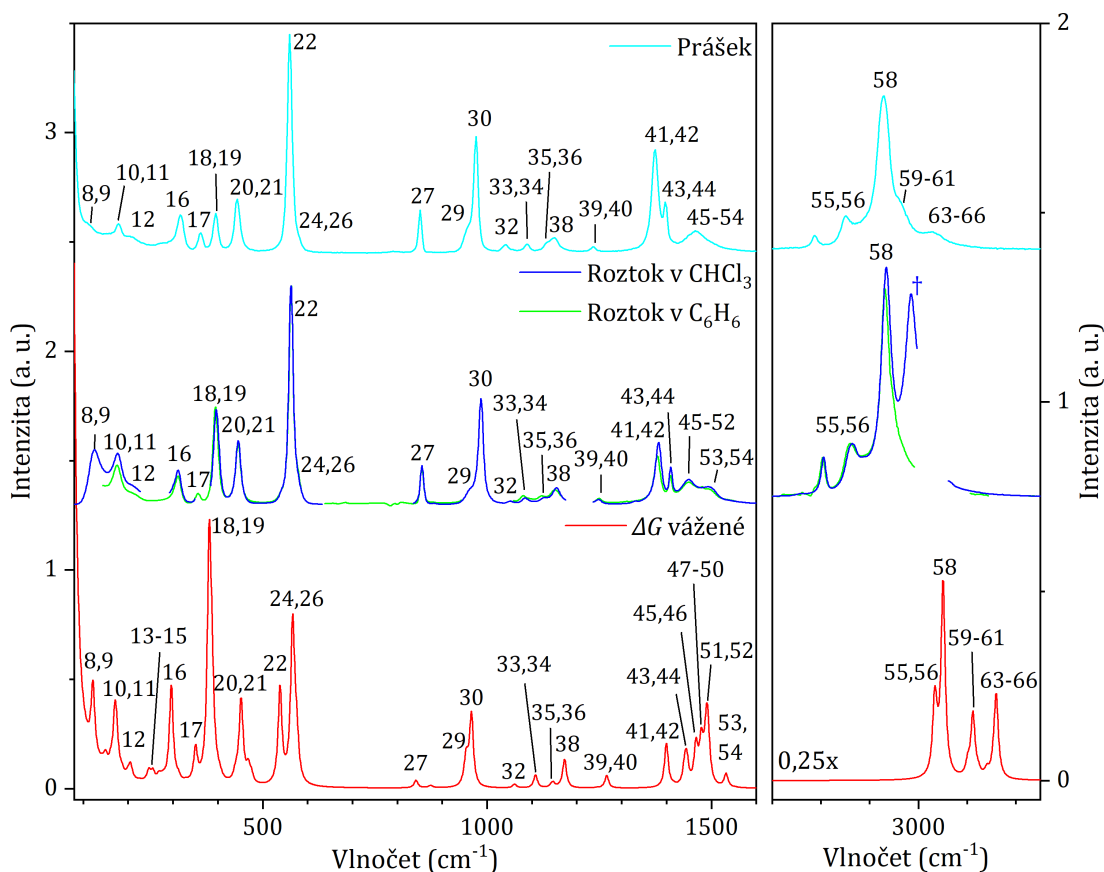
Tabulka 5.6: Vibrační analýza molekuly thiramu

Mód	DFT Vlnocet (cm^{-1})	Symetrie	Vibrace
1	28 m	B	vějířová dithiokarbamátem
2	32 m	A	vějířová dithiokarbamátem
3	43 m	A	vějířová dithiokarbamátem
4	55 w	B	$\tau(\text{C-H}_3)$ ip
5	60 s	A	$\tau(\text{C-H}_3)$ ip
6	71 m	B	$\tau(\text{C-H}_3)$ op
7	75 m	A	$\tau(\text{C-H}_3)$ op
8	120 w	B	$\tau(\text{C-H}_3)$
9	121 w	A	$\tau(\text{C-H}_3)$
10	171 m	A	$\delta(\text{C-S-S-C})$
11	176 w	B	$\delta(\text{C-S-S-C})$

12	205 w	A	$\nu(\text{N-C-S-S-C-N})$
13	246 w	B	$\delta(\text{N-C}(\text{CH}_3)_2)$
14	255 w	A	$\delta(\text{N-C}(\text{CH}_3)_2)$
15	269 w	B	$\delta(\text{S=C-N-CH}_3)$
16	296 m	A	$\delta(\text{S-C=S})$
17	350 m	B	$\delta(\text{S-C=S})$
18	381 s	A	$\nu(\text{S-C}) + \delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ kývavá
19	386 s	B	$\nu(\text{S-C}) + \delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ kývavá
20	451 m	A	$\delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ nůžková
21	453 m	B	$\delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ nůžková
22	538 s	A	$\nu(\text{S-S})$
23	550 w	B	$\delta(\text{C-NS}_2)$
24	566 s	A	$\delta(\text{C-NS}_2) + \delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ nůžková op
25	571 m	B	$\delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ nůžková + $\delta(\text{C-NS}_2)$ ip
26	576 m	A	$\delta(\text{C-NS}_2) + \delta(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$ nůžková ip
27	841 m	A	$\nu(\text{C-S}) + \nu(\text{N-CH}_3)$ sym.
28	842 w	B	$\nu(\text{C-S}) + \nu(\text{N-CH}_3)$ sym.
29	953 s	B	$\nu(\text{C=S}) + \rho(\text{C-H}_3)$ ip
30	965 s	A	$\nu(\text{C=S}) + \rho(\text{C-H}_3)$ ip
31	1062 w	B	$\rho(\text{C-H}_3)$ op + $\nu(\text{N-CH}_3)$ asym. op
32	1063 m	A	$\rho(\text{C-H}_3)$ op + $\nu(\text{N-CH}_3)$ asym. op
33	1108 m	B	$\rho(\text{C-H}_3)$ op
34	1108 m	A	$\rho(\text{C-H}_3)$ op
35	1145 m	B	$\rho(\text{C-H}_3)$ ip
36	1145 m	A	$\rho(\text{C-H}_3)$ ip
37	1172 w	B	$\rho(\text{C-H}_3)$ ip
38	1172 s	A	$\rho(\text{C-H}_3)$ ip
39	1264 m	B	$\rho(\text{C-H}_3)$ op + $\nu(\text{N-CH}_3)$ asym. ip
40	1268 m	A	$\rho(\text{C-H}_3)$ op + $\nu(\text{N-CH}_3)$ asym. ip
41	1399 s	B	$\nu(\text{C-N})$
42	1400 s	A	$\nu(\text{C-N})$
43	1443 s	B	$\delta(\text{C-H}_3)$ sym. op
44	1443 s	A	$\delta(\text{C-H}_3)$ sym. op
45	1465 m	B	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym.
46	1465 s	A	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym.
47	1478 s	B	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym. ip
48	1478 s	A	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym. ip
49	1482 w	B	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym. op
50	1483 m	A	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym. op
51	1491 s	B	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym.
52	1491 s	A	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym.
53	1534 m	B	$\delta(\text{C-H}_3)$ sym. ip
54	1534 m	A	$\delta(\text{C-H}_3)$ sym. ip
55	3039 m	B	$\nu(\text{C-H}_3)$ sym. op
56	3039 s	A	$\nu(\text{C-H}_3)$ sym. op
57	3050 w	B	$\nu(\text{C-H}_3)$ sym. ip
58	3050 s	A	$\nu(\text{C-H}_3)$ sym. ip

59	3110 m	B	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym.
60	3110 s	A	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym.
61	3111 s	A	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym.
62	3111 w	B	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym.
63	3151 m	B	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym. op
64	3151 m	A	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym. op
65	3161 m	B	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym. ip
66	3161 s	A	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym. ip

Intenzita: s - silná (35-100%), m - střední (10-35%), w - slabá (3-10%), vw - velmi slabá (1-3%); A - symetrická vůči C_2 ose, B - asymetrická vůči C_2 ose ; τ - kroutivá, ρ - kývavá, ν - valenční; δ - deformační; sym. - symetrická, asym. - asymetrická; ip - ve fázi, op - mimo fázi; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)



Obrázek 5.53: Ramanova spektra: polykrystalického thiramu, z roztoků thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 při koncentracích 100 mg/ml a vypočítané ΔG vážené spektrum molekuly thiramu; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda); \dagger posun valenční C-H vibrace CHCl_3 způsobený navázáním na molekulu thiramu

Molekula thiramu má 24 atomů, a tedy 66 fundamentálních vibrací. Kvůli symetrii thiramu rozlišujeme u každé vibrace dvě varianty – A (symetrická vůči C_2 ose symetrie) nebo B (asymetrická vůči C_2 ose symetrie). Na každé dithio-karbamátové skupině se navíc vyskytují dva methyly, jejichž vibrace se často

kombinují ve fázi či v protifázi. Ramanovu spektru dominují převážně pásy odpovídající vibracím o symetrii A a související s pohybem methylových skupin (oblast C-H valenčních vibrací a oblast 1000-1700 cm^{-1}) nebo pohybem thio či disulfidové skupiny (0-1000 cm^{-1}).

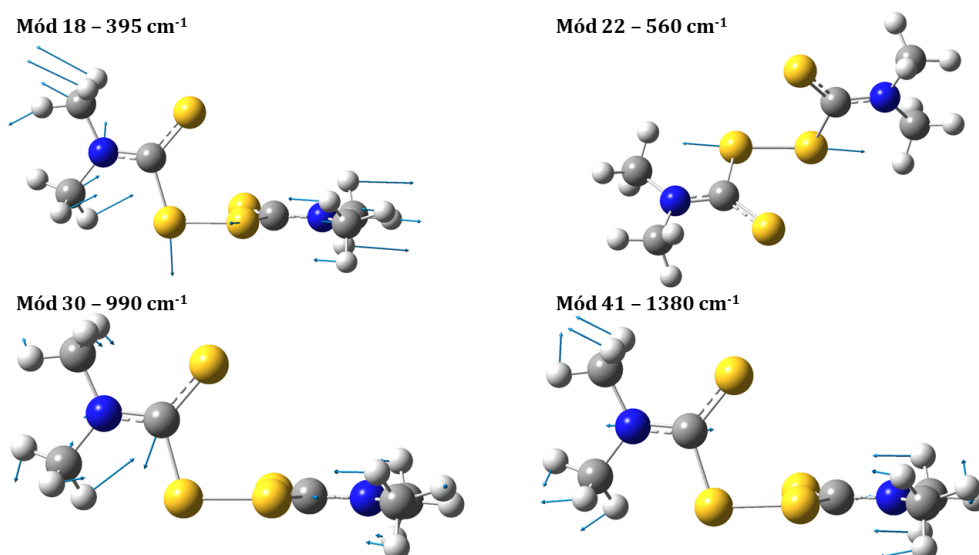
Shoda mezi vypočítaným a experimentálními spektry je velmi dobrá – díky tomu bylo možné přiřadit prakticky všechny vibrační módy odpovídajícím spektrálním pásům (s výjimkou oblasti pod 100 cm^{-1}) (viz *Tabulka 5.7* a *Obrázek 5.53*). Poměrně věrně vychází v simulacích i relativní poměry mezi intenzitami jednotlivých spektrálních pásů. Jedinou výraznější odchylkou je (ve srovnání s experimentem) prohozená intenzita pásů 22 a 24-26.

Čtyři hlavní charakteristické vibrace (Ramanovské markery) thiramu jsou zobrazeny na *Obrázku 5.54* a zvýrazněny šedě v *Tabulce 5.7*). Jedná se o módy spojené s vibrací disulfidové skupiny (18, 22), thioskupin (30) a karbamátu (41).

Tabulka 5.7: Přiřazení vibrací thiramu pásům pozorovaným v experimentálním Ramanově spektru: z roztoku v CHCl_3 o koncentraci 100 mg/ml, z roztoku v CCl_4 o koncentraci ≤ 100 mg/ml, z roztoku v C_6H_6 o koncentraci 100 mg/ml a z prášku

CHCl_3	CCl_4	C_6H_6	Prášek	Mód	Vibrace
Vlnočet (cm^{-1})					
125	116	-	116	8,9	$\tau(\text{C-H}_3)$
177	175	175	178	10,11	$\delta(\text{C-S-S-C})$ sym.
211	-	216	213	12, 13, 14	$\nu(\text{N-C-S-S-C-N})$, $\delta(\text{N-C}(\text{CH}_3)_2)$
-	-	-	270	15	$\delta(\text{S=C-N-CH}_3)$
311	-	311	317	16	$\delta(\text{S-C=S})$
-	-	356	363	17	$\delta(\text{S-C=S})$
397	395	395	396	18, 19	$\nu(\text{S-C}) + \delta(\text{N}-(\text{CH}_3)_2)$ kývavá
446	-	445	443	20, 21	$\delta(\text{N}-(\text{CH}_3)_2)$ nůžková
563	565	564	561	22	$\nu(\text{S-S})$
			585	24-26	$\delta(\text{C-NS}_2) + \delta(\text{N}-(\text{CH}_3)_2)$ nůžková op
855	857	855	851	27	$\nu(\text{C-S}) + \nu(\text{N-CH}_3)$ sym.
961	961	-	958	29	$\nu(\text{C=S}) + \rho(\text{C-H}_3)$ ip
987	992	-	975	30	$\nu(\text{C=S}) + \rho(\text{C-H}_3)$ ip
1052	-	-	1041	32	$\rho(\text{C-H}_3)$ op + $\nu(\text{N-CH}_3)$ asym. op
1085	1082	1081	1088	33, 34	$\rho(\text{C-H}_3)$ op
1129	1127	1122	1132	35, 36	$\rho(\text{C-H}_3)$ ip
1155	1156	1152	1149	38	$\rho(\text{C-H}_3)$ ip
1249	1254	1250	1240	39, 40	$\rho(\text{C-H}_3)$ op + $\nu(\text{N-CH}_3)$ asym. ip
1382	1379	1380	1375	41, 42	$\nu(\text{C-N})$
1410	1410	1409	1399	43, 44	$\delta(\text{C-H}_3)$ sym. op
1450	1450	1450	1466	47-52	$\delta(\text{C-H}_3)$ asym.
1495	-	1495	1510	53, 54	$\delta(\text{C-H}_3)$ sym. ip
2864	2853	2860	2851	55, 56	$\nu(\text{C-H}_3)$ sym. op
2934	2931	2934	2930	58	$\nu(\text{C-H}_3)$ sym. ip
-	-	-	2970	59-61	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym.
-	-	-	3028	63-66	$\nu(\text{C-H}_3)$ asym. ip

- neměřeno či nepozorováno; τ - kroutivá, ρ - kývavá, ν - valenční; δ - deformační; sym. - symetrická, asym. - asymetrická; ip - ve fázi, op - mimo fázi; šedá barva značí nejvýraznější pásy ve spektrech



Obrázek 5.54: Nejvýznačnější vibrace molekuly thiramu

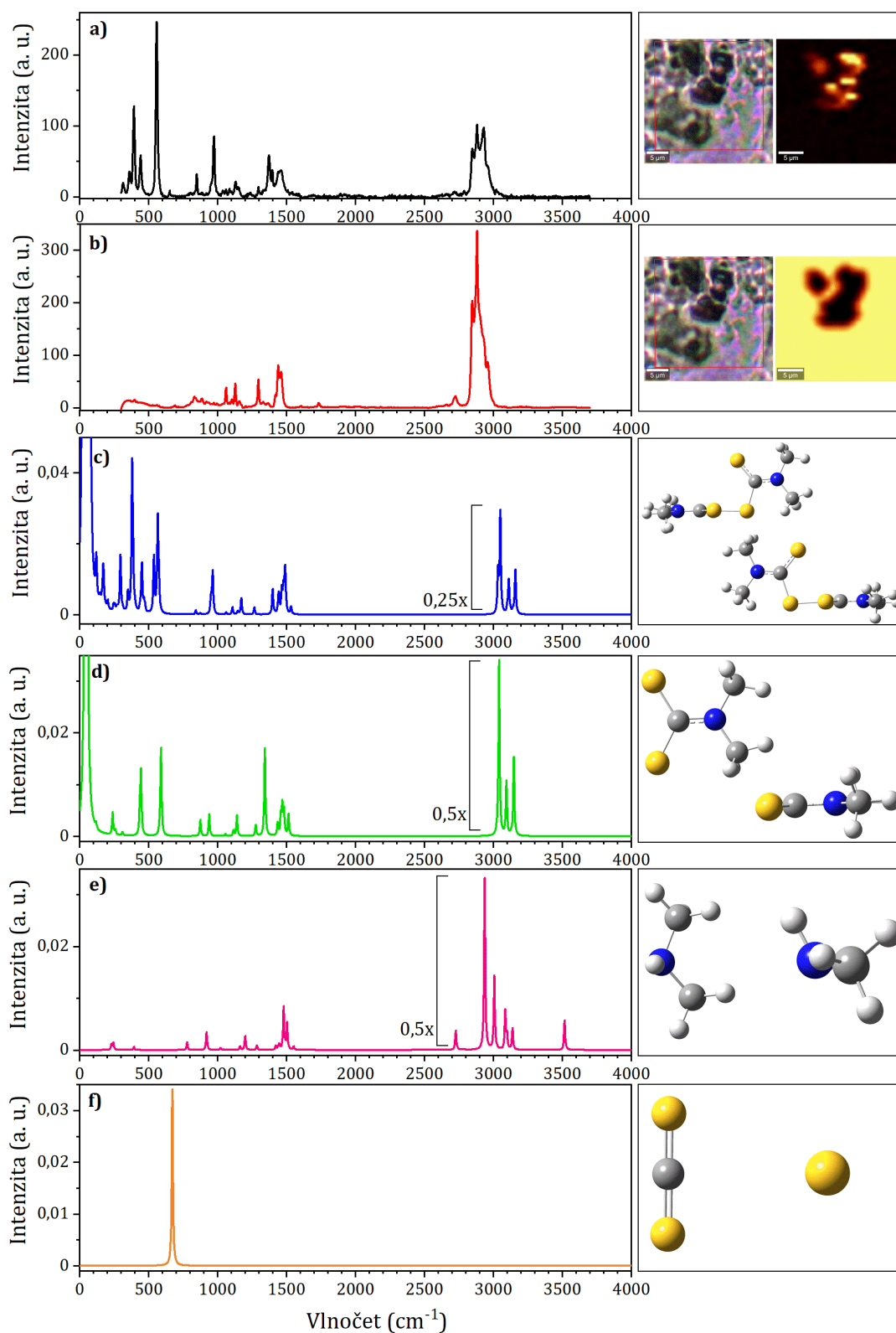
5.6.3 Nasimulovaná spektra možných zdegradovaných forem thiramu

Podobně jako v případě melaminu i u thiramu byla při DCDR měřeních pozorována určitá degradace vzorku. Spektrum odpovídající zdegradované formě thiramu bylo identifikováno jako jedna z komponent na *Obrázku 5.26* a *Obrázku 5.27*. Nejpravděpodobnější způsob degradace thiramu je rozštěpení disulfidové vazby za vzniku dvou dimethyldithiokarbamátových aniontů, které mohou dále zdegradovat na sirouhlík a dimethylamin (Gupta a kol., 2012). Alternativně může také dojít k hydroxylaci dimethyldithiokarbamátu či přímo k oxidaci thioskupiny, což však v této práci zkoumáno nebylo.

Pro tři možné produkty degradace (dithiokarbamátový aniont, dimethylamin a sirouhlík) byly vytvořeny a zoptimalizovány jejich struktury a vypočítána jejich Ramanova spektra. Porovnání těchto spekter se spektrem thiramového konformeru A a experimentálními DCDR spektry thiramu a jeho degradované formy je ukázáno na *Obrázku 5.55*.

Experimentální spektrum degradovaného produktu postrádá jakékoli pásy související s vibracemi disulfidové skupiny a thioskupiny – v oblasti pod 1000 cm^{-1} chybí jakékoli výrazné pásy. Ve vyšší spektrální oblasti ($1000\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) je možné pozorovat vymizení pásu kolem 1380 cm^{-1} , odpovídajícího C-N valenční vibraci. To naznačuje, že degradace byla rozsáhlejší než pouhý rozpad na dva dithiokarbamátové anionty. Toto pozorování potvrzuje i srovnání vypočítaných spekter thiramu a možných produktů degradace (panely **b**), **e**), **f**)). Dithiokarbamátový aniont i sirouhlík vykazují výrazné pásy odpovídající vibracím thioskupin, dimethylamin nemá pod 1000 cm^{-1} téměř žádné vibrace. Poměrně signifikantní je i posun pásů v C-H valenční oblasti, kde změně experimentálního profilu také více odpovídá dimethylamin.

Pozorovaný degradační produkt thiramu je tedy nejspíše dimethylamin, případně nějaká jemu podobná sloučenina (mohlo by se jednat např. i o tetramethylmočovinu nebo tetramethylthiomočovinu).



Obrázek 5.55: Ramanova spektra thiramu z vyschlých kapek roztoku v CHCl_3 o koncentraci 0,01 mg/ml (0,04 mM): **a)** filtr o šířce 75 cm^{-1} na pozici 556 cm^{-1} , **b)** inverzní filtr k filtru a); obrázek vlevo zobrazuje měřenou oblast, vpravo v nepravých barvách intenzitu signálu; nasimulovaná Ramanova spektra: **c)** molekuly thiram, **d)**, **e)**, **f)**, **h)** zdegradované struktury; obrázek vlevo pohled shora, vpravo ze strany; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G^{**}, cpcm(voda)

Závěr

Hlavním cílem této práce byla analýza dvou významných environmentálních kontaminantů, melaminu a thiramu, pomocí metod využívajících Ramanova rozptylu a teoretických spektrálních simulací.

V úvodní (rešeršní) části práce jsou obě studované molekuly představeny a charakterizovány v kontextu jejich vlivu na životní prostředí. Podrobně jsou popsány i předešlé výsledky jejich studia. Následující část práce je věnována přehledu teoretických základů vibrační spektroskopie se zaměřením na Ramanův rozptyl a popisu kvantově mechanických metod pro simulace vibračních spekter. Značná pozornost byla věnována podrobnému popisu metodiky měření na jednotlivých přístrojích, které byly v práci využity, a zpracování dat.

V práci se nám podařilo získat značné množství původních výsledků:

1. Při měření práškových (polykrystalických) vzorků se nám podařilo zjistit, že melamin se nachází v několika různých polymorfech, které se dají vzájemně odlišit podle relativní intenzity pásů v nízkofrekvenční oblasti (pod 200 cm^{-1}) a v oblasti N-H valenčních vibrací. V případě thiramu byla spektrální variabilita menší – stanovili jsme dva typy signálu lišící se relativní intenzitou pásů. Dalším zdrojem odlišnosti signálu bylo proměnné fluorescenční pozadí.
2. Podařilo se nám získat velmi kvalitní spektra melaminu a thiramu v roztoku. Melamin byl měřen ve vodě a DMSO, což jsou jeho hlavní rozpouštědla. V DMSO sice nebylo možné získat některé části spektra melaminu v oblasti „otisku prstu“ kvůli intenzivnímu signálu pásů rozpouštědla, ale spektrum získané v N-H valenční oblasti bylo kvalitnější než spektrum získané z vody. Thiram byl měřen rozpuštěný v chloroformu, benzenu a tetrachlormethanu. V prvních dvou rozpouštědlech byla získána kvalitní spektra, jejichž kombinací se podařilo získat Ramanovo spektrum thiramu prakticky v celé oblasti fundamentálních vibrací.
3. Podařilo se nám zopakovat a verifikovat výsledky DCDR měření z práce Bc. Mikuláše Přikryla. Navíc jsme se věnovali charakterizaci zasychání z různých rozpouštědel a možnosti detekce z neupraveného povrchu (z běžného mikroskopického sklíčka). Pro melamin se jako vhodnější rozpouštědlo jeví voda, neboť v ní dochází k menší míře degradace vzorku při zasychání než v DMSO. U thiramu se jako vhodnější rozpouštědlo jevil benzen, kde docházelo k menší míře degradace vzorku než v chloroformu a kde je rozpustnost vyšší než v tetrachloru. Díky tomu, že byla spektra měřena v režimu spektrálních map (na konfokálním Ramanově mikroskopu Alpha 300 (WITec)), se nám podařilo bez potíží detekovat melamin v koncentraci $80\text{ }\mu\text{M}$ a thiram v koncentraci $40\text{ }\mu\text{M}$. Odhadujeme, že by mělo být možné tyto hodnoty ještě minimálně o řád snížit.

Podrobnou diskuzi výsledků měření v různých fázích lze nalézt v *Sekci 5.4.3*.

4. V rámci kvantově chemických simulací využívajících DFT byla charakterizována struktura molekuly melaminu z hlediska neplanarity jeho aminových skupin a provedena vibrační analýza Ramanova spektra jeho neutrální a

protonované formy. Velká pozornost byla věnována vlivu explicitní solvatace a agregace na simulovaná spektra a jejich shodu s experimentem. Podařilo se zjistit, že melamin má velkou afinitu k vytváření aglomerátů a že i v roztoku pozorujeme spíše malé solvatované oligomery melaminu (dimery, trimery aj.) než jednotlivé solvatované molekuly. Na základě shody experimentálních a simulovaných dat bylo provedeno přiřazení všech pozorovaných experimentálních pásů ke specifickým vibračním módům.

5. Pomocí kvantově chemických výpočtů byl prozkoumán konformační prostor molekuly thiramu, identifikovány možné konformery a jejich relativní zastoupení. Jako dominantní konformer s přibližně 90% zastoupením byla určena protažená struktura s centrálním torzním úhlem $\chi_2 \sim \pm 90^\circ$ a sousedními dihedrálními úhly χ_1 a $\chi'_1 \sim \pm 180^\circ$, označovaná také jako *tgt* či *tdt* (pro definici těchto úhlů viz *Obrázek 5.44*). Silně převažující zastoupení tohoto konformeru bylo potvrzeno i na základě porovnání vypočítaných spekter jednotlivých konformerů s experimentem, a to podle celkové podobnosti spektra, polohy pásu valenční S-S vibrace a vzájemné polohy pásů v oblasti mezi 1150 a 1400 cm^{-1} . Stejně jako pro melamin byla i pro thiram provedena vibrační analýza a přiřazení experimentálně získaných pásů k jednotlivým vibračním módům molekuly.

V původním plánu bylo i změření a interpretace spekter IR absorpce, avšak k tomu jsme se z časových důvodů již nedostali. V budoucnu hodláme ve studiu melaminu a thiramu pokračovat a zaměřit pozornost zejména na detailnější popis a analýzu agregace melaminu a přesnější simulace spekter thiramu se zahrnutím vlivu explicitní solvatace.

Seznam použité literatury

- CHATTARAJ, K. G. a PAUL, S. (2018). Understanding of structure and thermodynamics of melamine association in aqueous solution from a unified theoretical and experimental approach. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **58**(8), 1610–1624. doi: 10.1021/acs.jcim.8b00231. PMID: 30040417, Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00231>.
- CHEMICALIZE. Melamine [online]. Dostupné z: <https://chemicalize.com/app/calculation/melamine> [cit. říjen 2021].
- CHEMICALIZE. Thiram [online]. Dostupné z: <https://chemicalize.com/app/calculation/thiram> [cit. říjen 2021].
- DANIŠ, S. (2019). *Atomová fyzika a elektronová struktura látek*, pages 117–143. Vydání první. Matfyzpress, Praha. ISBN 978-80-7378-376-1.
- DENNINGTON, R., KEITH, T. A. a MILLAM, J. M. (2016). Gaussview (verze 9.7.5.184) [software]. Semichem Inc. Shawnee Mission KS, Dostupné z: <https://gaussian.com/gaussview6/>.
- EDINBURGH INSTRUMENTS. What is confocal raman microscopy? [online]. Dostupné z: <https://www.edinst.com/blog/what-is-confocal-raman-microscopy/> [cit. duben 2022].
- EUROPEAN COMMISSION. Food contaminants [online]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/system/files/2016-10/cs_contaminants_factsheet_en.pdf [cit. únor 2022].
- EUROPEAN COMMISSION. Our oceans, seas and coasts [online]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-8/index_en.htm [cit. únor 2022].
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2020). Review of the existing maximum residue levels for thiram according to article 12 of regulation (ec) no 396/2005. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6391. Dostupné z: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6391>.
- EVROPSKÁ KOMISE (2012). Nařízení komise (EU) č. 594/2012. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32012R0594&from=EN>.
- FILIFE, O., SANTOS, S. A., DOMINGUES, M. R. M., VIDAL, M., SILVESTRE, A., NETO, C. a SANTOS, E. (2013). Photodegradation of the fungicide thiram in aqueous solutions. kinetic studies and identification of the photodegradation products by hplc–ms/ms. *Chemosphere*, **91**(7), 993–1001. ISSN 0045-6535. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.092>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351300221X>.

FRISCH, M. J., TRUCKS, G. W., SCHLEGEL, H. B., SCUSERIA, G. E., ROBB, M. A., CHEESEMAN, J. R., SCALMANI, G., BARONE, V., PETERSSON, G. A., NAKATSUJI, H., LI, X., CARICATO, M., MARENICH, A. V., BLOINO, J., JANESKO, B. G., GOMPERTS, R., MENNUCCI, B., HRATCHIAN, H. P., ORTIZ, J. V., IZMAYLOV, A. F., SONNENBERG, J. L., WILLIAMS-YOUNG, D., DING, F., LIPPARINI, F., EGIDI, F., GOINGS, J., PENG, B., PETRONE, A., HENDERSON, T., RANASINGHE, D., ZAKRZEWSKI, V. G., GAO, J., REGA, N., ZHENG, G., LIANG, W., HADA, M., EHARA, M., TOYOTA, K., FUKUDA, R., HASEGAWA, J., ISHIDA, M., NAKAJIMA, T., HONDA, Y., KITAO, O., NAKAI, H., VREVEN, T., THROSSELL, K., MONTGOMERY, JR., J. A., PERALTA, J. E., OGLIARO, F., BEARPARK, M. J., HEYD, J. J., BROTHERS, E. N., KUDIN, K. N., STAROVEROV, V. N., KEITH, T. A., KOBAYASHI, R., NORMAND, J., RAGHAVACHARI, K., RENDELL, A. P., BURANT, J. C., IYENGAR, S. S., TOMASI, J., COSSI, M., MILLAM, J. M., KLENE, M., ADAMO, C., CAMMI, R., OCHTERSKI, J. W., MARTIN, R. L., MOROKUMA, K., FARKAS, O., FORESMAN, J. B. a FOX, D. J. (2013). Gaussian~09 Revision D.01 [software]. Gaussian Inc. Wallingford CT, Dostupné z: <https://gaussian.com/>.

GOVERNMENT OF CANADA. Environmental contaminants [online]. Dostupné z: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/environmental-contaminants.html> [cit. únor 2022].

GUO, P., SIKDAR, D., HUANG, X., SI, K. J., XIONG, W., GONG, S., YAP, L. W., PREMARATNE, M. a CHENG, W. (2015). Plasmonic core-shell nanoparticles for sers detection of the pesticide thiram: size- and shape-dependent raman enhancement. *Nanoscale*, **7**, 2862–2868. doi: 10.1039/C4NR06429A. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1039/C4NR06429A>.

GUPTA, B., RANI, M. a KUMAR, R. (2012). Degradation of thiram in water, soil and plants: a study by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, **26**(1), 69–75. doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.1627>. Dostupné z: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmc.1627>.

KRIEGER, R. (2010). *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, volume 1 of 3rd edition. Elsevier Academic Press. ISBN 978-0-12-374481-4.

KUIŽOVÁ, A., PŘIKRYL, M., PROCHÁZKA, M. a KOČIŠOVÁ, E. (2021). Drop coating deposition raman (dcdr) spectroscopy of contaminants. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **262**, 120109. ISSN 1386-1425. doi: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120109>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142521006867>.

LARKIN, PETER, J. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*, pages 12–17. Elsevier. ISBN 978-0-12-386984-5.

LIU, X. R., ZININ, P. V., MING, L. C., ACOSTA, T., SHARMA, S. K., MISRA, A. K. a HONG, S. M. (2010). Raman spectroscopy of melamine at high pressures. *Journal of Physics: Conference Series*, **215**, 012045. doi: 10.1088/

1742-6596/215/1/012045. URL <https://doi.org/10.1088/1742-6596/215/1/012045>.

- MEIER, R. J., MAPLE, J. R., HWANG, M.-J. a HAGLER, A. T. (1995). Molecular modeling urea- and melamine-formaldehyde resins. 1. a force field for urea and melamine. *The Journal of Physical Chemistry*, **99**(15), 5445–5456. doi: 10.1021/j100015a030. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/j100015a030>.
- MIRCESCU, N. E., OLTEAN, M., CHIS, V. a LEOPOLD, N. (2012). FTIR, FT-Raman, SERS and DFT study on melamine. *Vibrational Spectroscopy*, **62**, 165–171. doi: 10.1016/j.vibspec.2012.04.008. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.04.008>.
- ORIGINLAB CORPORATION. OriginPro 2020b (verze 9.7.5.184) [software]. Dostupné z: <https://www.originlab.com/>.
- OXFORD INSTRUMENTS, WITEC. WITec Suite FIVE [software]. Dostupné z: <https://raman.oxinst.com/products/software/witec-software-suite>.
- PERPÉTUO, G. a JANCZAK, J. (2008). Supramolecular architectures in crystals of melamine and aromatic carboxylic acids. *Journal of Molecular Structure*, **891**, 429–436. doi: 10.1016/j.molstruc.2008.04.032. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.04.032>.
- PROCHÁZKA, M. (2016). *Surface-Enhances Raman Spectroscopy: Bioanalytical, Biomolecular and Medical Applications*. Springer International Publishing. ISBN 978-3-319-23990-3. doi: 10.1007/978-3-319-23992-7.
- PŘIKRYL, M. (2020). Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků vybraných kontaminantů. *Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy*. Bakalářská práce.
- RAMAN, C. a KRISHNAN, K. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, **121**, 501–502. doi: 10.1038/121501c0. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/121501c0>.
- SAUTE, B. a NARAYANAN, R. (2011). Solution-based direct readout surface enhanced raman spectroscopic (sers) detection of ultra-low levels of thiram with dogbone shaped gold nanoparticles. *Analyst*, **136**, 527–532. doi: 10.1039/C0AN00594K. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1039/C0AN00594K>.
- SCOPONI, M., POLO, E., PRADELLA, F., BERTOLASI, V., CARASSITI, V. a GOBERTI, P. (1992). Crystal structure and spectroscopic analysis of melamine hydrobromide. evidence for iso-melamine cations and charge-transfer complexes in the solid state. *Journal of The Chemical Society-perkin Transactions 2 - J CHEM SOC PERKIN TRANS 2*, **2**. doi: 10.1039/p29920001127.
- SHARMA, V. K., AULAKH, J. S. a MALIK, A. K. (2003). Thiram: degradation, applications and analytical methods. *J. Environ. Monit.*, **5**, 717–723. doi: 10.1039/B304710E. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1039/B304710E>.
- SKÁLA, L. (1995). *Kvantová teorie molekul*. Karolinum, Praha. ISBN 80-7184-007-6.

- SMITH, E. a DENT, G. (2019). *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, pages 1–7,22,23,49,50. 2nd edition. John Wiley & Sons. ISBN 9781119440581.
- SVĚTOVÁ ZDRAVOTNICKÁ ORGANIZACE (WHO) (2008). Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid. page 7. Dostupné z: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44106/9789241597951_eng.pdf.
- TANG, X., DONG, R., YANG, L. a LIU, J. (2015). Fabrication of au nanorod-coated fe₃o₄ microspheres as sers substrate for pesticide analysis by near-infrared excitation. *Journal of Raman Spectroscopy*, **46**(5), 470–475. doi: <https://doi.org/10.1002/jrs.4658>. Dostupné z: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jrs.4658>.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. GRAMS/AI (verze 9.2) [software]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/INF-15000>.
- TRASOBARES, S., KOLCZEWSKI, C., RÄTY, R., BORGLUND, N., BASSAN, A., HUG, G., COLLIEX, C., CSILLAG, S. a PETTERSSON, L. G. M. (2003). Monitoring the decomposition of melamine in the solid phase by electron energy loss chronospectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, **107**(2), 228–235. doi: [10.1021/jp026340j](https://doi.org/10.1021/jp026340j). Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jp026340j>.
- UNITED STATES PREVENTION AGENCY (2004). EPA R.E.D facts, thiram. Dostupné z: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-079801_1-Sep-04.pdf.
- VELLA-ZARB, L., BRAGA, D., ORPEN, A. G. a BAISCH, U. (2014). The influence of hydrogen bonding on the planar arrangement of melamine in crystal structures of its solvates, cocrystals and salts. *CrystEngComm*, **16**, 8147–8159. doi: [10.1039/c4ce00748d](https://doi.org/10.1039/c4ce00748d).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Inventory of evaluations performed by the joint meeting on pesticide residues (JMPR) [online]. Dostupné z: <https://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/pesticide?name=THIRAM> [cit. duben 2022].
- YALKOWSKY, S. H., HE, Y. a JAIN, P. (2010). *Handbook of Aqueous Solubility Data*, pages 61,297. 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, United States of America. ISBN 978-1-4398-0246-5.
- ZHANG, D., XIE, Y., MROZEK, M. F., ORTIZ, C., DAVISSON, V. J. a BEN-AMOTZ, D. (2003). Raman detection of proteomic analytes. *Analytical Chemistry*, **75**(21), 5703–5709. doi: [10.1021/ac0345087](https://doi.org/10.1021/ac0345087). PMID: 14588009, Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac0345087>.
- ZHU, J., CHEN, Q., KUTSANEDZIE, F. Y. H., YANG, M., OUYANG, Q. a JIANG, H. (2017). Highly sensitive and label-free determination of thiram

residue using surface-enhanced raman spectroscopy (sers) coupled with paper-based microfluidics. *Anal. Methods*, **9**, 6186–6193. doi: 10.1039/C7AY01637A. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1039/C7AY01637A>.

ČÁRSKY, P. a URBAN, M. (2008). Ab initio výpočty v chemii po 28 letech. *Chemické listy*, **102**, 865–872.

Seznam obrázků

1.1	Strukturní vzorec molekuly melaminu v a) neutrální, b) jednou protonované, c) dvakrát protonované formě	5
1.2	Uspořádání molekul melaminu v závislosti na stupni protonace: a) 2D vrstva neprotonovaného melaminu, b) polymerní 1D řetězec, c) dimer; převzato z Perpétuo a Janczak (2008)	8
1.3	Strukturní vzorec molekuly thiramu	9
2.1	Základní typy normálních vibračních módů CH ₂ , popřípadě CH ₃ skupiny	12
2.2	Schéma energetických přechodů mezi vibračními stavy při Rayleighově a Ramanově rozptylu	14
2.3	Schéma konfokálního Ramanova mikroskopu; převzato z Edinburgh Instruments a upraveno	16
4.1	Naměřená spektra polykrystalického melaminu při různých pozicích mřížky	24
4.2	Vzorky připravené pro DCDR měření	25
5.1	Vibrační spektrum melaminu v práškové formě	28
5.2	Vibrační spektrum melaminu v práškové formě - po korekci pozadí a normování na integrální intenzitu pásu na pozici 986 cm ⁻¹ ; tučně značená pozice pásu znamená, že se jeho intenzita mezi různými komponentami liší a tato změna byla dále kvantifikována	29
5.3	Vibrační spektrum thiramu v práškové formě	31
5.4	Vibrační spektrum thiramu v práškové formě - po korekci pozadí a normování na integrální intenzitu v oblasti valenčních C-H vibrací (oblast kolem pásu na pozici 2930 cm ⁻¹); tučně značená pozice pásu znamená, že se jeho intenzita mezi různými komponentami liší a tato změna byla dále kvantifikována	32
5.5	Ramanova spektra melaminu a) při koncentraci ≤2,5 mg/ml v H ₂ O (dvě různá měření), b) při koncentraci ≤20 mg/ml v DMSO (dvě různé korekce pozadí); modře Ramanovo spektrum rozpouštědla; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku	34
5.6	Ramanova spektra melaminu a) při koncentraci 20,15 mg/ml v DMSO, b) při koncentraci 2,25 mg/ml v H ₂ O, c) při koncentraci 2,30 mg/ml v D ₂ O; modře Ramanovo spektrum rozpouštědla; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku; *reziduální signál rozpouštědla; **nečistoty H ₂ O v D ₂ O	35

5.7	Ramanova spektra melaminu: při koncentraci 20,15 mg/ml v DMSO, při koncentraci 2,25 mg/ml v H ₂ O, při koncentraci 2,30 mg/ml v D ₂ O; ** signál od nečistot H ₂ O v D ₂ O	36
5.8	Detail Ramanových spekter melaminu: při koncentraci 20,15 mg/ml v DMSO, průměrné spektrum z výsledků získaných při koncentraci 20,25 mg/ml a z půlhodinového měření při koncentraci ≤2,5 mg/ml v H ₂ O	37
5.9	Ramanova spektra tří vzorků thiramu při koncentraci 100 mg/ml v CHCl ₃ ; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku; †posun valenční C-H vibrace CHCl ₃ způsobený navázáním na molekulu thiramu	39
5.10	Ramanova spektra thiramu a) při koncentraci 100 mg/ml v CHCl ₃ , b) při koncentraci 100 mg/ml v C ₆ H ₆ , c) při koncentraci ≤100 mg/ml v CCl ₄ ; modře Ramanovo spektrum rozpouštědla; šedé pásy značí vymaskování oblastí výrazně ovlivněných rozpouštědlem; faktor nad rozpouštědlem udává multiplikační faktor, jímž bylo nutné přenásobit spektrum rozpouštědla, aby bylo dosaženo srovnatelné intenzity se spektrem vzorku; *reziduální signál rozpouštědla; †posun valenční C-H vibrace CHCl ₃ způsobený navázáním na molekulu thiramu	40
5.11	Ramanova spektra thiramu: při koncentraci 100 mg/ml v CHCl ₃ , při koncentraci 100 mg/ml v C ₆ H ₆ , při koncentraci ≤100 mg/ml v CCl ₄ ; *reziduální signál rozpouštědla; †posun valenční C-H vibrace CHCl ₃ způsobený navázáním na molekulu thiramu	42
5.12	Detail Ramanova spektra tří vzorků thiramu při koncentraci 100 mg/ml v CHCl ₃ v oblasti 2750-3150 cm ⁻¹ , normováno na intenzitu maxima pásu na 2934 cm ⁻¹	43
5.13	Ramanovo spektrum melaminu z vyschlé kapky roztoku v DMSO o koncentraci 1 mg/ml (7,93 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 90 cm ⁻¹ na pozici 677 cm ⁻¹ , oblast b) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm ⁻¹ na pozici 2100 cm ⁻¹	44
5.14	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v DMSO o koncentraci 0,1 mg/ml (0,79 mM) (dvě měření); oblast 1a) , resp. 2a) , v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm ⁻¹ na pozici 687, resp. 684, cm ⁻¹ , oblast 1b) , resp. 2b) , zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 120, resp. 200, cm ⁻¹ na pozici 2884, resp. 2894, cm ⁻¹ , oblasti 1c) a 2c) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm ⁻¹ na pozici 2100 cm ⁻¹	45

5.15	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v DMSO o koncentraci 0,01 mg/ml (0,08 mM) (dvě měření); oblast 1a), resp. 2a), v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm ⁻¹ na pozici 677, resp. 684, cm ⁻¹ , oblast 1b), resp. 2b), zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 200 cm ⁻¹ na pozici 2900, resp. 2892, cm ⁻¹ , oblasti 1c) a 2c) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm ⁻¹ na pozici 2100 cm ⁻¹	46
5.16	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v DMSO o koncentracích 1 mg/ml (7,93 mM), 0,1 mg/ml (0,79 mM) a 0,01 mg/ml (0,08 mM)	47
5.17	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H ₂ O o koncentraci 0,1 mg/ml (0,79 mM); oblast 1a), resp. 2a), v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm ⁻¹ na pozici 684, resp. 677, oblasti 1b) a 2b) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm ⁻¹ na pozici 2100 cm ⁻¹	48
5.18	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H ₂ O o koncentraci 0,01 mg/ml (0,08 mM); oblast 1a), resp. 2a), v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 80 cm ⁻¹ na pozici 692, resp. 677, cm ⁻¹ , oblast 1b) zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 200 cm ⁻¹ na pozici 2900 cm ⁻¹ , oblasti 1c) a 2b) pak odpovídají signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm ⁻¹ na pozici 2100 cm ⁻¹	49
5.19	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H ₂ O o koncentracích 0,1 mg/ml (0,79 mM) a 0,01 mg/ml (0,08 mM) (dvě měření)	50
5.20	Ramanova spektra melaminu z vyschlé kapky roztoku v D ₂ O o koncentraci 1 mg/ml (7,93 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 450 cm ⁻¹ na pozici 3218 cm ⁻¹ , oblast b) zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 400 cm ⁻¹ na pozici 2389 cm ⁻¹ , oblast c) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 100 cm ⁻¹ na pozici 2100 cm ⁻¹	51
5.21	Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v C ₆ H ₆ o koncentraci 1 mg/ml (4,16 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm ⁻¹ na pozici 558 cm ⁻¹ , oblast b) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm ⁻¹ na pozici 2487 cm ⁻¹	52
5.22	Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v C ₆ H ₆ o koncentraci 0,1 mg/ml (0,42 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm ⁻¹ na pozici 586 cm ⁻¹ , oblast b) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm ⁻¹ na pozici 2487 cm ⁻¹	53
5.23	Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v C ₆ H ₆ o koncentraci 0,01 mg/ml (0,04 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm ⁻¹ na pozici 564 cm ⁻¹ , oblast b) zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 200 cm ⁻¹ na pozici 2904 cm ⁻¹ , oblast c) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm ⁻¹ na pozici 2487 cm ⁻¹	54

5.24 Ramanova spektra thiramu z vyschlých kapek roztoku v C_6H_6 o koncentracích 1 mg/ml (4,16 mM), 0,1 mg/ml (0,42 mM) a 0,01 mg/ml (0,04 mM)	55
5.25 Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v $CHCl_3$ o koncentraci 1 mg/ml (4,16 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 556 cm^{-1} , oblast b) zobrazuje inverzní filtr k filtru a), oblast c) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}	56
5.26 Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v $CHCl_3$ o koncentraci 0,1 mg/ml (0,42 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 563 cm^{-1} , oblast b) zobrazuje inverzní filtr k filtru a), oblast c) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}	57
5.27 Ramanovo spektrum thiramu z vyschlé kapky roztoku v $CHCl_3$ o koncentraci 0,01 mg/ml (0,04 mM); oblast a) v nepravých barvách zobrazuje intenzitu signálu odpovídající filtru o šířce 75 cm^{-1} na pozici 556 cm^{-1} , oblast b) zobrazuje inverzní filtr k filtru a), oblast c) pak odpovídá signálu pozadí - filtr o šířce 150 cm^{-1} na pozici 2487 cm^{-1}	58
5.28 Ramanova spektra thiramu z vyschlých kapek roztoku v $CHCl_3$ o koncentracích 1 mg/ml (4,16 mM), 0,1 mg/ml (0,42 mM) a 0,01 mg/ml (0,04 mM)	59
5.29 Ramanova spektra: polykrystalického melaminu, z roztoku melaminu v H_2O při koncentraci 2,25 mg/ml (17,84 mM), z vyschlé kapky roztoku melaminu v H_2O o koncentraci 0,01 mg/ml (0,08 mM)	60
5.30 Ramanova spektra: polykrystalického thiramu, z roztoků thiramu v $CHCl_3$ a C_6H_6 při koncentracích 100 mg/ml (0,42 M), z vyschlých kapek roztoků thiramu v $CHCl_3$ a C_6H_6 o koncentracích 0,1 mg/ml (0,42 mM); †posun valenční C-H vibrace $CHCl_3$ způsobený navázáním na molekulu thiramu	61
5.31 Výchozí geometrie pro optimalizaci neutrální molekuly thiramu a výsledky optimalizace: a) planární, b) neplanární - symetrická varianta, c) neplanární - asymetrická varianta; pohled shora pro variantu b); úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G(3d2f,3p2d), cpcm(voda)	65
5.32 Nasimulovaná Ramanova spektra neutrální molekuly melaminu pro různé počáteční geometrie; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G(3d2f,3p2d), cpcm(voda)	66
5.33 Výsledek optimalizace jednou protonované molekuly melaminu; vlevo pohled shora, vpravo pohled ze strany; čárkované čáry znázorňují vychýlení vodíků; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	66
5.34 Nasimulovaná Ramanova spektra neutrální a jednou protonované molekuly melaminu; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda); značení pásů odpovídá <i>Tabulce 5.3</i>	68

5.35	Uspořádání neutrální molekuly melaminu a molekul H ₂ O použité při simulování Ramanova spektra; vlevo pohled shora, vpravo pohled ze strany	69
5.36	Nasimulované Ramanovo spektrum neutrální molekuly melaminu a šesti molekul H ₂ O: s ponechanými vibracemi vody a bez vibrací vody; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	70
5.37	Nasimulovaná Ramanova spektra neutrální molekuly melaminu v přítomnosti různého počtu molekul vody a experimentálně získané spektrum z roztoku v H ₂ O při koncentraci 2,25 mg/ml - 2x zvětšeno; úroveň výpočtu v případech 0, 3 a 6 molekul H ₂ O B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda), v případě 9 molekul H ₂ O B3LYP/6-31+G*, cpcm(voda)	71
5.38	Uspořádání neutrálních molekul melaminu použité při simulování Ramanova spektra; vlevo pohled shora, vpravo pohled ze strany .	73
5.39	Nasimulovaná Ramanova spektra různých klastrů neutrálních molekul melaminu a experimentálně získaná spektra z roztoku v H ₂ O při koncentraci 2,25 mg/ml a z měření polykrystalického vzorku; vysokofrekvenční oblast experimentálních spekter 5x zvětšena; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	74
5.40	Nasimulovaná Ramanova neutrální spektra molekuly melaminu při užití různých funkcionalů, úroveň výpočtů 6-311++G(3d2f,3p2d), cpcm(voda)	76
5.41	Nasimulovaná Ramanova spektra Mel ₂ při užití různých funkcionalů; úroveň výpočtů 6-31++G**, cpcm(voda)	76
5.42	Nejvýznačnější vibrace neutrální molekuly melaminu	79
5.43	Ramanova spektra melaminu z vyschlých kapek roztoku v H ₂ O o koncentraci 0,01 mg/ml (0,08 mM): a), resp. b), filtr o šířce 80 cm ⁻¹ na pozici 677, resp. 692, cm ⁻¹ , c) filtr o šířce 200 cm ⁻¹ na pozici 2900 cm ⁻¹ ; obrázek vlevo zobrazuje měřenou oblast, vpravo v nepravých barvách intenzitu signálu; nasimulovaná Ramanova spektra: d) Mel ₂ lineární, e), f), g), h) zdegradované struktury; obrázek vlevo pohled shora, vpravo ze strany; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	81
5.44	Dihedrální úhly χ_1 , χ_2 , χ'_1 molekuly thiramu	82
5.45	1D sken dihedrálního úhlu χ_2 molekuly thiramu; ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií; červeně označena minima; úroveň výpočtů B3LYP/6-31+G*, iefpcm(chloroform)	83
5.46	1D sken dihedrálního úhlu χ_1 molekuly thiramu; ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií; červeně označena minima; úroveň výpočtů B3LYP/6-31+G*, iefpcm(chloroform)	83
5.47	2D sken dihedrálních úhlů χ_1 a χ_2 molekuly thiramu; ΔE – rozdíl energie mezi současným konformerem a konformerem s nejnižší energií; m značí minima; úroveň výpočtů B3LYP/6-31+G*, iefpcm(chloroform)	84
5.48	Chirální konformery A ₁ a A ₂	85

5.49	Ramanova spektra získaných konformerů molekuly thiramu v oblasti od 2900 do 3300 cm^{-1} ; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	86
5.50	Ramanova spektra získaných konformerů molekuly thiramu v oblasti od 1000 do 1600 cm^{-1} ; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	87
5.51	Ramanova spektra získaných konformerů molekuly thiramu v oblasti od 0 do 1000 cm^{-1} ; grafy vpravo mají oproti grafům vlevo měřítko 6x menší; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	88
5.52	ΔE , ΔE_0 , ΔH a ΔG vážená Ramanova spektra molekuly thiramu; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	89
5.53	Ramanova spektra: polykrystalického thiramu, z roztoků thiramu v CHCl_3 a C_6H_6 při koncentracích 100 mg/ml a vypočítané ΔG vážené spektrum molekuly thiramu; úroveň výpočtu B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda); †posun valenční C-H vibrace CHCl_3 způsobený navázáním na molekulu thiramu	91
5.54	Nejvýznačnější vibrace molekuly thiramu	94
5.55	Ramanova spektra thiramu z vyschlých kapek roztoku v CHCl_3 o koncentraci 0,01 mg/ml (0,04 mM): a) filtr o šířce 75 cm^{-1} na pozici 556 cm^{-1} , b) inverzní filtr k filtru a); obrázek vlevo zobrazuje měřenou oblast, vpravo v nepravých barvách intenzitu signálu; nasimulovaná Ramanova spektra: c) molekuly thiramu, d) , e) , f) , h) zdegradované struktury; obrázek vlevo pohled shora, vpravo ze strany; úroveň výpočtů B3LYP/6-311++G**, cpcm(voda)	95

Seznam tabulek

4.1	Zvolené parametry při měření roztoků melaminu na Ramanově spektrometru v nízkofrekvenční oblasti	22
4.2	Zvolené parametry při měření roztoků melaminu a thiramu na Ramanově spektrometru v nízkofrekvenční a vysokofrekvenční oblasti	23
4.3	Zvolené parametry při měření polykrystalických vzorků melaminu a thiramu na Ramanově mikroskopu	24
4.4	Zvolené parametry při DCDR měření melaminu a thiramu na Ramanově mikroskopu	25
5.1	Intenzity maxim pásů pro jednotlivé komponenty polykrystalického melaminu	30
5.2	Intenzity maxim pásů pro jednotlivé komponenty polykrystalického thiramu	33
5.3	Vibrační analýza neutrální a jednou protonované formy molekuly melaminu	67
5.4	Přiřazení vibračních pásů melaminu pozorovaným v experimentálním Ramanově spektru: z prášku, z roztoku v H ₂ O o koncentraci 2,25 mg/ml a z roztoku v DMSO o koncentraci 20,15 mg/ml . . .	78
5.5	Získané konformery molekuly thiramu	85
5.6	Vibrační analýza molekuly thiramu	89
5.7	Přiřazení vibračních thiramu pásů pozorovaným v experimentálním Ramanově spektru: z roztoku v CHCl ₃ o koncentraci 100 mg/ml, z roztoku v CCl ₄ o koncentraci ≤ 100 mg/ml, z roztoku v C ₆ H ₆ o koncentraci 100 mg/ml a z prášku	93

Seznam použitých zkratek

- **1D** - jednodimenzionální
- **2D** - dvoudimenzionální
- **AFM** - mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
- **C₂H₅OH** - ethanol
- **C₆H₁₂** - cyklohexan
- **C₆H₆** - benzen
- **CCD** - Charge-coupled device
- **CCl₄** - tetrachlormethan
- **COSMO** - Conductor-like screening model
- **D₂O** - těžká voda
- **DCDR** - Ramanova mikrospektroskopie kapkově nanášených povlaků (drop coating deposition Raman)
- **DFT** - teorie hustotního funkcionálu (Density-functional Theory)
- **DMSO** - dimethylsulfoxid
- **EFSA** - Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
- **EU** - Evropská unie
- **FTIR** - infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier transform infrared (spectroscopy))
- **GTOs** - Gaussian type orbitals
- **H₂O** - voda
- **HF** - Hartree-Fock(ova metoda)
- **CH₃COCH₃** - aceton
- **CH₃OH** - methanol
- **CHCl₃** - chloroform
- **IR** - infračervený (infrared)
- **IUPAC** - Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
- **MD** - Molekulární dynamika

- **PCM** - model polarizovaného kontinua (Polarizable continuum model)
- **PES** - nadplocha potenciální energie (Potential Energy Surface)
- **PMFs** - Potential of Mean Forces
- **SCF** - self-konzistentní pole (Self-Consistent Field)
- **SERS** - povrchem zesílený Ramanův rozptyl (Surface-Enhanced Raman Scattering)
- **SNOM** - optická skenovací mikroskopie v blízkém poli (Near Field Scanning Optical Microscopy)
- **STOs** - Slater type orbitals
- **UHTS** - Ultra-High Throughput Spectrometer
- **UV** - ultrafialový (ultraviolet)
- **WHO** - Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)