

ГЛАВА 1.

Рассматриваемые вопросы

- 1. Масс-спектроскопия. Определение и применение в медицине.**
- 2. Масс-спектрометр, принцип его работы.**
- 3. Электронная ионизация. Методы ионизации**
- 4. Масс-спектр. Вид и расшифровка**

1.1. Масс-спектроскопия. Определение и применение в медицине.

Одной из основных задач, стоящих перед современной медициной, является проведение терапевтического лекарственного мониторинга в целях обеспечения оптимальной концентрации лекарственного средства в месте его действия. В первую очередь это касается антибиотиков, антиаритмических препаратов, антиконвульсантов и других препаратов, имеющих узкий терапевтический коридор (разницу между средней терапевтической и токсической дозами).

Простое измерение значений концентраций в крови пациента не всегда обеспечивает успешный результат, даже если речь идет о препарате, терапевтические рамки которого хорошо известны и можно по двум-трем измерениям рассчитать необходимую дозировку и интервалы дозирования. Для целого ряда лекарственных препаратов назначение так называемых средних доз без учета знания концентрации препарата в крови может приводить к непредсказуемым последствиям. Изменение концентрации лекарственного препарата в крови может быть вызвано взаимодействием с другими препаратами, пищей, депонированием в тканях, изменением метаболизма. В связи с этим, своевременная информация об изменении концентрации лекарственного препарата в крови или в других жидких биологических пробах позволит лечащему врачу скорректировать терапевтическое лечение.

Основным способом регистрации фармакокинетики и проведения терапевтического лекарственного мониторинга является **масс-спектрометрия** – наиболее совершенный в настоящее время метод анализа состава вещества. Масс-спектрометры обладают высокой чувствительностью, динамическим диапазоном и разрешением. Это позволяет проводить, например, анализ примесей при их относительном содержании менее 10^{-9} , определять элементный и изотопный состав пробы с большой точностью.

Применение масс-спектрометрии в биохимии и затем в медицине, бурно развивающееся в последние два десятилетия, привело к революции в этих науках, а создание нового масс-спектрометрического метода анализа сложных биоорганических соединений посредством десорбции ионов из органической матрицы импульсным лазерным излучением (МАЛДИ) было отмечено Нобелевской премией по химии за 2002 год.

Метод масс-спектропии – метод исследования и анализа веществ, основанный на ионизации атомов и молекул вещества и последующем разделении образующихся ионов в соответствии с их массовым числом m/z - отношением массы иона к его заряду – в электрическом или магнитном поле. Преимущество метода заключается в том, что для анализа достаточно очень малое количество вещества, а основной недостаток заключается в том, что метод является разрушающим, т.е. исследуется не само вещество, а продукты его превращения. Сам метод масс-спектропии не относится к спектроскопическим, поскольку в его составе нет взаимодействия вещества с электромагнитным излучением, но внешний вид графического распределения ионов по массовым числам – зависимость интенсивности ионного тока от отношения массы к заряду – напоминает спектр, поэтому и получил название масс-спектр, а сам метод – масс-спектрометрия.

1.2. Масс-спектрометр, принцип его работы.

Масс-спектрометр – это вакуумный прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, и необходимый для получения масс-спектра.

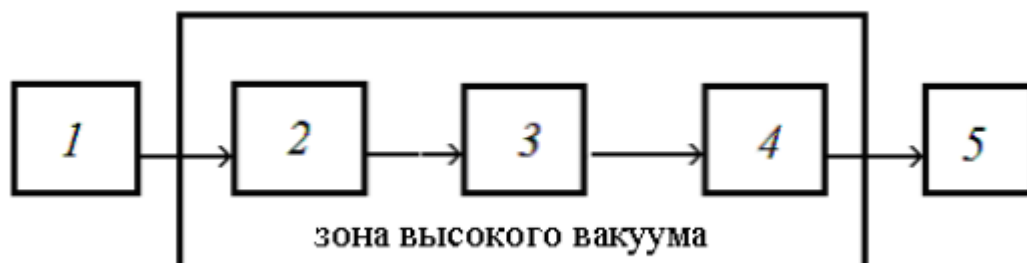


Рис.1.Блок-схема масс-спектрометра

(1 – система ввода, 2 – источник ионизации с ускорителем ионов, 3 – масс-анализатор, 4 – детектор, 5 – измерительное или регистрирующее устройство)

Принцип работы прибора заключается в следующем: пробу вводят в источник ионизации, где молекулы ионизируются. Образующиеся положительные ионы выводят из зоны ионизации, ускоряются электрическим полем и одновременно фокусируются в пучок. Нейтральные молекулы удаляются вакуум-насосом. Поток ускоренных ионов попадает в масс-анализатор, где ионы разделяются по массе. Разделенные пучки ионов попадают в детектор, где ионный ток преобразуется в электрический сигнал, который усиливается и регистрируется.

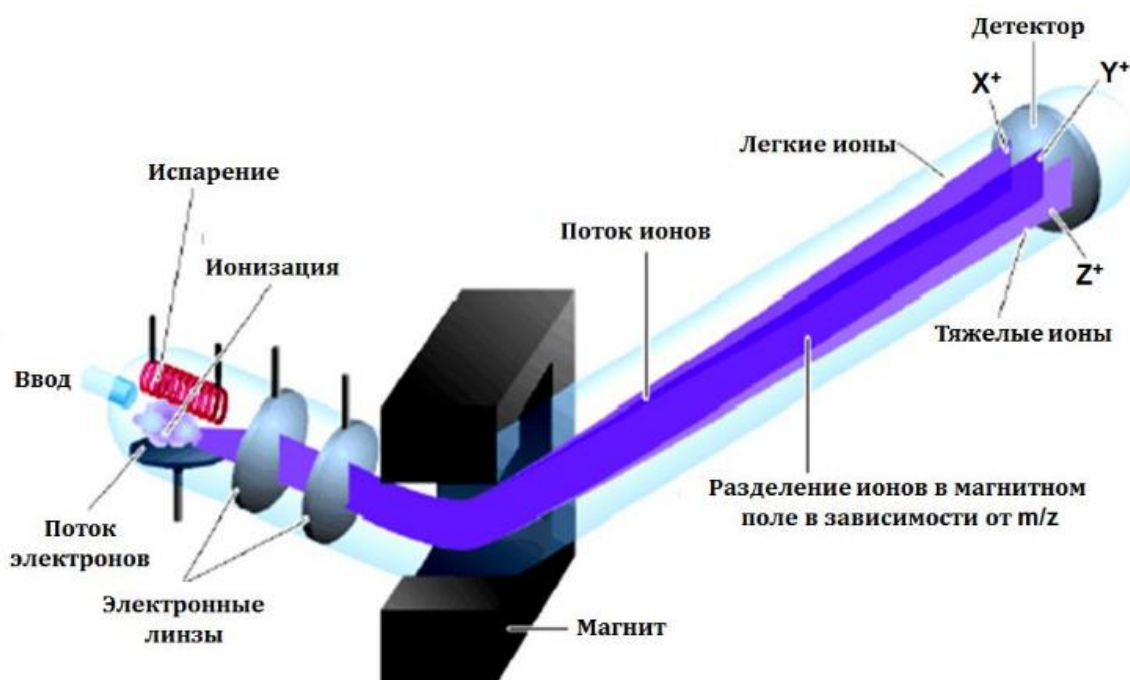


Рис. 2. Принцип работы масс-спектрометра

1.3. Электронная ионизация. Способы ионизации.

Электронный удар, или, правильнее – электронная ионизация – это ионизация паров вещества потоком электронов, разогнанных в электрическом поле. При этом электрон, пролетая рядом или через молекулу ионизируемого вещества, не захватывается ею, а передает часть своей энергии, что приводит к «возбуждению» молекулы, отрыву от нее одного или нескольких электронов с образованием положительного иона M^+ , а также, в зависимости от энергии ионизирующих электронов, к разрыву связей в ионизируемой молекуле – к ее фрагментации.

Способы ионизации атомов и молекул зависят от цели анализа и подразделяются на следующие виды:

- Электронный удар (электронная ионизация)
- Химическая ионизация
- Электроспрей (электрораспыление)
- Лазерное излучение
- Бомбардировка пучком ионов

Электронная ионизация применяется для изотопного и молекулярного анализа неорганических ионов. Анализ органических соединений проводится с помощью химической ионизации, а крупные молекулы анализируются с помощью лазерного излучения, бомбардировки пучком ионов или электрораспылением.

В зависимости от физического состояния анализируемого вещества, применяют следующие методы ионизации:

1. Для газовой фазы

- электронная ионизация (EI)
- химическая ионизация (CI)
- электронный захват (EC)
- ионизация в электрическом поле (FI)

2. Для жидкой фазы

- фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)
- электроспрей (APESI)
- термоспрей
- ионизация при атмосферном давлении (AP)
- химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)

3. Для твердой фазы

- прямая лазерная десорбция – масс-спектрометрия (LDMS)
- матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI)
- масс-спектрометрия вторичных ионов (SIMS)
- бомбардировка быстрыми атомами (FAB)
- десорбция в электрическом поле (FD)
- плазменная десорбция (PD)

Исторически первые методы ионизации были разработаны для газовой фазы. Однако многие органические вещества невозможно испарить без разложения, т.е. их нельзя ионизировать электронным ударом. К таким веществам относят почти, что составляет живую ткань (белки, ДНК), физиологически активные вещества, полимеры. На разработку способов

ионизации органических соединений были затрачены значительные усилия, однако из всего их многообразия только два реально обеспечили возможность анализа жидкостей и используются в современных масс-спектрометрических комплексах:

- Ионизация при атмосферном давлении (электроспрей, химическая ионизация при атмосферном давлении)
- Ионизация лазерной десорбцией (MALDI)

Метод электронного удара широко применяется для ионизации органических соединений. Сущность метода заключается в следующем: пары образца бомбардируют ускоренными электронами. При столкновении электронов с органической молекулой вначале образуется катион-радикал $M + e \rightarrow M^+ + 2e$

Затем происходит его распад (фрагментация), и образуются дочерние ионы с меньшими массами.

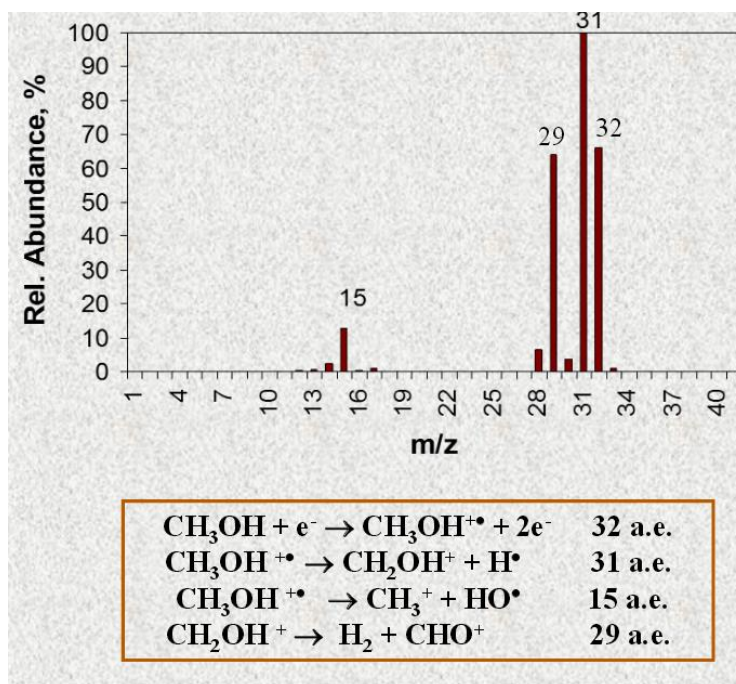


Рис.3. Масс-спектр метанола.

Достоинства заключаются в том, что метод ионизации электронным ударом дает богатые фрагментами масс-спектры, которые однозначно характеризуют структуру молекулы, что удобно для идентификации веществ.

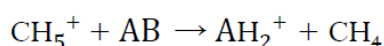
Масс-спектрометрия электронного удара - высокочувствительный метод анализа, позволяет анализировать пикомольные количества вещества. Существуют "библиотеки" масс-спектров, содержащие спектры более 70000 органических соединений, по которым можно проводить их идентификацию с применением ЭВМ.

Основные недостатки метода заключаются в том, что молекулярные ионы образуются лишь у 20% органических соединений, и он применим только для определения легколетучих термически стабильных соединений. Ионы с большими значениями m/z , дающие информацию о молекулярной массе и наличии функциональных групп обеспечивают небольшой вклад в значения полного ионного тока. Отрицательно заряженные ионы, имеющие большое значение в структурном анализе, образуются в очень небольшом количестве и ограниченным числом органических соединений

Химическая ионизация - более мягкий способ ионизации. Пары пробы смешивают с большим избытком газа-реагента (метан, изобутан, аммиак или NO), газ-реагент ионизируют действием электронного удара. Ионизация молекул газа происходит за счет электронной ионизации с дальнейшим химическим превращением газа-ионизатора. Сталкиваясь с молекулами образца, ионизированные молекулы газа передают свой заряд в виде протона исследуемой молекуле:

- CH_4 : CH_4^+ , CH_3^+ , CH_2^+
- $\text{CH}_4^+ + \text{CH}_4 = \text{CH}_5^+ + \text{CH}_3$
- $\text{CH}_3^+ + \text{CH}_4 = \text{CH}_5^+ + \text{H}_2$
- $\text{CH}_2^+ + \text{CH}_4 = \text{C}_2\text{H}_3^+ + \text{H}_2 + \text{H}$
- $\text{C}_2\text{H}_3^+ + \text{CH}_4 = \text{C}_3\text{H}_5^+ + \text{H}_2 \dots$

Определяемые молекулы АВ ионизируются непосредственно ионами реагентного газа за счет ряда реакций, например:



Далее протонированная молекула образца выталкивается электрическим полем в сторону масс-анализатора.

Основные достоинства:

1. Мягкий метод ионизации, молекуле образца передается около 5 эВ избыточной энергии, что препятствует процессам фрагментации и позволяет подвергать анализу нестойкие молекулы
2. Интенсивный пик молекулярного иона, что позволяет определить молекулярную массу

Недостатки:

1. Отсутствие фрагментации, очень простые масс-спектры, что не позволяет судить о структуре вещества и сравнить спектр с базами масс-спектральных данных
2. Возможно провести анализ только тех соединений, которые можно перенести в газовую фазу (испарить)

Еще один из методов ионизации – это электроспрей или электрораспыление. Вещество на ионизацию поступает в полярном растворителе (вода, метанол, ацетонитрил и др.), содержащем ионы водорода и катионы щелочных металлов (натрий, калий), через металлический капилляр (распылитель), к которому приложено высокое напряжение. Продвигаясь в электрическом поле капля раствора испаряется под действием нагретого потока инертного газа (азот) и распадается на ряд мелких положительно заряженных капель, которые попадают в масс-анализатор. Данный метод позволяет работать с веществами, которые нельзя перевести в газовую фазу и его удобно применять для сочетания масс-спектрометра с жидкостным хроматографом. Также он дает возможность анализа крупных молекул (до нескольких млн Да) и мягкое (низкоэнергетическое) ионизационное воздействие. Однако вещество должно быть растворимо в полярных растворителях. Получаемый масс-спектр малоинформативен, как правило, присутствуют лишь пики комплексов

молекулярного иона с катионом (H^+ , Na^+ , K^+), многозарядных ионов таких комплексов.

В последнее время широко используется матричная лазерная десорбция – метод, при котором исследуемое вещество помещают в «матрицу» - перемешивают с веществом, имеющим меньший молекулярный вес и обладающим высокой способностью поглощать лазерное излучение (например, коричневая кислота, 3-гидроксипиколиновая кислота, 6,7-гидроксикумарин и т.д.). Перемешивание происходит при помощи растворения вещества-образца и вещества матрицы в одном растворителе и последующем испарении растворителя на специальной подложке. Далее смесь на подложке помещают в прибор и облучают короткими лазерными импульсами. Вещество матрицы испаряется и захватывает с собой молекулы исследуемого вещества, которые частично ионизируются и увлекаются электрическим полем в масс-анализатор.

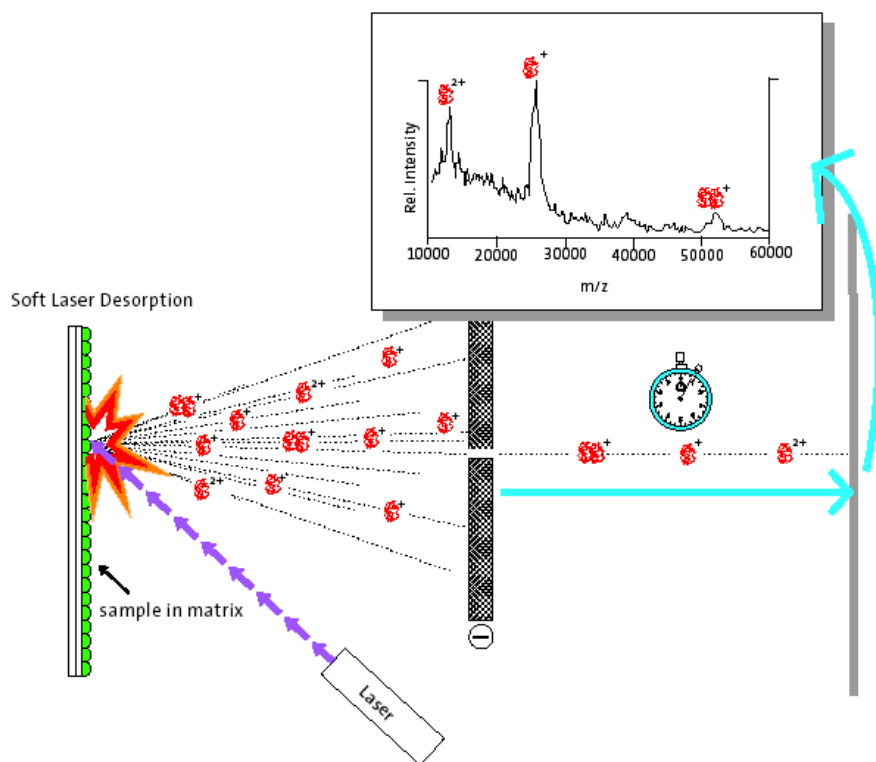


Рис. 4. Масс-анализатор

Данный метод позволяет анализировать крупные молекулы (массой до 100 000 дальтон и выше) и загрязненные примесями образцы. Но в получаемом масс-спектре – присутствуют лишь пики молекулярного иона и его

«мультимеров» - частиц, состоящих из нескольких молекул образца с зарядом +1.

Масс-спектрометрические анализаторы подразделяют на несколько типов:

1. Магнитный анализатор
2. Электрический анализатор
3. Квадрупольный анализатор
4. Времяпролетный анализатор
5. Ионная ловушка

Важный параметр масс-спектрометрических приборов – разрешение (разрешающая способность).

Разрешение масс-спектрометра (R) – это возможность получать на данном приборе отдельный сигнал от двух ионов, с массами m и $(m+\Delta m)$:

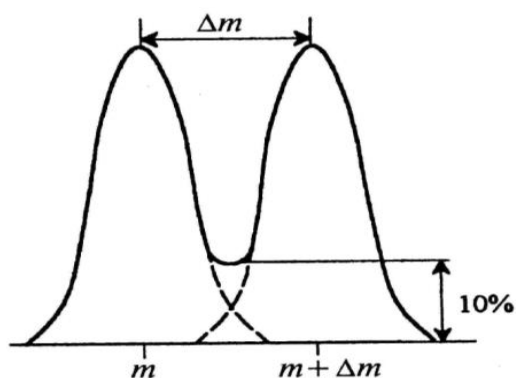


Рис.5. Сигнал двух ионов

Масс-спектрометрия высокого разрешения (МСРВ, HRMS – High Resolution Mass-Spectrometry) позволяет разделить и точно измерить массовые значения пиков, соответствующих одной целочисленной массе.

Примером такого является мультиплет с целочисленной массой 28. Это может быть монооксид углерода CO , азот N_2 , этилен C_2H_4 . Поскольку за стандарт принят основной изотоп углерода ^{12}C (12.000000), массы всех остальных изотопов элементов не целые числа: масса основного изотопа

водорода ^1H 1.00782506, азота ^{14}N 14.00307407, кислорода ^{16}O 15.99491475 и т.д. Тогда массы CO - 27.9949, N_2 - 28.0061, C_2H_4 - 28.0313.

1.4. Масс-спектр. Вид и расшифровка

Масс-спектр может состоять из нескольких типов ионов:

1. Молекулярный ион - молекула с положительным зарядом (катион-радикал), полученным за счёт отрыва одного электрона от нейтральной молекулы.
2. Основной ион - ион, интенсивность которого в масс-спектре максимальна
3. Фрагментные ионы - ион, образующийся при распаде молекулярного иона с разрывом связей и миграцией атомов.
4. Двухзарядный ион – ион, имеющий двойной положительный заряд за счёт потери двух электронов. В масс-спектре такие ионы регистрируются как частицы с массой формально в два раза меньшей.
5. Метастабильный ион – ион, с формальной массой $= m_2 * m_2 / m_1$, получающийся при распаде иона с массой m_1 на ион меньшей массы m_2 в процессе движения в магнитном поле масс-спектрометра. Регистрируются в виде широких низко интенсивных пиков.

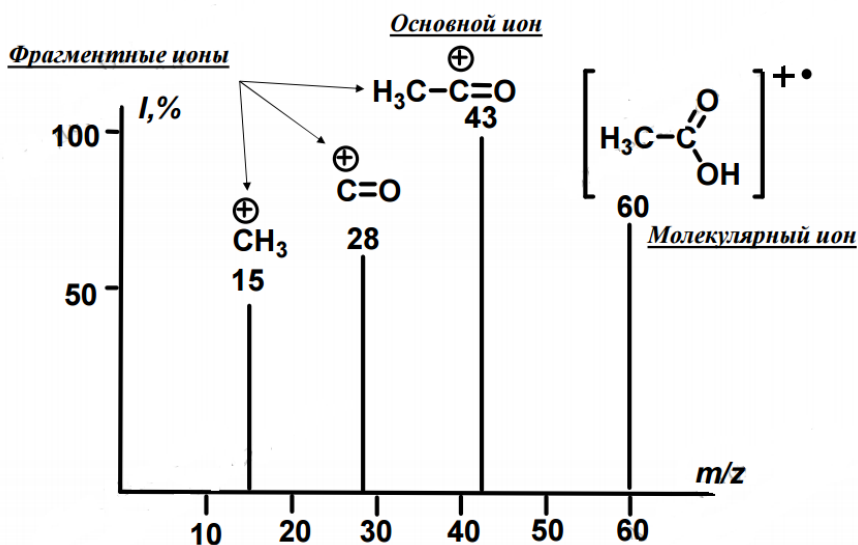


Рис.6. Масс-спектр уксусной кислоты

Интенсивности ионов в масс-спектрах зависят от двух параметров:

1. энергия ионизирующих электронов;
2. температура, при которой происходит ионизация.

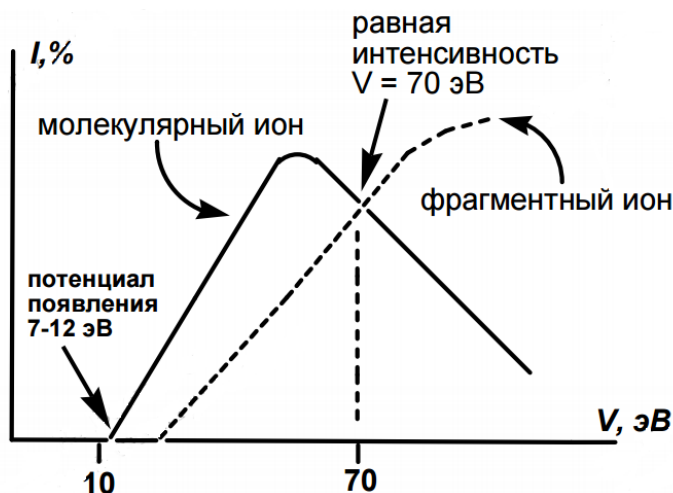
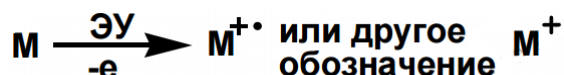


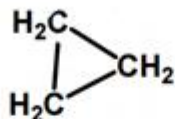
Рис.7. График зависимости интенсивности пиков ионов I от энергии ионизирующих электронов V

При анализе области пика молекулярного иона пользуются несколькими правилами.

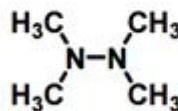


1. Интенсивность пика молекулярного иона IM^+ определяется устойчивостью молекулярного иона M^+ . Структурные фрагменты, способствующие стабилизации заряда – системы – ведут к увеличению IM^+ .
2. Азотное правило. Органические соединения, состоящие из основных атомов органических соединений $C, H, N, S, P, Si, F, Cl, Br, I$, имеют чётную молекулярную массу, если в их структуре не содержится атомов азота или число атомов азота чётное ($N = 0, 2, 4, \dots$). Нечётной молекулярной массой обладают соединения с нечётным количеством атомов азота ($N = 1, 3, 5, \dots$) в структуре.

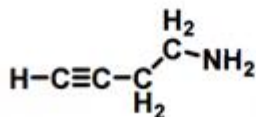
Примеры на азотное правило:



$M = 42$ (чётная) - нет азота



$M = 88$ (чётная) - два атома азота



$M = 69$ (нечётная) - один атом азота

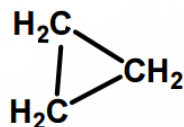
3. Правило «формальной неопределённости» – «число колец + число двойных связей»

$$X = (2C - H) / 2 + 1$$

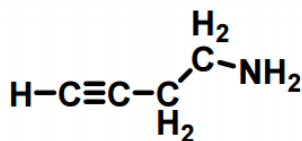
X – «число колец + число двойных связей» в молекуле

C, H, N – число углеродных, водородных (или др. одновалентных) и азотных атомов в молекуле

Примеры на правило «формальной неопределённости» :



$$X = \frac{2 \times 3 - 6 + 0}{2} + 1 = 1 \quad \text{одно кольцо}$$



$$X = \frac{2 \times 4 - 7 + 1}{2} + 1 = 2 \quad \begin{array}{l} \text{тройная связь} \\ \text{— две } \pi\text{-связи} \end{array}$$



$$X = \frac{2 \times 6 - 6 + 0}{2} + 1 = 4 \quad \begin{array}{l} \text{одно кольцо и три} \\ \text{двойных связи} \end{array}$$

4. Данные масс-спектрометрии высокого разрешения – измерение точной массы иона до 4 – 6 знака после запятой. CO $M = 28$, точная масса $M = 27.994915$ CH₂=CH₂ $M = 28$, точная масса $M = 28.03300$ N₂ $M = 28$, точная

масса $M = 28.006148$ Эти вещества можно различить только с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения.

5. Изотопный состав и характеристические группы ионов. Любой ион в масс-спектре представлен кластером пиков из-за наличия изотопов элементов



Рис. 8. Изотопный состав

Таблица 1.

Изотопы основных элементов органогенов.

| Изотопы | Атомная масса | Естественная природная распространённость |
|------------------|---------------|---|
| ^1H | 1.0078 | 99.98 |
| ^2H | 2.0141 | 0.02 |
| ^{12}C | 12.000 | 98.93 |
| ^{13}C | 13.0034 | 1.07 |
| ^{14}N | 14.0031 | 99.63 |
| ^{15}N | 15.0001 | 0.37 |
| ^{16}O | 15.9949 | 99.76 |
| ^{17}O | 16.9991 | 0.04 |
| ^{18}O | 17.992 | 0.20 |
| ^{35}Cl | 34.9689 | 75.53 |

| | | |
|------------------|---------|-------|
| ³⁷ Cl | 36.9659 | 24.47 |
| ⁷⁹ Br | 78.9183 | 50.52 |
| ⁸¹ Br | 80.9163 | 49.48 |
| ³² S | 31.9721 | 95.03 |
| ³³ S | 32.9715 | 0.75 |
| ³⁴ S | 33.9679 | 4.22 |

Интенсивность пика M+1 (I_{M+1}) относительно интенсивности пика M+ (I_{M+}) определяется в основном вкладом изотопа ¹³C :

$$\frac{I_{M+1}}{I_{M+}} = \frac{1,07}{98,93} \times n_C \times 100\% + \text{малые вклады изотопов } H, N, O \approx 1,08 \times n_C$$

n_C – число атомов углерода в молекуле

Приближённая формула для расчёта числа атомов углерода в молекуле:

$$n_C = \frac{(I_{M+1}/I_{M+})\%}{1,1}$$

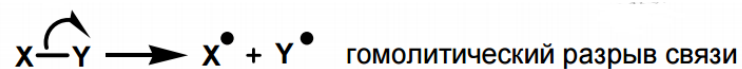
Эта формула верна для соединений, не содержащих атомов серы и большого количества атомов азота.


Основные этапы интерпретации масс-спектров соединений

1. Найти молекулярный ион. Проанализировать область пика молекулярного иона.
2. Отметить основные самые интенсивные пики масс-спектра.
3. Выделить и проанализировать пики с характерным изотопным составом.
4. Найти и интерпретировать пики, обусловленные выбросом небольших нейтральных частиц из молекулярного иона.
5. Определить и интерпретировать пики, соответствующие лёгким характеристическим фрагментным ионам.
6. Интерпретировать спектр с использованием всей дополнительной информации: химической и спектральной.

Существуют основные закономерности фрагментации органических соединений в масс-спектрометрии с электронным ударом

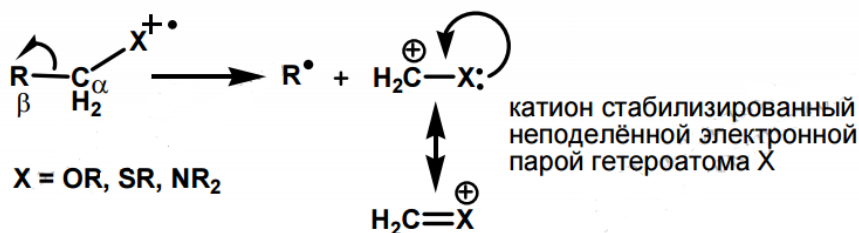
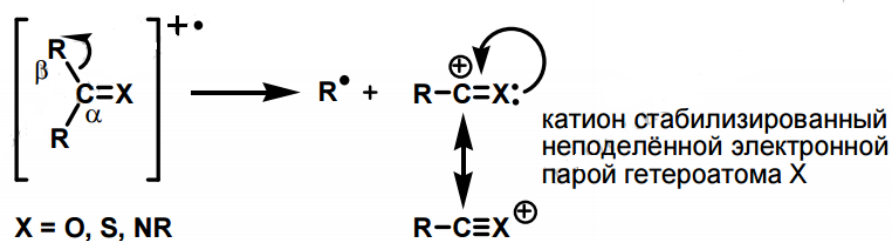
Обозначения:



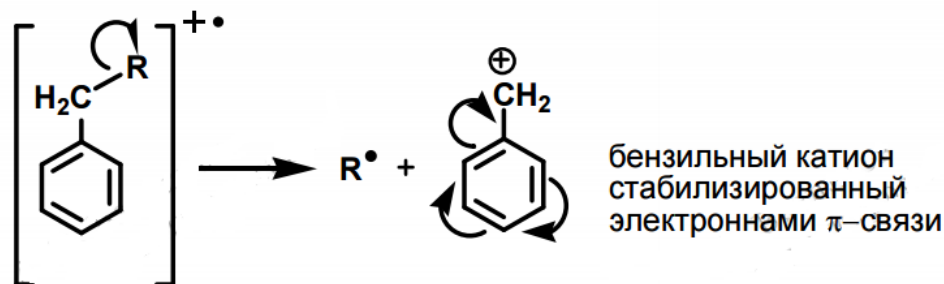
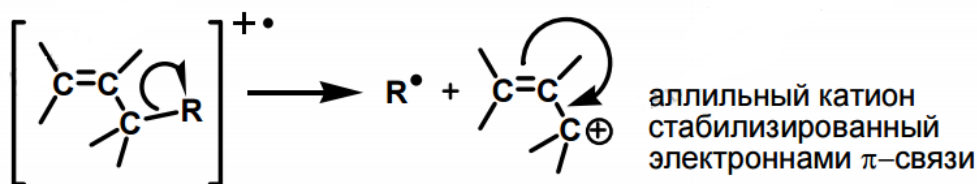
 стрелка с одним "усиком" - перемещение одного электрона

Направления фрагментации молекул органических веществ определяются образованием наиболее стабильных катионных частиц.

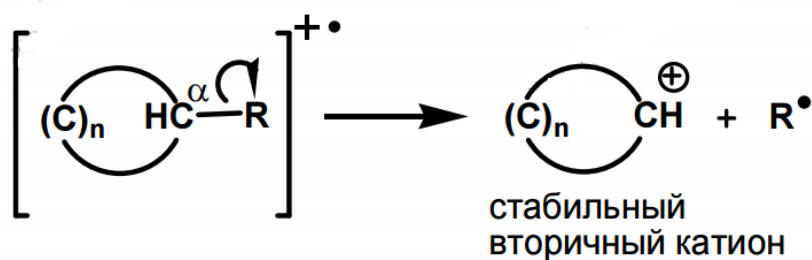
1. Разрыв связи соседней с гетероатомом β - α .



2. Разрыв C-C связи в аллильном (бензильном) положении.



3. Разрыв α -связи в циклических системах.



4. Перегруппировка Мак-Лафферти. Протекает при наличии атома водорода в γ -положении к группе $C=X$

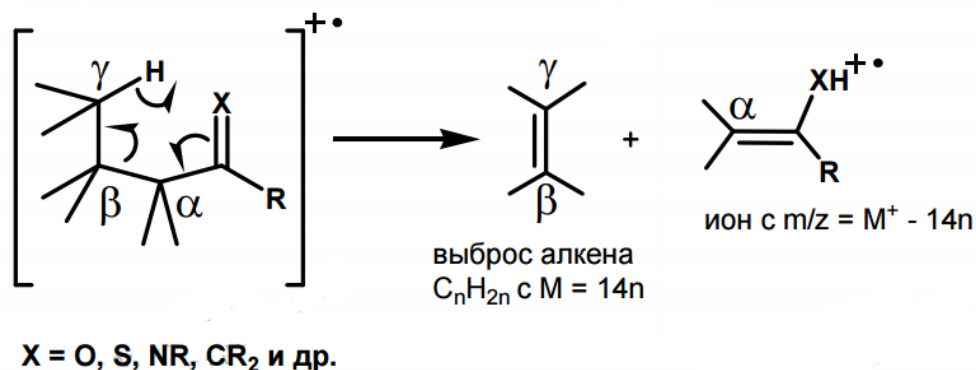


Таблица 2.

Некоторые нейтральные фрагменты R, элиминируемые молекулярными ионами: $K^+ + R \rightarrow M^+$

| Элиминируемый фрагмент R | | Возможный источник элиминируемого фрагмента |
|--------------------------|-------------------------------|--|
| масса, а.е.м. | состав | |
| 1 | H | углеводородные остатки |
| 2 | H ₂ | |
| 15 | ·CH ₃ | |
| 16 | ·NH ₂ | RCONH ₂ амиды |
| | O | RNO ₂ нитро-, R ₂ SO ₂ сульфоны |
| 18 | H ₂ O | спирты, альдегиды, карбоновые кислоты |
| 26 | C ₂ H ₂ | ароматические соединения |
| 28 | C ₂ H ₄ | перегруппировка Мак-Лафферти |
| 29 | ·CHO | альдегиды |
| 43 | ·CH ₃ CO | метилкетоны |

| | | |
|----|--------------------------------|----------------------|
| 45 | ·CO ₂ H | карбоновые кислоты |
| 57 | ·C ₄ H ₉ | алканы, алкилбензолы |

В масс-спектрах маловероятно отщепление фрагментов с массами 5-14 и 19-20 (кроме фторидов). Наличие таких фрагментов может свидетельствовать о примесях в анализируемом образце.

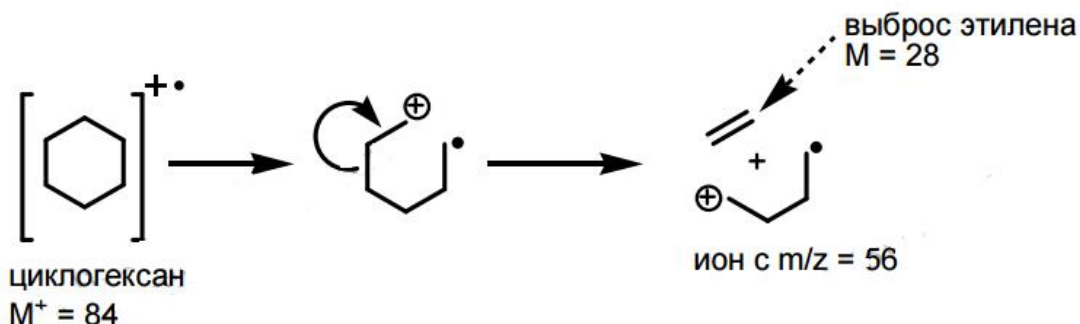
Масс-спектрометрическая характеристика различных классов органических соединений

1. Алканы

Обычно дают малоинтенсивные пики M⁺. В масс-спектрах характерно присутствие гомологичных ионов [C_nH_{2n+1}]⁺. Самые интенсивные пики m/z 43 [C₃H₇]⁺ и m/z 57 [C₄H₉]⁺.

2. Циклоалканы

Характерно наличие интенсивных пиков M⁺. Обычный путь фрагментации – выброс молекулы алкена.



3. Алкены и алкины

Пики M⁺ обычно более интенсивны, чем у алканов. В масс-спектрах характерно присутствие гомологичных ионов [C_nH_{2n-1}]⁺ и [C_nH_{2n-3}]⁺. Распад молекул сопровождается перегруппировками с миграцией кратной связи.

4. Спирты

Молекулярные ионы M⁺ образуются при потере электрона от неподелённой электронной пары атома кислорода. Основные пути распада: - элиминирование молекулы H₂O; разрыв α-β- связи.

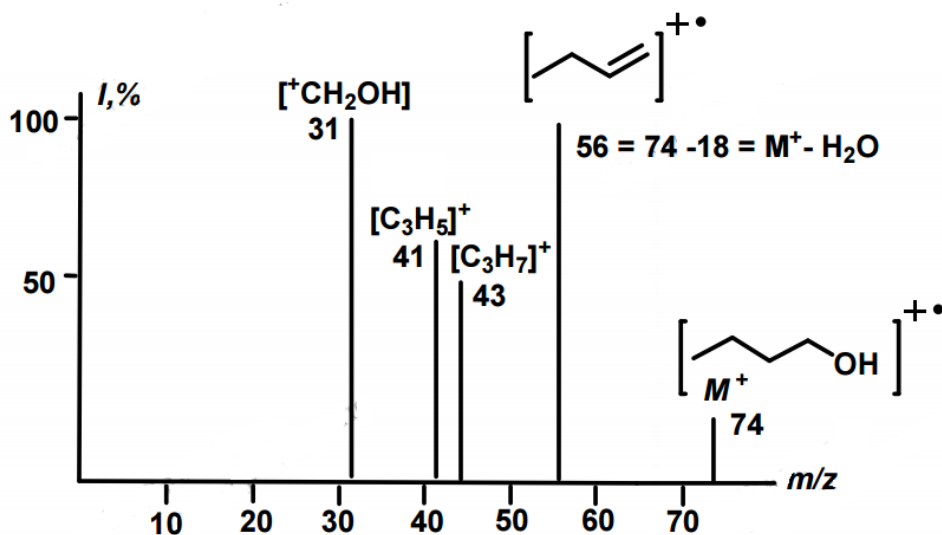
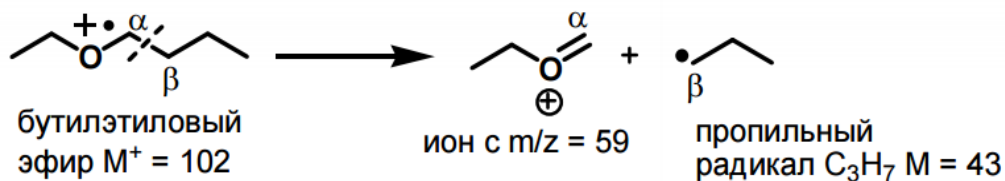


Рис.9. Масс-спектр бутанола-1

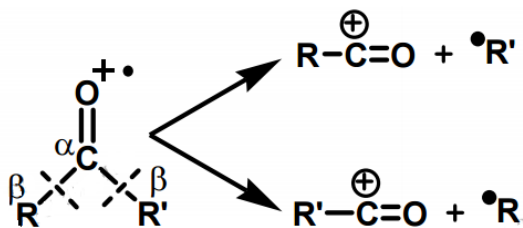
5. Простые эфиры

Характерен разрыв α - β связи:

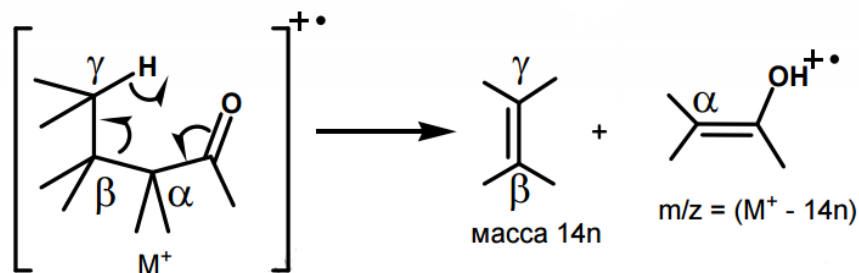


6. Альдегиды и кетоны

Характерен разрыв α - β связи с образованием ацильных катионов:



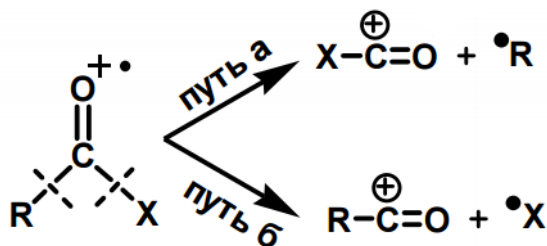
Для альдегидов и кетонов характерна перегруппировка Мак-Лафферти:



7. Карбоновые кислоты и их производные

Основные пути распада молекулярных ионов: путь а: $X = OH, NH_2$;

путь б: X = OR, NHR, NR₂, Hal



Для карбоновых кислот и их производных характерна перегруппировка Мак-Лафферти.

8. Ароматические соединения

Характерно образование стабильных высоко интенсивных молекулярных ионов M^+ . В масс-спектрах производных бензола содержатся характеристичные пики с m/z 78-76, 65-63, 52-50, 39-37. Характер масс-спектрометрического распада аренов определяется заместителями в ароматическом кольце.

Контрольные вопросы

1. Каким образом применяется метод масс-спектрометрии в медицине
2. Дайте определение данного метода
3. Что такое масс-спектрометр? В чем состоит принцип его работы
4. Электронная ионизация, основные виды
5. Какие типы ионов присутствуют в масс-спектре

ГЛАВА 2. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

Входные вопросы

1. Явление ядерного магнитного резонанса
2. Протонный магнитный резонанс (ПМР), или ЯМР ¹H
3. Основные характеристики спектров
 - 3.1 Химический сдвиг
 - 3.2 Спин-спиновое взаимодействие
 - 3.2.1 Константа спин-спинового взаимодействия

3.3 Интенсивность сигнала

4. Спектроскопия ^{13}C ЯМР

4.1 Спин-спиновые взаимодействия в ^{13}C ЯМР спектроскопии

5 Примеры идентификации различных классов соединений с использованием спектроскопии

2.1. Явление ядерного магнитного резонанса.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса – вид спектроскопии, которая регистрирует переходы между магнитными энергетическими уровнями атомных ядер, вызываемые радиочастотным излучением. Только ядра со спиновым квантовым числом I , отличным от «0», могут вызывать сигнал ЯМР, или быть активными в ЯМР. Спиновое квантовое число ядра определяется числом протонов и нейтронов в ядре. Существует эмпирическое правило:

- 1) I равно «0» для ядер с четным числом протонов и нейтронов;
- 2) I равно целым числам (1, 2, 3...) для ядер с нечетными числами протонов, и нейтронов;
- 3) I равно полуцелым числам ($1/2$, $3/2$, $5/2$ и т.д.) для ядер с четными числами протонов и нечетными числами нейтронов и наоборот.

В приложенном магнитном поле с напряженностью H_0 ядро со спиновым числом I может принимать $2I + 1$ ориентаций (или занимать $2I + 1$ энергетических уровней). Количество энергии, на которое отличаются эти уровни (разность энергий уровней), возрастает с возрастанием H_0 , однако при данном значении H_0 разность энергий между двумя соседними уровнями есть величина постоянная. Разность энергий двух соседних уровней ΔE определяется выражением: $\Delta E = H_0 \gamma \hbar / 2\pi$ где γ – гиромагнитное (магнитогирическое) отношение, постоянное для данного изотопа; H_0 - напряженность внешнего магнитного поля; \hbar - постоянная Планка.

В сущности, эксперимент ЯМР состоит в том, чтобы сообщить энергию ядру и перевести его с одного энергетического уровня на другой, более высокий уровень. Поскольку точное значение ΔE зависит от молекулярного окружения возбуждаемого ядра, имеется возможность связать величину ΔE со строением молекулы и в конечном итоге определить структуру всей молекулы.

Из ядер атомов, наиболее часто встречающихся в органических соединениях, магнитным моментом обладают изотопы ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N , ^{17}O . Спектроскопия ЯМР используется для регистрации сигналов данных ядер. Наибольшее распространение в исследовании органических веществ имеет спектроскопия протонного магнитного резонанса (ПМР, ЯМР ^1H) и ЯМР на ядрах изотопа ^{13}C (ЯМР ^{13}C).

2.2. Протонный магнитный резонанс (ПМР), или ЯМР ^1H .

Для исследования с помощью ЯМР спектроскопии, как правило, вещество растворяют в подходящем растворителе (однако ЯМР-анализ можно проводить и в твердой фазе). Для анализа необходимо $\sim 10\text{-}20$ мг образца. Приготовленный раствор помещают в ампулу объемом ~ 0.5 мл и диаметром 5 мм.

Ампулу с образцом помещают между полюсами сильного магнита. В магнитном поле протоны мгновенно ориентируются в направлении поля H_0 (подобно маленьким стержневым магнитам). В первый момент после внесения образца число ядер, ориентированных вдоль поля и против поля, одинаково (50% на 50%) (рис.3).

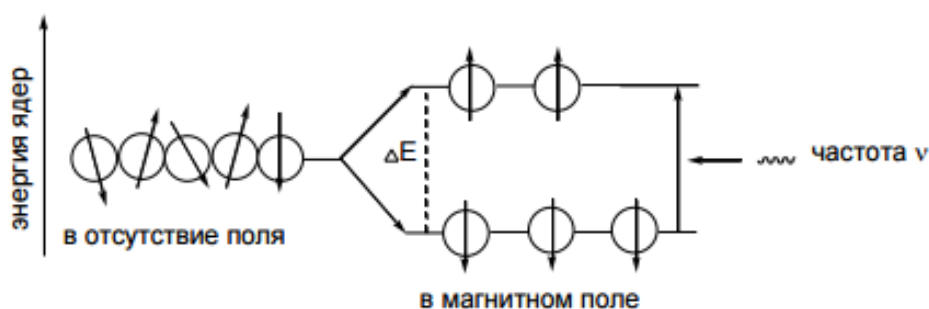


Рис. 10. Ориентация протонов под действием внешнего магнитного поля H_0 .

Вследствие обмена энергией между системами ядер («спинов») и их окружением («решеткой») число ядер на нижнем энергетическом уровне достаточно быстро возрастает до величины, чуть большей 50%. Протоны, ориентированные вдоль поля, находятся в более низком энергетическом состоянии, чем протоны, ориентированные против магнитного поля. Должна существовать такая частота электромагнитного излучения, которая окажется равной разности энергий между более высоким энергетическим состоянием ядра (ориентация против H_0) и более низким его состоянием (ориентация вдоль H_0). Если на ядро воздействовать именно этой частотой, оно будет взаимодействовать с излучением и изменит свое энергетическое состояние. Те ядра, которые находились в более высоком энергетическом состоянии, перейдут на нижний уровень, и наоборот. Однако, поскольку на нижнем энергетическом уровне существует некоторый избыток ядер, в более высокое энергетическое состояние перейдет большее число ядер, и в результате взаимодействия ядер с излучением данной частоты произойдет поглощение электромагнитного излучения. Именно это поглощение и вызывает сигнал ЯМР. Точное значение частоты, которая вызывает переходы между энергетическими уровнями данного ядра, называется резонансной частотой этого ядра.

2.3. Основные характеристики спектров.

Основными характеристиками спектров ЯМР являются:

- химический сдвиг,
- мультиплетность,
- константа спин - спинового взаимодействия;
- площадь сигнала резонанса.

Эти характеристики зависят от химического окружения данного ядра или группы ядер, от числа соседних ядер, обладающих магнитным моментом, от

их относительного расположения, а также от числа анализируемых ядер в различных структурных фрагментах молекулы

2.3.1. Химический сдвиг.

Разность положения сигнала данного протона и положение сигнала стандарта называется химическим сдвигом данного протона. В качестве стандарта чаще всего используют тетраметилсилан (ТМС) $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Запись ЯМР-спектра проводят таким образом, чтобы H_0 возрастало слева направо. При этом химический сдвиг сигнала ТМС принимают за ноль, и регистрируется в наиболее сильном поле (правая часть спектра). В практике ЯМР-анализа химический сдвиг выражают в миллионных долях (м.д.) и обозначают символом « δ ». Химические сдвиги не зависят от рабочей частоты спектрометра: $\delta = \Delta\nu \cdot 10^6 / \text{рабочая частота прибора, (Гц)}$ Оказалось, что химические сдвиги протонов органических соединений различных классов лежат в разных областях и, таким образом, по положению сигнала ЯМР можно определить строение вещества.

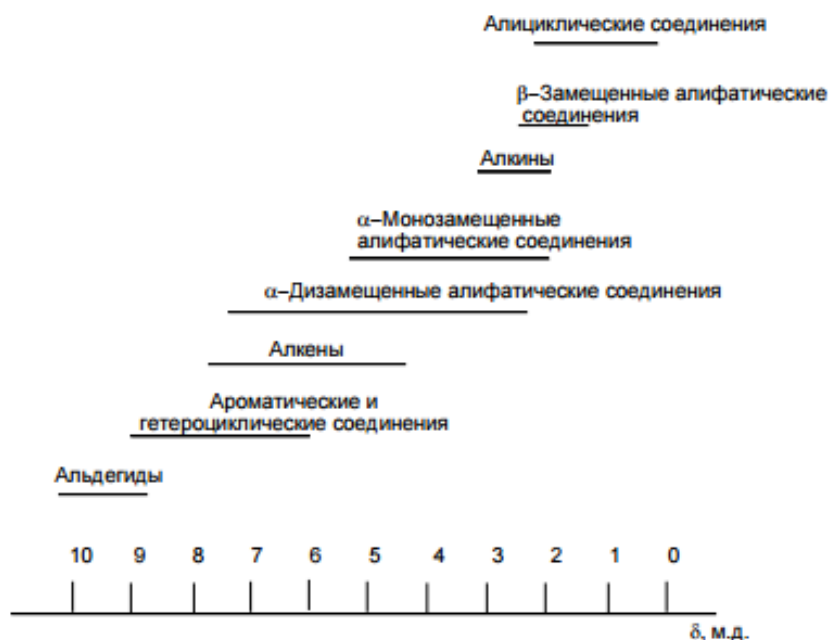


Рис.11. Обобщенные области химических сдвигов протонов.

Характерный пример - спектр ^1H ЯМР метил-трет-бутилового эфира. Он представляет собой 2 сигнала с химическими сдвигами 3.21 и 1.19 м.д.:

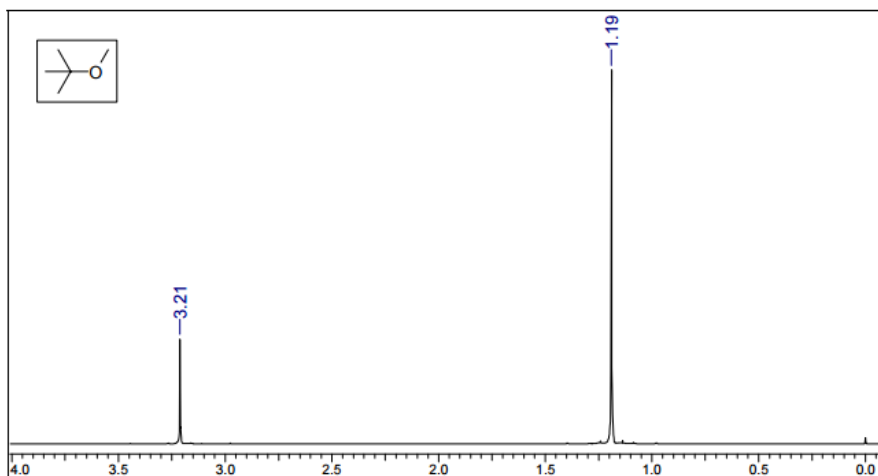


Рис.12. ^1H ЯМР спектр (а) метил-трет-бутилового эфира

Очень важным практическим моментом использования ^1H ЯМР - спектроскопии является то, что интенсивность каждого сигнала (площадь соответствующего пика) пропорциональна числу протонов каждого типа (их называют эквивалентными), что во многих случаях позволяет использовать спектроскопию ^1H ЯМР наряду с другими методами для установления молекулярных формул соединений. В данном случае с использованием процедуры интегрирования мы получаем следующий спектр:

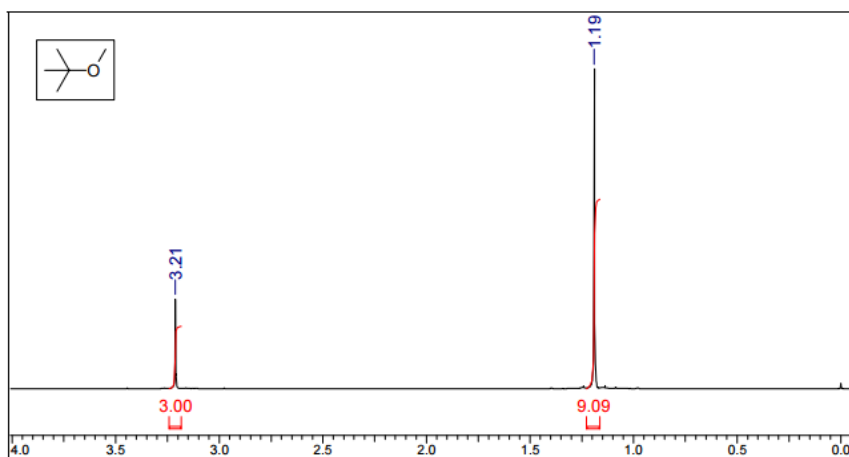


Рис.13. ^1H ЯМР спектр (б) метил-трет-бутилового эфира

Сигнал при 3.21 м.д. с интегралом 3 соответствует группе $-\text{OCH}_3$, а сигнал при 1.19 м.д. с интегралом 9 - протонам трет-бутильной группы.

2.3.2. Спин-спиновое взаимодействие. Константа спин-спинового взаимодействия.

Сигналы протона (группы протонов) в спектре могут быть представлены в виде одиночной линии (такой сигнал называется «синглет») или в виде групп линий. Если сигнал представлен в виде двух линий определенной интенсивности – сигнал называется «дублет»; в виде трех линий – «триплет», в виде четырех линий – «квадруплет», или «квартет». Сигнал может быть представлен группой из шести и более линий, в этом случае говорят о мультиплете.

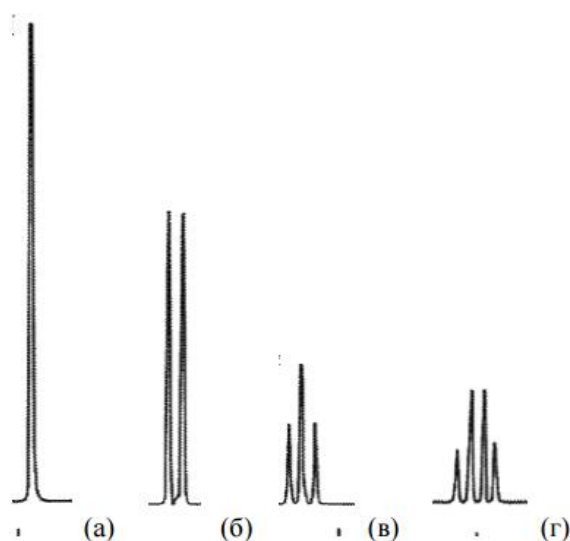


Рис.14. Сигналы протона (группы протонов)

Каждая линия любого мультиплета будет отстоять от соседних линий того же мультиплета на одно и то же число герц.

Рассмотрим ^1H ЯМР спектр (E)- $\text{ClCH}=\text{CHCOOH}$

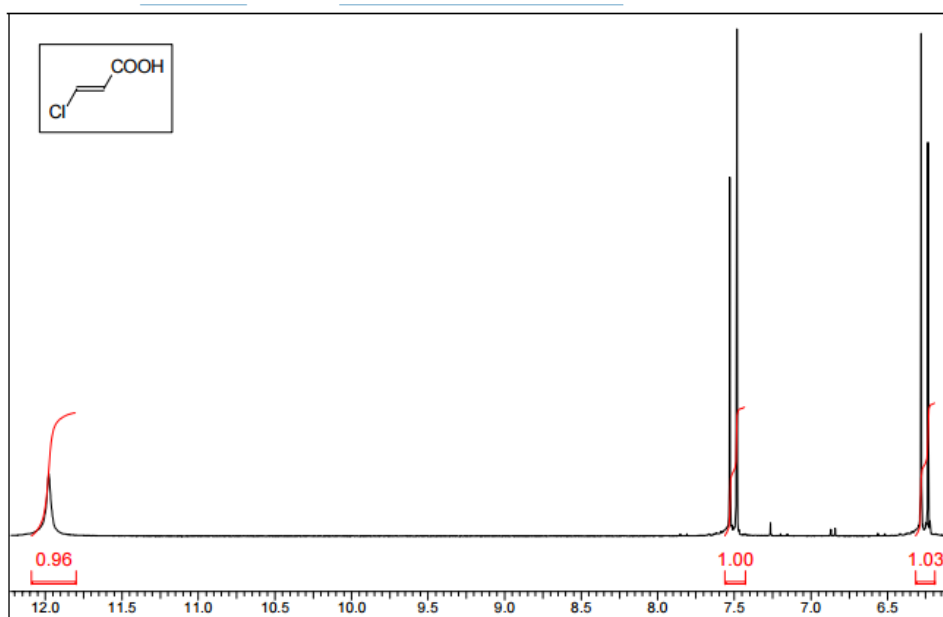


Рис.15. ^1H ЯМР спектр (E)-ClCH=CHCOOH

Уширенный сигнал при 12 м.д. соответствует протону -COOH-группы. Сигналы двух оставшихся -CH= - протонов удвоены (принято говорить: имеют форму дублетов) - в этом случае имеет место т.н. спин-спиновое взаимодействие. Следует отметить, что это взаимодействие между двумя протонами фактически передается через 3 химические связи: Н-С, С=С и С-Н. Взаимодействующие между собой протоны образуют т.н. спиновую систему. Принципы классификации спиновых систем достаточно просты: группы эквивалентных ядер обозначаются буквами латинского алфавита в порядке перехода из области слабых в область сильных полей (в порядке уменьшения экранирования). Для состоящей из двух неэквивалентных ядер системы обозначение АХ используется, если разница в химических сдвигах между этими ядрами значительна (для низкочастотных спектрометров - несколько м.д.). Если разница в химических сдвигах наряду с рабочей частотой спектрометра мала, говорят о спиновой системе АВ. Промежуточный вариант - спиновая система АМ. В случае двух взаимодействующих ядер система относится к АХ-типу, если интенсивности компонент каждого из дублетов одинаковы. Т.е. в (E)-ClCH=CHCOOH винильные протоны образуют АМ-систему. Если спиновую систему образуют не отдельные ядра, а группы эквивалентных ядер, их число в

каждой группе обозначается подстрочными индексами, как в химических формулах (AB_2 , A_2X_3 , AMX и т.п.).

В общем случае для различных спиновых систем в спектроскопии 1H ЯМР действует следующее простое правило (правило $n+1$): мультиплетность сигнала равна числу эквивалентных протонов, взаимодействующих с протонами этого типа плюс единица. Если это правило выполняется, то говорят о взаимодействии первого порядка. Очевидно, что полный спин также может принимать $n+1$ значений. Ниже приведен иллюстрирующий это правило 1H ЯМР спектр диэтилового эфира.

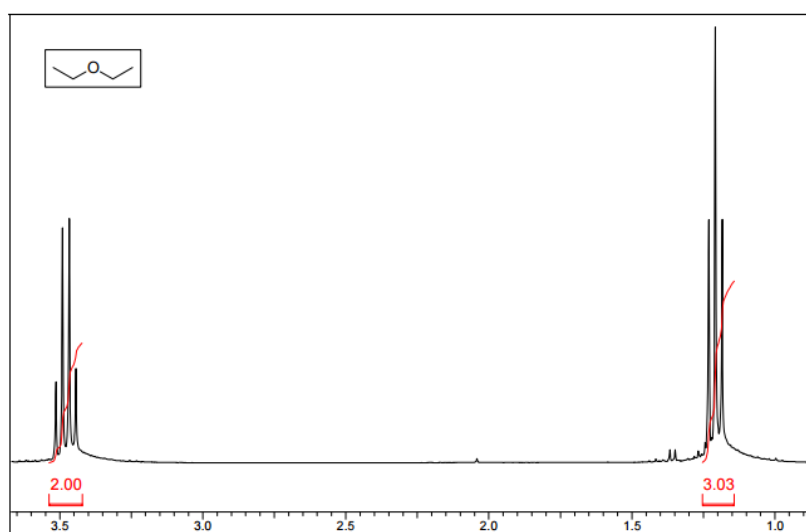


Рис.16. 1H ЯМР спектр диэтилового эфира

В этом спектре 2 сигнала - квадруплет и триплет с интегральными интенсивностями 4 и 6, относящиеся к $-CH_2-$ и $-CH_3$ - группам. Спиновая система - A_2X_3 . Число протонов $-CH_3$ группы + 1 = 4 - т.е. сигнал $-CH_2-$ группы представляет собой квадруплет. В то же время, число протонов $-CH_2-$ группы + 1 = 3 - и сигнал группы $-CH_3$ является триплетом.

Интенсивность линий каждого мультиплета можно получить из таблицы, называемой треугольником Паскаля.

Таблица 3.

Треугольник Паскаля.

| Число эквивалентных ядер, вызывающих расщепление | Мультиплетность наблюдаемого сигнала | Относительная интенсивность линий и их расположение в наблюдаемом мультиплете |
|--|--------------------------------------|---|
| 0 | синглет | 1 |
| 1 | дублет | 1 1 |
| 2 | триплет | 1 2 1 |
| 3 | квартет | 1 3 3 1 |
| 4 | квинтет (пентет) | 1 4 6 4 1 |
| 5 | секстет | 1 5 10 10 5 1 |
| | | δ |

Химический сдвиг дублета определяется следующим образом. Находится «центр тяжести» дублета и берется соответствующее значение м.д. Химический сдвиг триплета, квадруплета и др. мультиплетов указывается двумя значениями: левое значение – положение крайнего левого компонента мультиплета, правое значение – положение крайнего правого компонента мультиплета. Химические сдвиги обычно приводят с двумя знаками после запятой.

Константа спин-спинового взаимодействия.

Выше было отмечено, что если сигнал представлен в виде мультиплета (дублет, триплет, квадруплет и т.д.), линия любого мультиплета будет отстоять от соседних линий того же мультиплета на одно и то же число герц. Численное значение этого расстояния называется константой спин-спинового взаимодействия и обозначается «J».

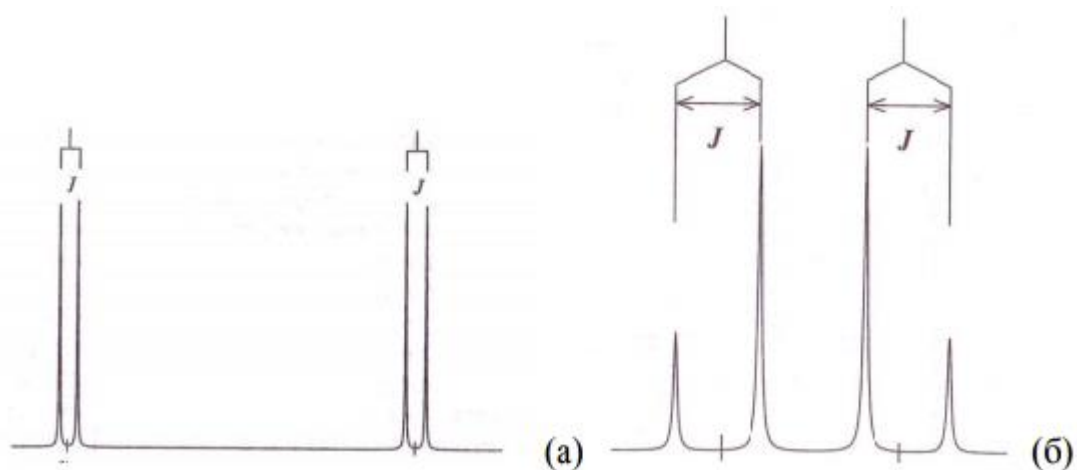


Рис.17. Константа спин-спинового взаимодействия (J) в случае расщепления сигнала в дублет; б: Константа спин-спинового взаимодействия (J) в случае расщепления сигнала в квадруплет.

Энергия спин-спинового взаимодействия между ядрами А и Х пропорциональна скалярному произведению их ядерных спиновых моментов m_A и m_X , и ее можно записать в виде:

$$E = J_{AX}I_A I_X$$

где I_A и I_X – ядерные спиновые векторы взаимодействующих ядер, пропорциональные их магнитным моментам m , а J_{AX} – константа спин-спинового взаимодействия (КССВ) между А и Х

2.3.3. Интенсивность сигнала.

В эксперименте ЯМР можно определить относительное количество эквивалентных по химическому сдвигу протонов. Другими словами, методом ЯМР можно определить, сколько протонов «ответственны» за данный сигнал. Интенсивность сигнала пропорциональна количеству протонов каждого типа и измеряется площадью пика.

Площадь мультиплета отражает число протонов, вызывающих данный сигнал, а мультиплетность сигнала – число протонов, взаимодействующих с рассматриваемым протоном (или протонами) Таким образом, из спектра ЯМР получаем три главные параметра, позволяющие определять строение молекулы – химический сдвиг сигнала, его мультиплетность и интегральную

интенсивность. Измерение интегральных интенсивностей сигналов позволяет использовать спектроскопию ПМР также и для количественного определения состава смесей органических веществ.

2.4. Спектроскопия ^{13}C ЯМР.

Эти спектры содержат крайне важную информацию о структуре органических соединений, т.к. число сигналов в спектре ^{13}C ЯМР равно числу различных атомов углерода в молекуле органического соединения. Молекула исследуемого методом ^{13}C ЯМР вещества фактически содержит единственную ^{13}C изотопную метку, статистически распределенную между всеми атомами углерода - т.е. объектом исследования является статистическая смесь изотопмеров. Очень важно то, что в спектре ^{13}C ЯМР фиксируются атомы углерода, вообще не связанные с протонами - т.е. спектр ^1H ЯМР никакой информации о которых не содержит - четвертичные атомы $>\text{C}=\text{C}=\text{}$, $-\text{C}\equiv$ и $=\text{C}=\text{}$, а также функциональные группы - $>\text{C}=\text{O}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CN}$ и другие.

Многие основные понятия, присущие изучению ^1H ЯМР спектроскопии, используются и в спектроскопии ^{13}C ЯМР. Так, имеющие различное химическое окружение ядра ^{13}C отличаются своими химическими сдвигами. В спектроскопии ^{13}C ЯМР также используется δ -шкала, а в качестве стандарта выбран тот же тетраметилсилан (ТМС). Однако область химических сдвигов сигналов различных типов в спектрах ЯМР ^{13}C существенно шире по сравнению со спектрами ^1H (порядка 250 м.д. вместо 12 м.д.). Влияние функциональных групп на значение химических сдвигов в ^{13}C ЯМР - спектрах в общем аналогично наблюдаемому для спектров ^1H ЯМР.

2.4.1. Спин-спиновые взаимодействия в ^{13}C ЯМР спектроскопии.

Атомы углерода органических соединений во многих случаях связаны с другими магнитными ядрами. Так, например, возможно спин-спиновое

взаимодействие между имеющими различное химическое окружение ядрами ^{13}C . Однако в силу естественной низкой концентрации этого изотопа подобные взаимодействия (за исключением меченых соединений) наблюдаются в виде крайне малоинтенсивных сигналов, невидимых в обычном спектре. Наиболее часто встречающихся в молекулах органических соединений типом связанных с атомами ^{13}C магнитных ядер являются протоны. Наличие связи С-Н приводит к тому, что между ядрами ^{13}C и ^1H возникает прямое спин-спиновое взаимодействие (через одну связь С-Н). Это взаимодействие практически незаметно в спектрах ^1H ЯМР (из-за низкого природного содержания изотопа ^{13}C , а основной изотоп ^{12}C магнитного момента не имеет), однако в ^{13}C -ЯМР спектрах оно проявляется очень сильно - т.к. подавляющее большинство ядер природного водорода - ^1H - имеет спин 1/2. В результате регистрации простых спектров ^{13}C ЯМР (т.н. спектров монорезонанса) мы получаем следующую двойственную картину: С одной стороны, спин-спиновое взаимодействие между ядрами ^{13}C и ^1H способно существенно упростить решение задачи по установлению структуры соединения: в зависимости от числа связанных с атомом углерода протонов мы получаем АХ, АХ₂ или АХ₃-спиновые системы (А - ядро ^{13}C , Х - протоны) - т.е. определить наличие в молекуле СН, СН₂ или СН₃-групп. Ниже приведен пример - модельный спектр ^{13}C ЯМР (Е)-СН₃СН=С(СН₂СН₃)СООН, мультиплетность и значение химического сдвига сигналов в котором позволяет нам соотнести каждый из них с каждым атомом углерода каждого типа. Первичное отнесение сигналов в этом спектре следующее: синглет при 172.12 м.д. соответствует -СООН (нет прямого взаимодействия С-Н). Дублет при 139 м.д. - -СН= (1 протон, связанный с углеродом). Синглет при 136.9 м.д. - четвертичному >С=. Триплет с центром при 19.73 соответствует фрагменту -СН₂-. Наконец, остается пара квадруплетов - сигналов метильных групп.

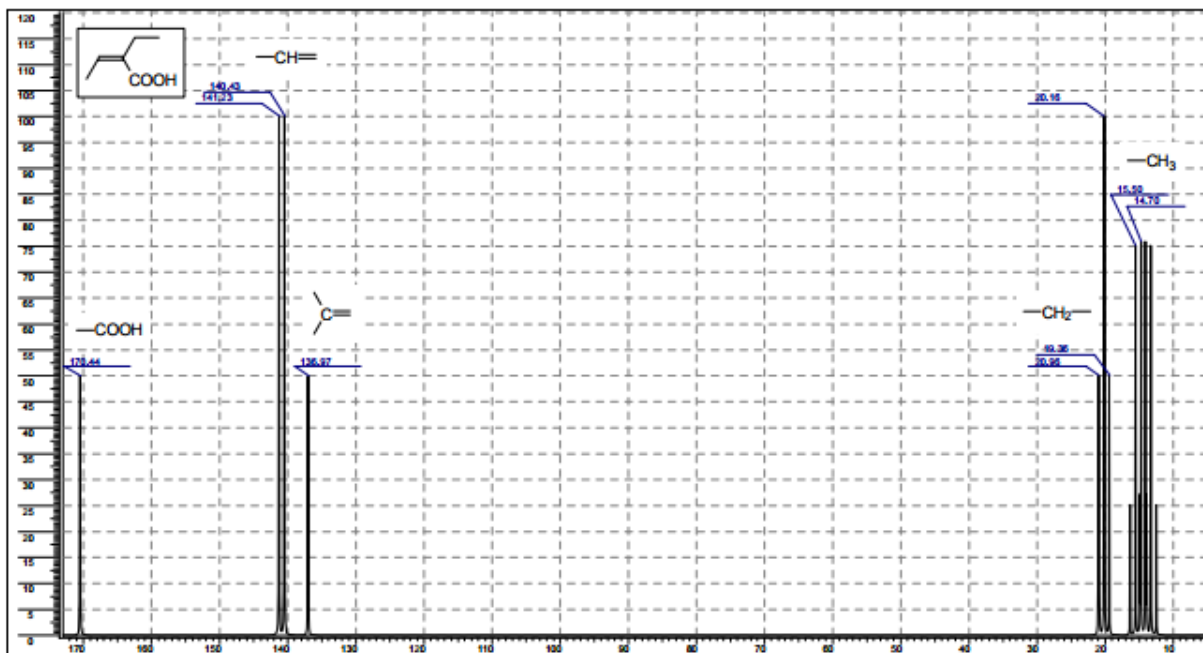


Рис.18. Модельный спектр ^{13}C ЯМР (E)- $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{COOH}$

2.5. Примеры идентификации различных классов соединений с использованием спектроскопии.

При идентификации соединений с использованием спектроскопии ^1H ЯМР учитываются следующие параметры:

- химические сдвиги сигналов
- интегральная интенсивность сигналов каждого типа
- проявление спин-спинового взаимодействия - в идеальном случае, допускающее интерпретацию в приближении спектров первого порядка.

^{13}C ЯМР спектры содержат информацию о числе и типах различных углеродных атомов в молекуле, причем во многих случаях удается идентифицировать четвертичные атомы углерода. Ниже приведен ряд характерных спектров соединений различных классов с их краткой интерпретацией. При анализе спектра ^{13}C ЯМР вещества не следует учитывать три близкорасположенных сигнала, центральный из которых имеет хим. сдвиг 77 м.д. Это - сигнал растворителя, CDCl_3 .

Соединение C_5H_{12} . В спектре 1H ЯМР наблюдаются 2 группы сигналов - мультиплет с центром 1.28 м.д. (6H) и триплет с центром 0.88 м.д. (6H). Последний сигнал принадлежит 2 метильным группам (ССВ CH_2CH_3). Сигнал при 1.28 м.д. может принадлежать $-CH_2-$ и/или $>CH-$ фрагментам. В спектре ^{13}C ЯМР наблюдаются сигналы трех различных атомов С при 34.2, 22.4 и 14.1 м.д., т.е. в области насыщенных атомов С. Из трех возможных изомерных пентанов данному набору сигналов удовлетворяет только н-пентан.

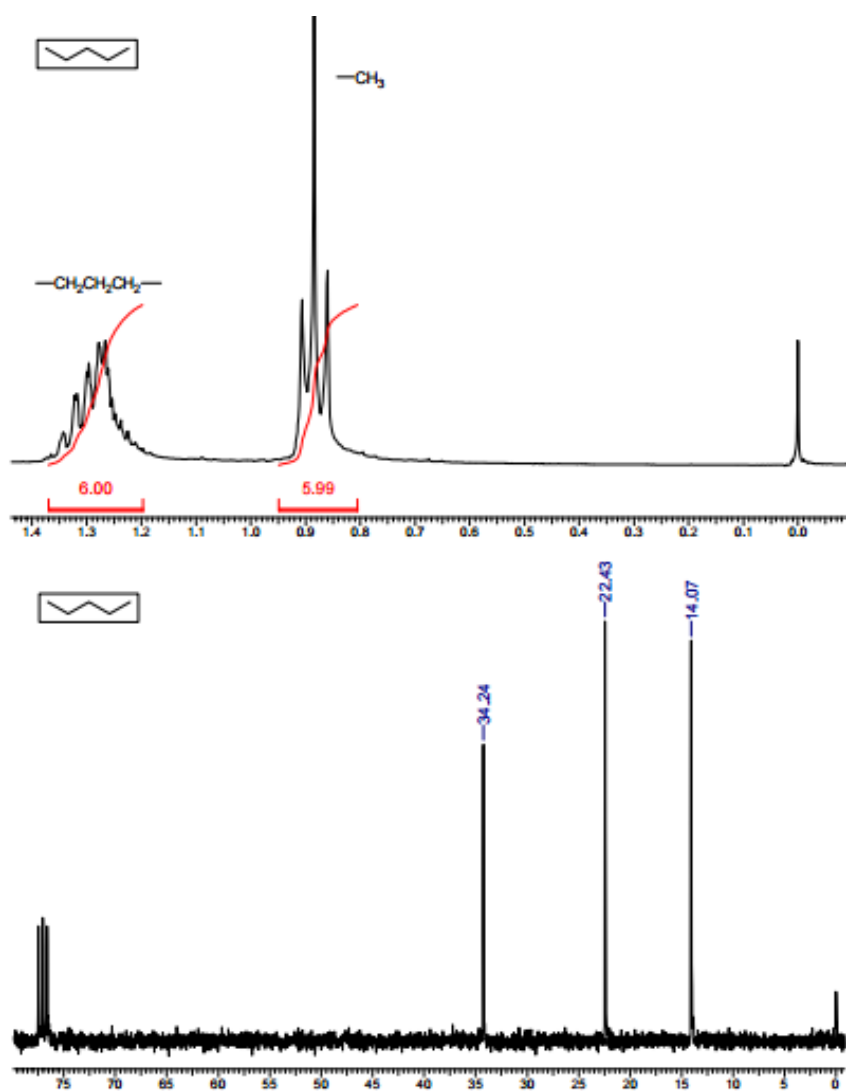


Рис.19. 1H ЯМР спектр пентана

В случае разветвленных алканов спектральная картина в большинстве случаев усложняется. Характерный пример - изомерный н-пентану 2-метилбутан. В его 1H ЯМР спектре наблюдаются мультиплет с центром 1.08 м.д. (1H), с очевидностью соответствующий фрагменту $>CH-$, мультиплет в

области 1.2 м.д. (2H), соответствующий -CH₂-группе, и наложившиеся дублет и триплет в области сигналов метильных групп, соответствующие фрагментам CH₂CH₃ и CH(CH₃)₂. В спектре ¹³C ЯМР наблюдаются 4 сигнала в области насыщенных атомов C.

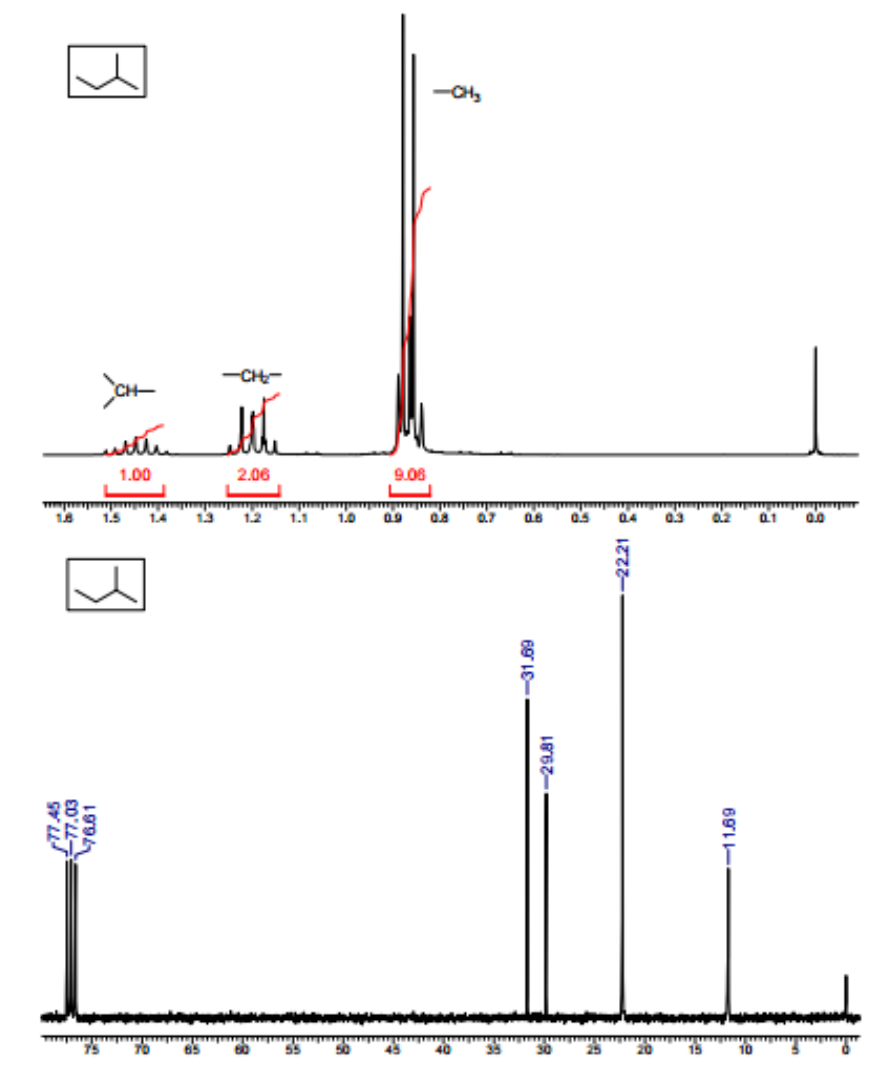


Рис.20. ¹H ЯМР спектр 2-метилбутана

В спектре ¹H ЯМР соединения C₆H₁₂ (степень ненасыщенности = 1, т.е. молекула содержит 1 двойную связь или цикл) в области слабых полей наблюдаются уширенные сигналы при 4.69 м.д. и 4.66 м.д. (2H). Такая картина характерна для терминальных протонов двойной связи, =CH₂. Остается определить структуру насыщенного остатка, содержащего 4 атома C. Видно, что молекула содержит 1 метильную группу, связанную с двойной

связью - синглет при 1.7 м.д. (3H). Остальные сигналы принадлежат н-пропильной группе: триплет в области аллильных протонов, при 1.95 м.д. (2H), мультиплет при 1.45 м.д. (2H) и триплет при 0.9 м.д. (3H). В спектре ^{13}C ЯМР наблюдаем сигналы при 146 ($=\text{C}<$) и 109.7 ($=\text{CH}_2$), а также при 40, 22.3, 20.8 и 13.8 (насыщенные C), что подтверждает установленную структуру - 2-метилпентен-1.

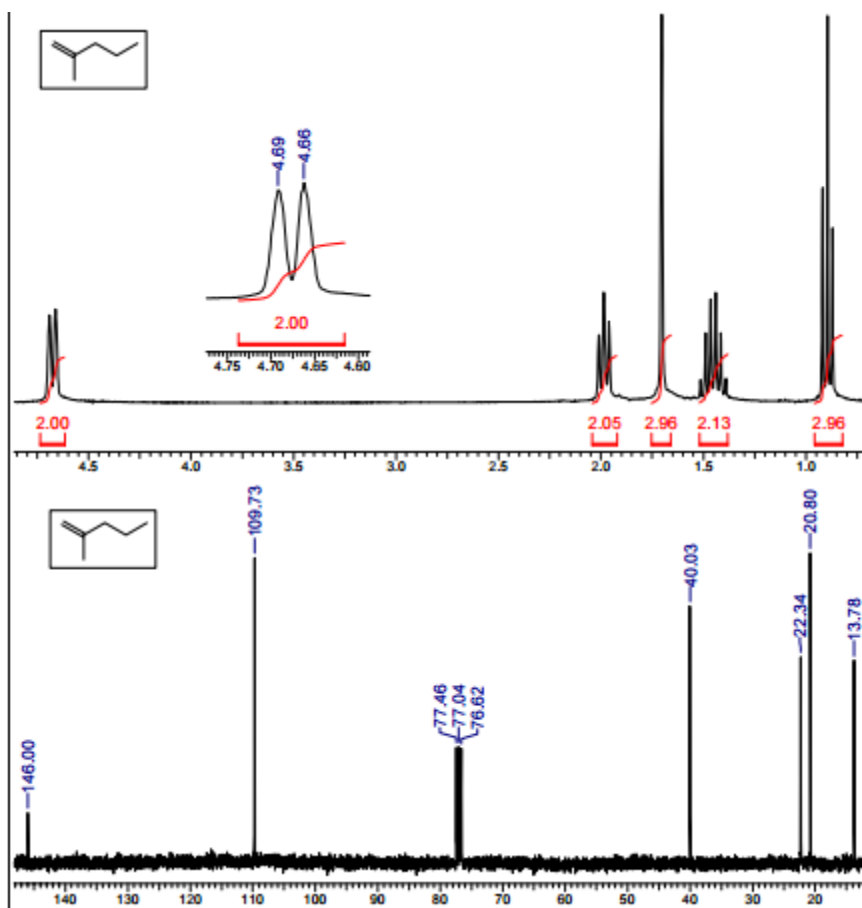


Рис.21. ^1H ЯМР спектр 2- метилпентена-1

Контрольные вопросы

1. На каком явлении основан метод ЯМР-спектроскопии?
2. Какие ядра атомов могут вызывать сигнал в спектрах ЯМР?
3. Что называется резонансной частотой ядра?
4. Что представляет собой спектр ЯМР?
5. Что называется химическим сдвигом сигнала ЯМР?
6. Что отражает мультиплетность сигнала?

7. Что отражает интенсивность мультиплета?

8. В чем особенность спин-спинового взаимодействия в ^{13}C ЯМР спектроскопии?

Глава 3

Инфракрасная и ультрафиолетовая спектроскопия как метод идентификации и строения соединений

Входные вопросы:

1. Сущность метода.
2. Использование инфракрасной спектроскопии для качественного обнаружения и определения структуры.
3. Приборы и аппаратура.
4. Особенности идентификации ИК-спектров.
5. Инфракрасные спектры органических соединений.
6. Ультрафиолетовая спектроскопия.

Спектроскопия – раздел физики и аналитической химии, посвященные изучению спектров взаимодействия излучения. В аналитической химии спектроскопические методы используются для обнаружения и определения веществ при помощи измерения их характеристических спектров, т.е. методами спектрометрии.

Области применения спектроскопии разделяют по объектам исследования: атомная спектроскопия, молекулярная спектроскопия, масс-спектроскопия, ядерная спектроскопия, инфракрасная спектроскопия и другие.

3.1. Сущность метода

Инфракрасная спектроскопия – раздел молекулярной оптической спектроскопии, изучающий спектры поглощения и отражения электромагнитного излучения в инфракрасной области. Инфракрасное излучение относится к той части электромагнитного

спектра, которая находится между видимой и микроволновой областями, т.е. в диапазоне длин волн от 10^{-6} до 10^{-3} м. Важные преимущества ИК-спектроскопии – специфичность, быстрота выполнения анализа, высокая чувствительность, объективность получаемых результатов, возможность анализа вещества в кристаллическом состоянии. В основе этого метода лежит такое физическое явление, как инфракрасное излучение. Инфракрасное излучение также называют «тепловым» излучением, так как все тела, твердые и жидкие, нагретые до определённой температуры, излучают энергию в инфракрасном спектре. При этом длины волн, излучаемые телом, зависят от температуры нагревания: чем выше температура, тем короче длина волны и выше интенсивность излучения

В координатах интенсивность поглощенного излучения – длина волны (волновое число) инфракрасный спектр представляет собой сложную кривую с большим числом максимумов и минимумов.

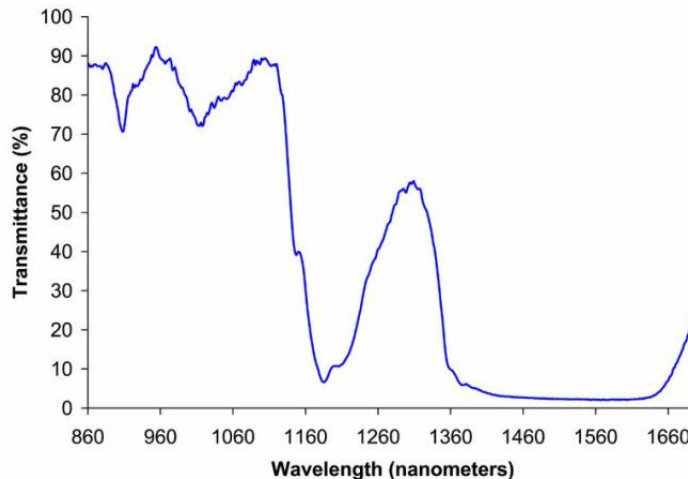


Рис. 1. Ближний ИК-спектр жидкого этанола

Полосы поглощения появляются в результате переходов между колебательными уровнями основного электронного состояния изучаемой системы. Спектральные характеристики (положения максимумов полос, их полуширина, интенсивность) индивидуальной молекулы зависят от масс составляющих ее атомов, геометрии строения, особенностей межатомных сил, распределения заряда и др., поэтому инфракрасные спектры

отличаются большой индивидуальностью, что и определяет их ценность при идентификации и изучении строения соединений.

Количественная связь между интенсивностью I прошедшего через вещество излучения, интенсивностью падающего излучения I_0 и величинами, характеризующими поглощающее вещество, основана на законе Бугера-Ламберта-Бера, т. е. на зависимости интенсивности полос поглощения от концентрации вещества в пробе. При этом о количестве вещества судят не по отдельным полосам поглощения, а по спектральным кривым в целом в широком диапазоне длин волн. На практике обычно ИК-спектр поглощения представляют графически в виде зависимости от частоты ν (или длины волны λ) ряда величин, характеризующих поглощающее вещество: коэффициента пропускания $T(\nu) = I(\nu)/I_0(\nu)$; коэффициента поглощения $A(\nu) = [I_0(\nu) - I(\nu)]/I_0(\nu) = 1 - T(\nu)$; оптической плотности $D(\nu) = \ln[1/T(\nu)] = \chi(\nu)cl$, где $\chi(\nu)$ — показатель поглощения, c — концентрация поглощающего вещества, l — толщина поглощающего слоя вещества. Поскольку $D(\nu)$ пропорциональна $\chi(\nu)$ и c , она обычно применяется для количественного анализа по спектрам поглощения.

3.2.Использование инфракрасной спектроскопии для качественного обнаружения и определения структуры

Метод инфракрасной спектроскопии является универсальным физико-химическим методом, который применяется в исследовании структурных особенностей различных органических

и неорганических соединений. Метод основан на явлении поглощения группами атомов испытуемого объекта электромагнитных излучений в инфракрасном диапазоне. Поглощение связано с возбуждением молекулярных колебаний квантами инфракрасного света. При облучении молекулы инфракрасным излучением поглощаются только те кванты, частоты которых соответствуют частотам валентных, деформационных и либрационных колебаний молекул.

Для регистрации спектров поверхности твердых тел применяют метод нарушенного полного внутреннего отражения. Он основан на поглощении поверхностным слоем вещества энергии электромагнитного излучения, выходящего из призмы полного внутреннего отражения, которая находится в оптическом контакте с изучаемой поверхностью. Инфракрасная спектроскопия широко применяют для анализа смесей и идентификация чистых веществ.

Идентификация чистых веществ производится обычно с помощью информационно-поисковых систем путем автоматического сравнения анализируемого спектра со спектрами, хранящимися в памяти ЭВМ.

Инфракрасная спектроскопия позволяет идентифицировать пространственные и конформационные изомеры, изучать внутри- и межмолекулярные взаимодействия, характер химических связей, распределение зарядов в молекулах, фазовые превращения, кинетику химических реакции, регистрировать короткоживущие (время жизни до 10^{-6} с) частицы, уточнять отдельные геометрические параметры, получать данные для вычисления термодинамических функций и др.

Необходимый этап таких исследований – интерпретация спектров, т.е. установление формы нормальных колебаний, распределения колебательной энергии по степеням свободы, выделение значимых параметров, определяющих положение полос в спектрах и их интенсивности. Инфракрасная спектроскопия как метод изучения строения молекул получил наибольшее распространение в органической и элементоорганической химии.

Инфракрасная спектроскопия имеет ряд преимуществ перед спектроскопией в видимой и ультрафиолетовой областях, так как позволяет проследить изменение всех основных типов связей в молекулах исследуемых веществ. При использовании инфракрасной спектроскопии для определения качественного и количественного состава природных смесей не происходит разрушение веществ, что позволяет применять их для последующих исследований. При инфракрасной спектроскопии в диапазоне каждой химической группировке органической молекулы соответствует определенный набор полос поглощения, которые хорошо изучены и приведены в соответствующих справочниках. При этом следует отметить, что в процессе снятия инфракрасного спектра создаются помехи на определенных длинах волн, связанные с поглощением электромагнитного излучения связями растворителей О-Н и С-Н.

Положительной особенностью метода инфракрасной спектроскопии является то, что полосы поглощения одного и того же вида колебаний атомной группы различных веществ располагаются в определенном диапазоне инфракрасного спектра (например, 3720-3550 см^{-1} - диапазон валентных колебаний групп -ОН; 3050-2850 см^{-1} - групп -СН, -СН₂, -СН₃ органических веществ). Точное положение максимума полосы поглощения атомной группы в пределах этого диапазона указывает на природу вещества (так, максимум 3710 см^{-1} свидетельствует о наличии групп -ОН, а максимум 3030 см^{-1} - о присутствии групп =С-Н ароматических структур).

Однако если исследуемый объект представляет собой не механические смеси, а является сложным химическим соединением, то указанные особенности инфракрасных спектров не обнаруживаются.

Число характеристических полос поглощения атомных групп, их интенсивность и положение максимумов, наблюдаемых на инфракрасных спектрах, дают представление о строении индивидуального соединения или о компонентном составе

сложных веществ. Интенсивность полосы поглощения определяется величиной, численно равной энергии, которую поглощают атомные или функциональные группы образца при прохождении через них инфракрасных лучей. Важным диагностическим показателем полос поглощения является величина пропускания. Данный показатель и концентрация вещества в снимаемом объекте связаны обратной пропорциональной зависимостью, что используется для количественных определений содержания отдельных компонентов.

При исследовании органических соединений обычно используют поглощение инфракрасного излучения в области 2–50 мкм ($5000\text{--}200\text{ см}^{-1}$).

3.3. Приборы и аппаратура

Основные части классического спектрофотометра – источник непрерывного теплового излучения, монохроматор, неселективный приемник излучения. Кювета с веществом помещается перед входной щелью. В качестве диспергирующего устройства монохроматора применяют призмы из различных материалов (LiF, NaCl, KCl и др.) и дифракции решетки. Последовательное выведение излучения различных длин на выходную щель и приемник излучения осуществляется поворотом призмы и решетки.

Работа прибора по двух лучевой схеме основана на нулевом методе. Радиация от источника излучения 1 направляется с помощью зеркал 2–5 по двум каналам: в одном канале (I) помещается исследуемый образец (6), в другом (II) – фотометрический клин (7) и образец сравнения (8). С помощью прерывателя (9) пучки света из каналов I и II попеременно проходят через диспергирующую систему монохроматора, образуемую призмой 10 из солей LiF, NaCl или KBr, разлагаются в спектр и поступают на приемник радиации болометр. Когда интенсивность пучков в обоих каналах одинакова, на болометр поступает постоянная тепловая радиация и сигнал на входе усилителя не возникает. При наличии поглощения на болометр падают лучи разной интенсивности и на нем возникает переменный

сигнал. Этот сигнал после усиления смещает фотометрический клин, сводя до нуля разность поглощения образца и фотометрического клина. Фотометрический клин механически связан с пером, перо регистрирует величину поглощения.

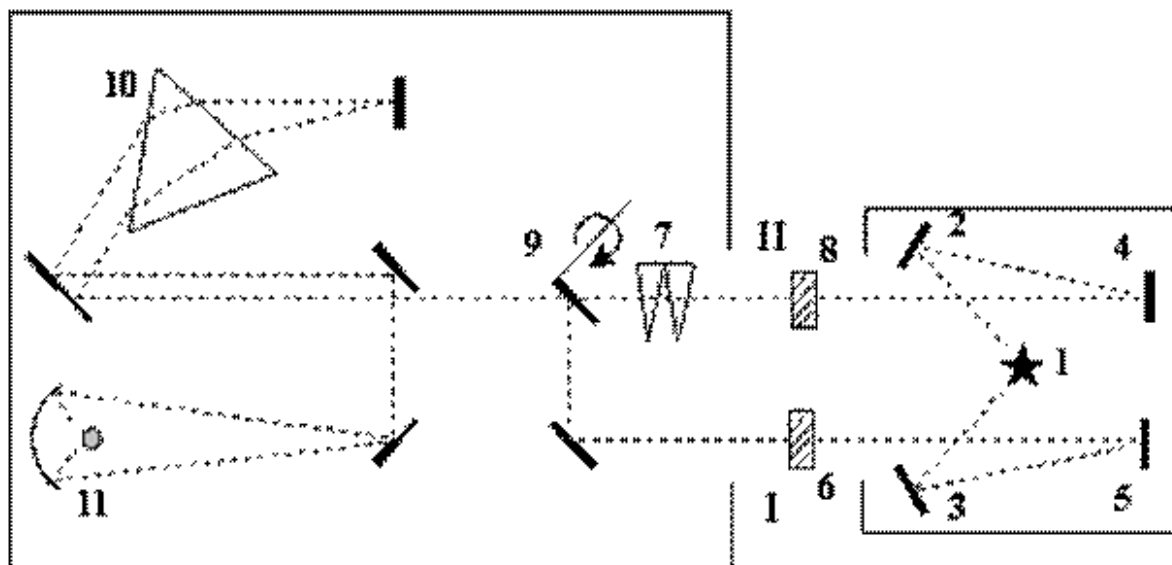


Рис. 2. Оптическая схема УФ –спектрометра

При записи ИК-спектров поглощения параметром длины волны являются микроны (мкм) или частоты в обратных сантиметрах (см^{-1}). Интенсивность выражается в процентах пропускания или поглощения и лишь в некоторых случаях в оптической плотности.

Инфракрасные спектры можно измерить для газообразных, жидких и твердых соединений. Для измерения спектров газообразных соединений используются специальные газовые кюветы. Жидкие соединения наносят в виде пленки на пластинки из материала, прозрачного в исследуемой области (например, KBr , NaCl , CsI , KCl). Из твердых веществ готовят суспензию в вазелиновом масле, которую помещают между соевыми пластинками. Нужно иметь в виду, что само вазелиновое масло сильно поглощает при $3000\text{--}2800\text{ см}^{-1}$, 1460 и 1380 см^{-1} . Поэтому для исследования поглощения веществ в этой области вместо вазелинового масла используют пергалоидные углеводороды.

Можно получить спектры твердых веществ, запрессовывая их с бромистым калием и снимая спектр полученной пластинки. Однако иногда вещество взаимодействует с бромистым калием, что приводит к искажению спектра. Инфракрасные спектры могут быть измерены и для растворов. Поскольку не имеется растворителей, прозрачных по всей области спектра, то обычно измерения ИК-спектров растворов делаются только для узких областей. Для исследования водных, кислых и щелочных растворов используют кюветы из водонерастворимых материалов (флюорит, кремний, германий и другие материалы, прозрачные в ИК-области). Зависимость частоты колебаний от силовой постоянной и массы атомов позволяет оценить положение полос поглощения отдельных групп.

3.4. Особенности идентификации ИК-спектров

Силовые постоянные деформационных колебаний существенно меньше силовых постоянных валентных колебаний, поэтому полосы деформационных колебаний располагаются в области меньших частот.

В область $1400\text{--}900\text{ см}^{-1}$ попадают полосы поглощения, отвечающие колебаниям групп C–C, C–O, C–N, а также многие деформационные колебания. В результате сильного взаимодействия этих колебаний отнесения полос поглощения к отдельным связям невозможны, однако весь набор полос поглощения в этой области является индивидуальной характеристикой соединений. Эта область поэтому получила название области «отпечатков пальцев».

3.5. Углеводороды

3.5.1. Предельные углеводороды

ИК-спектры углеводородов характеризуются появлением полос поглощения, обусловленных колебаниями связей С–С и С–Н.

Полосы углеводородов, связанные с характеристическими частотами С–Н (металльные, метиленовые и метановые группы), находятся в трех областях: 3000–2800, 1400–1300 и около 700 см⁻¹.

Поглощение в области 3000–2800 см⁻¹ обусловлено валентными колебаниями С–Н. Оно проявляется в виде сложной полосы поглощения, в которой пики при 2962 и 2872 см⁻¹ принадлежат колебаниям метильной группы (асимметричные ν_{AS} и симметричные – ν_S), а пики при 2926 и 2853 см⁻¹ относятся к валентным колебаниям метиленовой группы (ν_{AS} и ν_S).

Положение этих полос поглощения хорошо сохраняется у всех типов алифатических углеводородов. Интенсивности полос зависят от числа метиленовых и метильных групп в молекуле углеводорода. Метильная группа С–Н имеет относительно слабую полосу поглощения. ν_{CH} около 2890 см⁻¹, которая перекрывается интенсивными полосами поглощения групп CH_2 и CH_3 .

Поглощение в области 1400–1300 см⁻¹ и около 700 см⁻¹ обусловлено деформационными колебаниями С–Н-связей. Метильная группа имеет как симметричные, так и асимметричные деформационные колебания. Полоса при 1460 см⁻¹ отвечает асимметричному деформационному колебанию метильных групп, полоса 1380 см⁻¹ – симметричному колебанию. Расщепление этой полосы в дублет может служить признаком гемдиметильной группы. Для метиленовых групп характерны четыре типа деформационных колебаний: ножничные, веерные, крутильные и маятниковые. Полоса поглощения, отвечающая ножничным колебаниям метиленовых групп, находится при 1467 см⁻¹. Полосы 1467 см⁻¹ метиленовой и 1460 см⁻¹ метильной групп накладываются, и в спектрах разветвленных углеводородов трудно различимы. В нормальных углеводородах при $n > 5$ полоса метильной группы при 1460 см⁻¹ проявляется, в виде плеча на полосе 1467 см⁻¹. Маятниковые колебания метиленовых групп находятся в области

790–720 см^{-1} . Положение их определяется длиной углеродной цепи. Так, для C_2H_5 частота маятниковых колебаний 790–770 см^{-1} , для C_3H_7 она имеет значение 743–734 см^{-1} . Для $n = 4$ соответствующая полоса наблюдается при 725–720 см^{-1} (для твердых образцов иногда в виде дублета). Маятниковые колебания CH_2 -групп могут быть использованы для обнаружения полиметиленовых цепочек. Полосы, отвечающие крутильным и веерным колебаниям метиленовых групп и деформационным колебаниям метановых групп, располагаются в области 1300 см^{-1} ; для идентификации используются редко вследствие своей недостаточной характеристичности и малой интенсивности. Интенсивности полос поглощения деформационных колебаний метиленовой группы возрастают линейно с увеличением числа групп CH_2 . Полосы поглощения, отвечающие колебаниям скелета, относительно мало интенсивны, проявляются в двух областях: 1100–700 см^{-1} и ниже 500 см^{-1} . Первая область связана с валентными колебаниями углеродного скелета, вторая – с деформационными. Экспериментальные исследования большого числа углеводородов показали, что при наличии в молекуле изопропильной группы в спектре появляются полосы при 1170 и 1145 см^{-1} , трет-бутильной – при 1255 и 1210 см^{-1} , в присутствии четвертичного атома углерода наблюдается поглощение при 1215 и 1195 см^{-1} . Эти данные могут быть приведены только как свидетельство в пользу присутствия указанных групп, но не как однозначное доказательство.

Деформационные колебания углеродного скелета, находящиеся в области ниже 500 см^{-1} , в ИК-спектрах практически не исследованы.

3.5.2. Алкены

Введение кратной связи в молекулу органического соединения приводит к появлению полос поглощения, характеризующих эту связь, и изменяет положение полос поглощения групп, непосредственно связанных с ней. В моноолефинах с валентными колебаниями $\text{C} = \text{C}$ связана полоса поглощения в области 1680–

1640 cm^{-1} . Это колебание не является строго валентным, поскольку наряду с растяжением связи $\text{C}=\text{C}$ происходит изменение валентных углов $\text{H}-\text{C}=\text{C}$. В centrosymmetric этиленовых соединениях колебание $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ неактивно вследствие запрета по симметрии (так как симметричные колебания происходят без изменения дипольного момента), в несимметричных молекулах интенсивность полосы поглощения увеличивается по мере смещения двойной связи на конец цепи. Положение полосы валентного колебания $\text{C}=\text{C}$ внутри интервала 1680–1640 cm^{-1} зависит от степени замещения у связи $\text{C}=\text{C}$ и геометрии молекулы.

Положение полосы поглощения связи $\text{C}=\text{C}$ в циклоалкенах зависит от того, является она эндо- или экзоциклической. Для эндоциклической частота $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ несколько возрастает по мере увеличения угла в цикле, для экзоциклической связи $\text{C}=\text{C}$ частота $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ возрастает с увеличением напряженности циклов.

Частота валентных колебаний $=\text{C}-\text{H}$ наблюдается при 3010–3095 cm^{-1} , причем значение $\nu_{\text{C}-\text{H}}$ определяется степенью замещения: для $=\text{CHR}$ характерно колебание с $\nu=3040\text{--}3010$ cm^{-1} , для группы $=\text{GH}_2$ появляется колебание с частотой 3095–3075 cm^{-1} . Полосы плоских деформационных колебаний связей $=\text{C}-\text{H}$ мало интенсивны, расположены в области деформационных колебаний метиленовых и метальных групп и для целей структурного анализа обычно не используются. Напротив, полосы неплоских деформационных колебаний $\text{H}-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ в спектрах алкенов являются весьма характерными, располагаются в области 1000–800 cm^{-1} и достаточно интенсивны. Поглощение при 970–965 cm^{-1} характерно для трансизомера.

По поглощению в области 1000–800 cm^{-1} можно с хорошей степенью достоверности определить концевые винильную $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2$ и метиленовую группы $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$. На колебание остальной части молекулы алкена кратная связь не оказывает существенного влияния.

3.5.3. Сопряженные углеводороды

Сопряжение двух связей $C=C$ приводит к появлению двух полос поглощения в области $1650-1600\text{ см}^{-1}$. Расщепление объясняется механическим взаимодействием и изменением форм нормальных колебаний. Интенсивность полос повышена по сравнению с интенсивностью поглощения соответствующего несопряженного соединения. У полиенов в этой области появляется несколько полос, иногда сливающихся в одну широкую, причем с увеличением числа сопряженных связей полосы поглощения смещаются в сторону меньших частот.

При сопряжении двойных связей с ароматическим кольцом смещение полосы $C=C$ обычно меньше, чем при сопряжении алифатических связей. Интенсивность полосы сильно увеличивается наряду с увеличением интенсивности полос поглощения скелетных колебаний ароматического кольца в области $1600-1500\text{ см}^{-1}$.

3.6. Органические соединения с функциональными группами

Введение функциональных групп приводит к существенному изменению ИК-спектра соответствующего углеводорода. Так же как и для углеводородов, набор полос в области $1400-700\text{ см}^{-1}$ является индивидуальной характеристикой каждого вещества. Кроме того, в спектре появляются полосы, специфичные для каждой функциональной группы.

3.6.1. Органические соединения, содержащие кислород

Гидроксилсодержащие соединения. Введение гидроксильной группы в молекулу органического соединения приводит к появлению полос поглощения, связанных с колебаниями связей $O-H$ и $C-O$.

Наиболее характерные полосы поглощения появляются в областях $3600\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ (валентные колебания О–Н-группы) и $1400\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ (колебания, связанные с группировкой С–О–Н). Валентные колебания О–Н являются характеристическими, поскольку в них принимает участие легкий атом водорода. Они наблюдаются в широком интервале частот ($3600\text{--}2500\text{ см}^{-1}$), что связано со способностью гидроксильной группы образовывать водородные связи. Образование водородной связи влияет на положение и форму полос валентных колебаний ОН.

Свободная, неассоциированная гидроксильная группа спиртов и фенолов имеет узкую полосу поглощения в области $3670\text{--}3580\text{ см}^{-1}$. Эта полоса обычно наблюдается в разбавленных растворах гидроксилсодержащих соединений в инертных растворителях. Идентификация полос свободной ОН-группы не вызывает затруднений, так как другие основные колебания не дают полос в этой области, а интенсивность обертонов намного ниже.

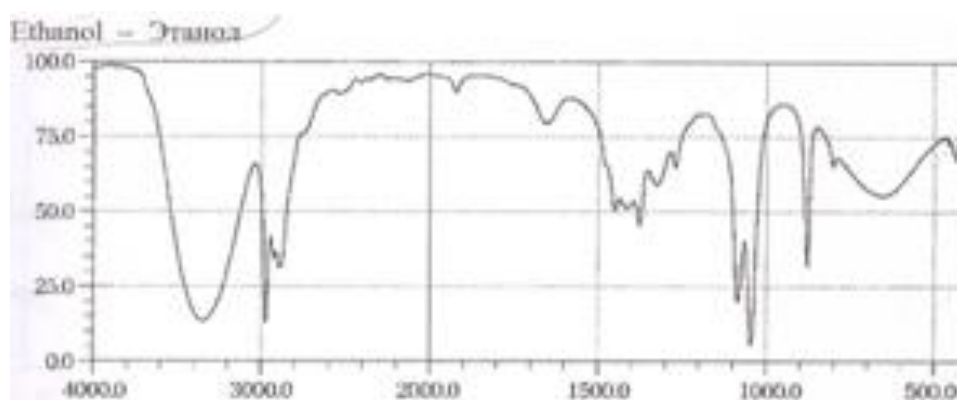


Рис.3. Спектр поглощения этанола

3.6.2. Фосфорорганические соединения.

В спектрах фосфинов наблюдаются резкие полосы поглощения средней интенсивности в области $2440\text{--}2350\text{ см}^{-1}$, обусловленные валентными колебаниями связи Р–Н. Сам фосфин поглощает при 2327 и 2421 см^{-1} . Группа Р–Н не участвует заметно в образовании водородных связей. Группа Р–Аг характеризуется полосами поглощения в интервалах $1450\text{--}1435$ и $1005\text{--}995\text{ см}^{-1}$. Колебание, связанное с группой Р = О, появляется в области

1350–1175 cm^{-1} . Эта частота понижается на 50–80 cm^{-1} , если группа $\text{P} = \text{O}$ участвует в образовании водородных связей. В фосфорных соединениях, содержащих группу POOH , полоса поглощения νOH проявляется в области 2700–2560 cm^{-1} (широкая и нерезкая). С группировкой $\text{P}-\text{O}-\text{Ar}$ связывают полосы поглощения в области 1240–1190 cm^{-1} и менее интенсивную полосу около 1030 cm^{-1} . Группировка $\text{P}-\text{O}-\text{Alk}$ вызывает поглощение в интервале 1050–995 cm^{-1} . В области 970–930 cm^{-1} может проявиться полоса, обязанная колебанию группы $\text{P}-\text{O}-\text{P}$. Связи $\text{P} = \text{S}$ вызывают поглощение в области 800–600 cm^{-1} . Для фосфорных соединений характерно появление интенсивного поглощения при 980 cm^{-1} , природа которого не выяснена.

3.7. Инфракрасные спектры органических соединений

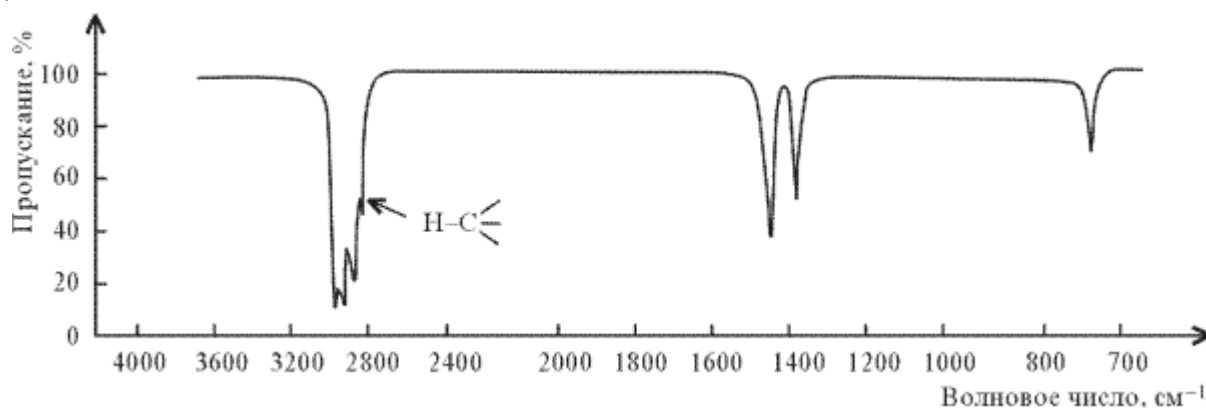


Рис.4. ИК-спектр н-гексана $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

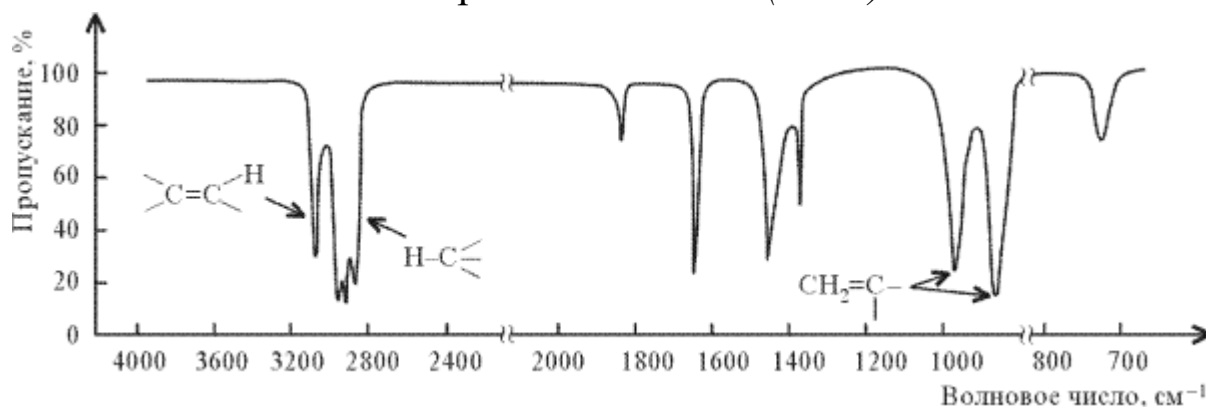
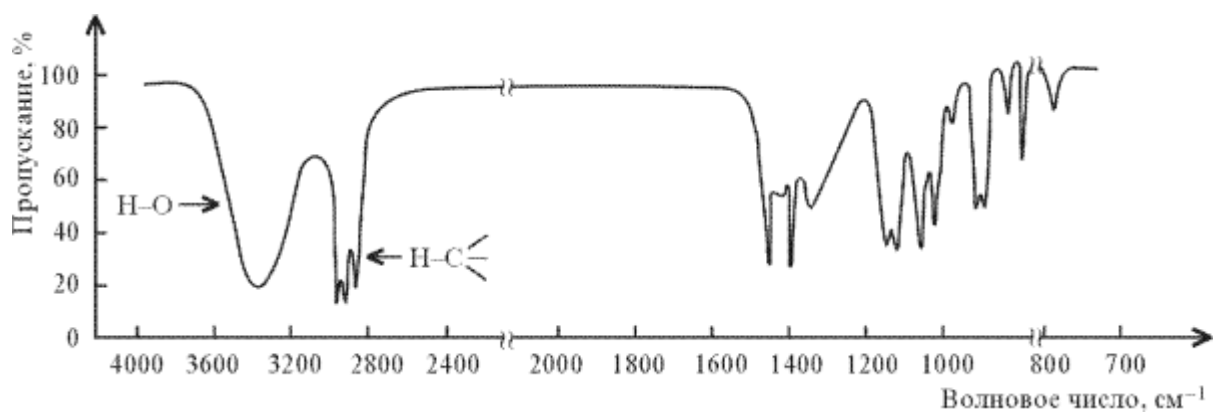


Рис.5. ИК-спектр гексена-1 $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$



ИК-спектр гексанола-2 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$

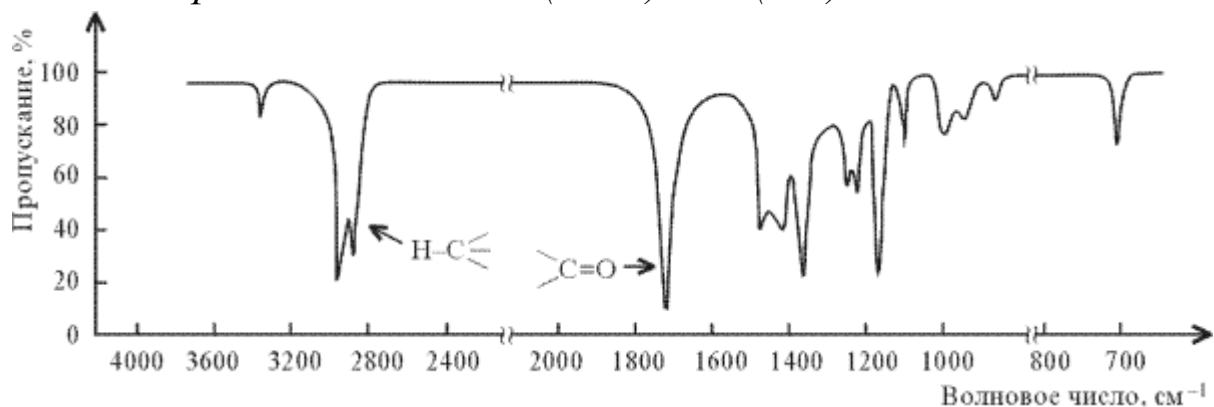


Рис.7. ИК-спектр гексанола-2 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$

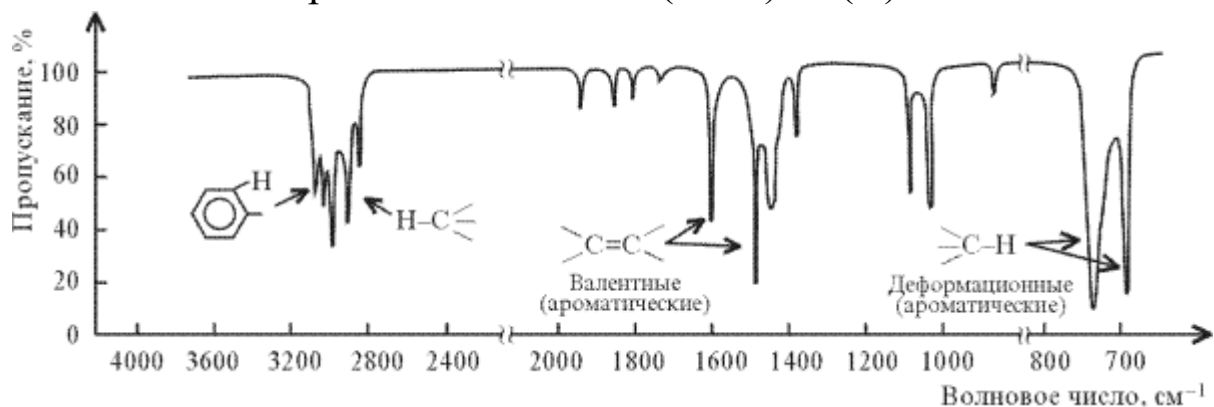


Рис.8. ИК-спектр толуола c1ccccc1C

Задача

Какому из приведенных ниже соединений принадлежит ИК-спектр, показанный на рисунке. Объясните ваш выбор.

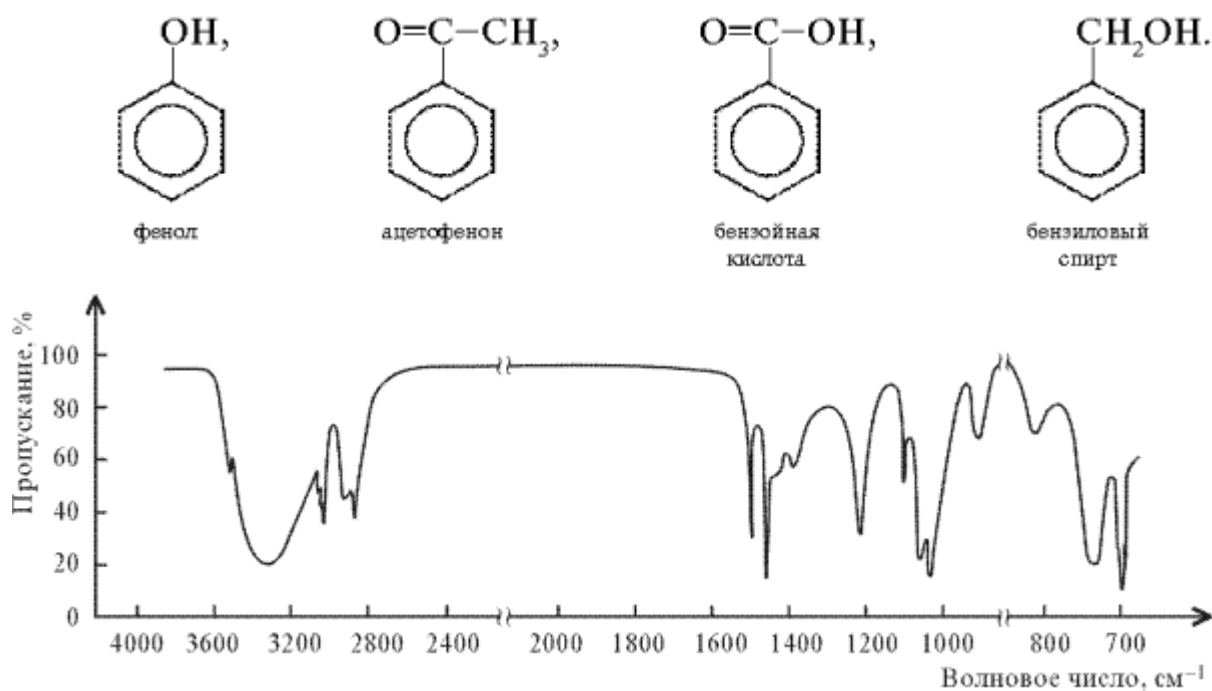


Рис.9. ИК-спектр неизвестного соединения

Решение.

В области 1800–1650 см⁻¹ поглощение отсутствует, поэтому соединение не содержит С=О-группы. Из двух остающихся веществ – фенола и бензилового спирта – выбираем спирт, т. к. в спектре есть полоса $\nu_{C-H} = 2950-2850$ см⁻¹ группы CH₂ (углерод в состоянии sp²-гибридизации).

3.8. Ультрафиолетовая (УФ) и видимая спектроскопия.

Электронные спектры в ультрафиолетовой и видимой областях спектра возникают в результате переходов электронов с одного энергетического уровня на другие вследствие поглощения излучения.

Применяется в клинических, биохимических, санитарно-гигиенических, судебно-медицинских и фармацевтических лабораториях для качественного и количественного анализа различного рода объектов биологического происхождения (сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча и др.), лекарственных средств, продуктов питания.

Используется для исследования:

- доброкачественности фармакопейных препаратов, их подлинности и чистоты;
- кинетических параметров реакций, протекающих в растворах;
- активности ферментов, например β -галактозидазы;
- ферментативного гидролиза полинуклеотидов;
- особенностей конформации белков;
- процесса денатурации и ассоциации белков;
- связывания белками малых молекул.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается сущность метода ИК-спектроскопии?
2. Что собой представляет ИК-спектр?
3. Что позволяет идентифицировать ИК-спектроскопия?
4. Перечислите основные части классического спектрофотометра и принцип его работы.
5. Приведите особенности идентификации некоторых органических соединений.
6. В чем заключается сущность ультрафиолетовой спектроскопии. Применение в медико-биологических исследованиях.