

Současná spektrometrie v
klasické infračervené oblasti

= absorpční molekulová
rotačně - vibrační
spektrometrie

Vymezení základních pojmů, vztahů a veličin

$$\lambda = c / f$$

λ [m] - vlnová délka

c - rychlost elmag. vlnění ve vakuu ($\approx 3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹)

f [Hz] - frekvence (kmitočet)

$$\nu[\text{cm}^{-1}] = 1 / \lambda[\text{cm}]$$

ν [cm⁻¹] - vlnočet

12 500 cm⁻¹- 5000 cm⁻¹ - blízká infračervená oblast (NIR)

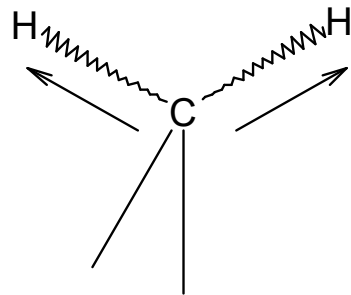
5000 cm⁻¹ - 250 cm⁻¹ - střední („klasická“) infračervená oblast

od 250 cm⁻¹ - vzdálená infračervená oblast

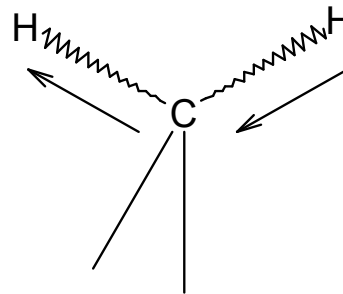
Energie IČ záření při absorbování sloučeninou mění v energii vibračního a rotačního pohybu atomů na vazbách

Typy vibrací

Valenční - ν - změna délky vazby



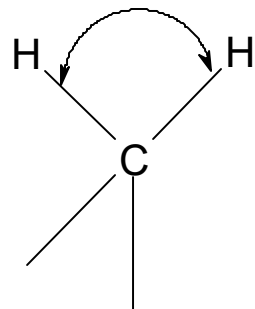
$\nu(\text{CH}_2)_s$
symetrické



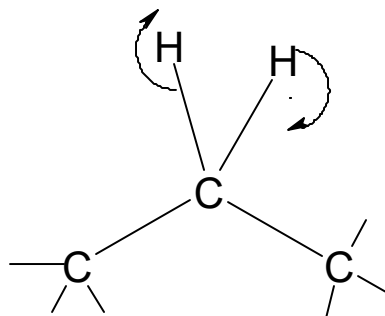
$\nu(\text{CH}_2)_{as}$
asymetrické

Typy vibrací

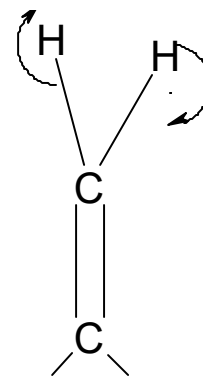
Deformační δ - změna vazebného úhlu



$\delta(\text{CH}_2)$ - nůžková („scissoring“)

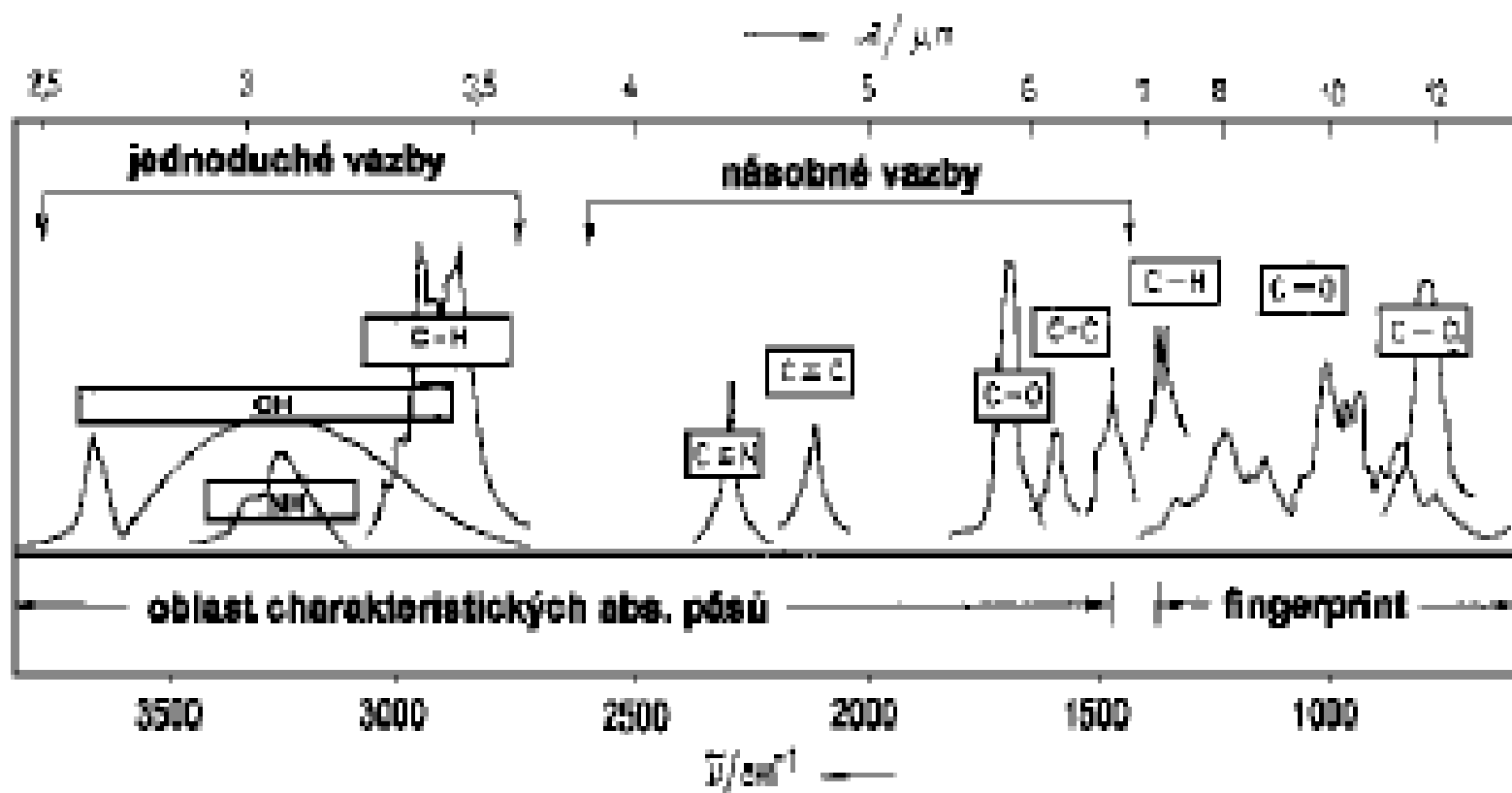


twisting



torzní vibrace

Významné vibrace

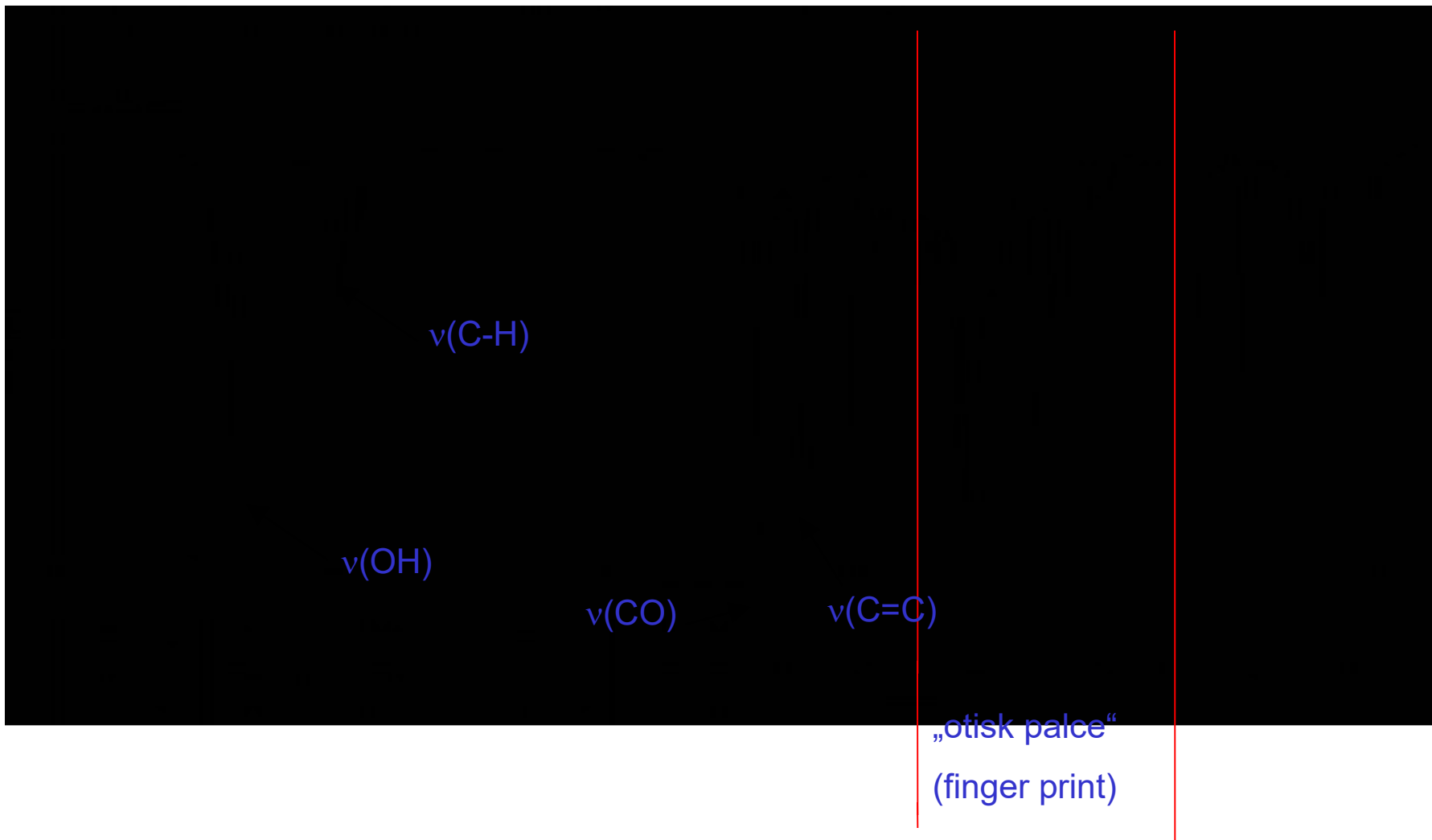


Tabulka vlnočtů významnějších skupin

TABULKA 14
Charakteristické frekvence skupin a struktur v IČ-oblasti spektra

Vlnočt [cm ⁻¹]	Typ vibrace	Sloučenina
3700—3300	valenční vibrace „volných“ a „vázaných“ NH- a OH- skupin (viz text)	alkoholy, fenoly, kyseliny, primární a sekundární aminy a amidy
3305	valenční vibrace $\equiv\text{C}-\text{H}$	monosubstituované acetyleny
3100—3000	valenční vibrace $=\text{C}-\text{H}$	aromatické systémy, olefiny
3000—2700	valenční vibrace $-\text{C}-\text{H}$	parafiny, cykloparafiny, methylové a methylenové skupiny
2600—2550	valenční vibrace $-\text{S}-\text{H}$	thioly, thiofenoly
2300—2100	valenční vibrace $-\text{C}\equiv\text{X}$ (X = C, N, O)	acetyleny, nitrily, kysličník uhelnatý
1820—1600	valenční vibrace $-\text{C}=\text{O}$	karbonylové sloučeniny (ketony, aldehydy, estery, laktony, kyseliny, amidy, laktamy, anhydridy aj. deriváty kyselin)
1680—1500	valenční vibrace $-\text{C}=\text{C}$	aromatické systémy, olefiny
1680—1630	valenční vibrace $-\text{C}=\text{N}$	azomethiny atd.
1518	valenční vibrace $-\text{NO}-\text{NO}_2$	aromatické nitrosloučeniny
1470— 570	deformační vibrace $=\text{C}-\text{H}$ deformační vibrace $-\text{C}-\text{H}$	aromatické systémy, olefiny, parafiny apod.
1360—1030	valenční vibrace $-\text{C}-\text{N}$	amidy a aminy
1290—1050	valenční vibrace $-\text{C}-\text{O}$	estery, laktony, ethery, alkoholy
1335—1310	valenční vibrace $-\text{SO}_2$	organické sulfosloučeniny
1160—1130		
1200— 600	valenční vibrace $-\text{C}-\text{C}$	vibrace skeletu (parafiny, cykloparafiny, olefiny, aromatické systémy s postranním řetězcem)
780— 500	valenční vibrace $-\text{C}-\text{Hal}$	alkyl- a arylhalogenidy
705— 570	valenční vibrace $-\text{C}-\text{S}$	organické sloučeniny síry (thioly, thioethery, disulfidy atd.)

Infračervené spektrum butyl-4-hydroxybenzoátu



Příprava vzorku

- disperze v tabletě z KBr (pevné vzorky)
- disperze v nujolu (čištěném paraf. oleji)
 - roztok v CHCl_3 nebo CCl_4
 - nativní vzorek (kapaliny)
- kyveta z anorg. soli (kapalné vzorky)
- ATR nástavec - měření odrazovou technikou (nativní kapaliny, pevné látky)
- rozpouštědlo nebo dispergens ovlivňuje spektrum \Rightarrow spektra z různých prostředí se liší

Srovnání funkce klasických IR a FT- IR spektrometrů

Klasický - postupně se proměřuje absorpce záření vzorkem v celém vybraném rozsahu, vlnočet vybírán monochromátorem; detektor termočlánek; výstup na zapisovač se speciálním papírem

Čas potřebný pro získání spektra: desítky minut

FT - IR - na vzorek se přivádí vhodně modulované IČ záření v celém rozsahu spektra najednou, vzorkem prochází i záření odražené, toto záření spolu s referenčním, které vzorkem neprošlo, je zachyceno detektorem a z jeho průběhu je **Fourierovou transformací** vypočítáno IČ spektrum;

detektorem fotonásobič; výstup na počítač

Čas potřebný pro získání spektra: zlomky sekundy \Rightarrow měření možno provádět opakovaně \Rightarrow nižší úroveň šumu

Oba systémy - veškerá optika, kterou záření prochází, z anorg. sloučenin, které v IČ neabsorbují (NaCl, KBr, ZnSe), často velmi hygroskopické, nutno chránit před vlhkem; před čočkami často upřednostňována dutá zrcadla (kulová, parabolická)

Využití IČ spektroskopie

strukturní analýza - dnes převážně zjištění (potvrzení) přítomnosti významných funkčních skupin ($\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$...) a seskupení atomů ($-\text{C}=\text{C}-$, $-\text{CH}_2-\dots$); zde je IČ spíše doplňkovou metodou k NMR a MS

identifikace sloučenin porovnáním jejich IČ spektra včetně oblasti **finger printu** se spektrem ověřeného standardu (lékopisy - zkoušky totožnosti) nebo IČ spektry v databázích

rozlišení polymorfů = různých krystalových modifikací téže látky; významné např. ve farm. technologii

kvantitativní analýza - pro tento účel je vhodnější absorbance, pík vhodné dostatečně intenzivní vibrace (např. $\nu(\text{C}=\text{O})$), platí Lambert-Beerův zákon

měření spekter biomakromolekul a celých tkání pomocí reflektančních IČ technik - např. studium změn struktury kůže při průniku xenobiotik do ní

aj.

**Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)
= absorpční spektroskopie v oblasti velmi krátkých radiových
vln (20 – 1000 MHz) za spolupůsobení stacionárního
magnetického pole**

r. 1945 poprvé pozorovány signály vodíku, od 50. let sériově
vyráběné spektrometry

Proč NMR spektroskopie?

nukleární – využívá vlastností jader některých prvků, která mají rotační moment neboli **spin** a s ním spojený **magnetický moment**. Spin je charakterizován **spinovým kvantovým číslem I**, které může nabývat hodnot násobku $\frac{1}{2}$, např.

$I = 0$	$^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}, ^{32}\text{S}$
$I = \frac{1}{2}$	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{19}\text{F}, ^{29}\text{Si}, ^{31}\text{P}$
$I = 1$	$^2\text{H} (=^2\text{D}), ^{14}\text{N},$

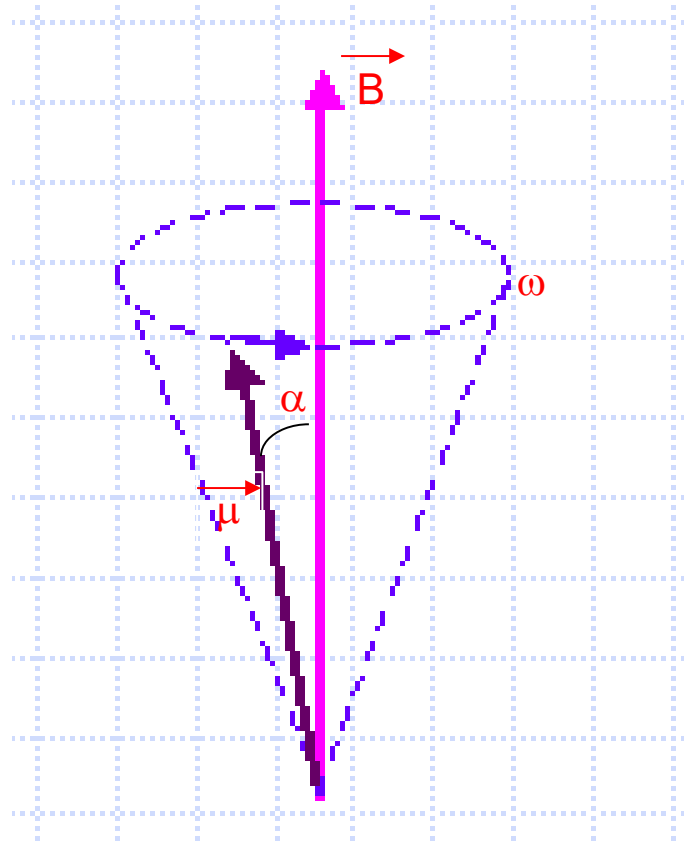
magnetická – protože magnetické momenty těchto jader zaujmou v homogenním mag. poli $2I + 1$ orientací lišících se energií, např. dvě orientace pro jádra s $I = 1/2$, a to po směru a proti směru vnějšího mag. pole, přičemž vektor mag. momentu vykonává **precesní pohyb** kolem směru mag. pole;

počet orientací $m = 2I + 1$... **magnetické kvantové číslo**

rezonanční – protože jádra na nižší energetické hladině jsou schopna absorbovat energii z vysokofrekvenčního pole (v oblasti velmi krátkých radiových vln), jestliže frekvence precesního pohybu jejich mag. momentu a kruhová frekvence radiofrekvenčního pole je stejná, tj. jsou-li v rezonanci

spektroskopie- protože vlastnosti těchto jader a jejich poloha v molekule se dají odvodit ze **spektra** vzniklého jako záznam intenzity absorpce rf záření v závislosti na jeho frekvenci

Precesní pohyb vektoru magnetického momentu $\vec{\mu}$ pod úhlem α v magnetickém poli indukce \vec{B}



Larmorova frekvence $\omega = \gamma \cdot B$

γ ... magneogyrický poměr (viz dále)

B ... indukce vnějšího mag. pole

Co lze vyčíst z NMR spektra?

- a) **počet signálů** – udává, kolik je strukturně neekvivalentních atomů sledovaného izotopu v molekule
- b) **poloha signálů** – odráží vliv elektronů z intra- a intermolekulárního okolí zkoumaného jádra
- c) **intenzita signálů** – odpovídá relativnímu zastoupení v jednotlivých skupinách ekvivalentních atomů
- d) **stěpení signálů** – charakterizuje ovlivnění lokálního mag. pole působícího na jádro mag. momenty jader vázaných v blízkém okolí

Interpretace spektra = přiřazení jednotlivých signálů atomům v molekule s využitím těchto 4 charakteristik

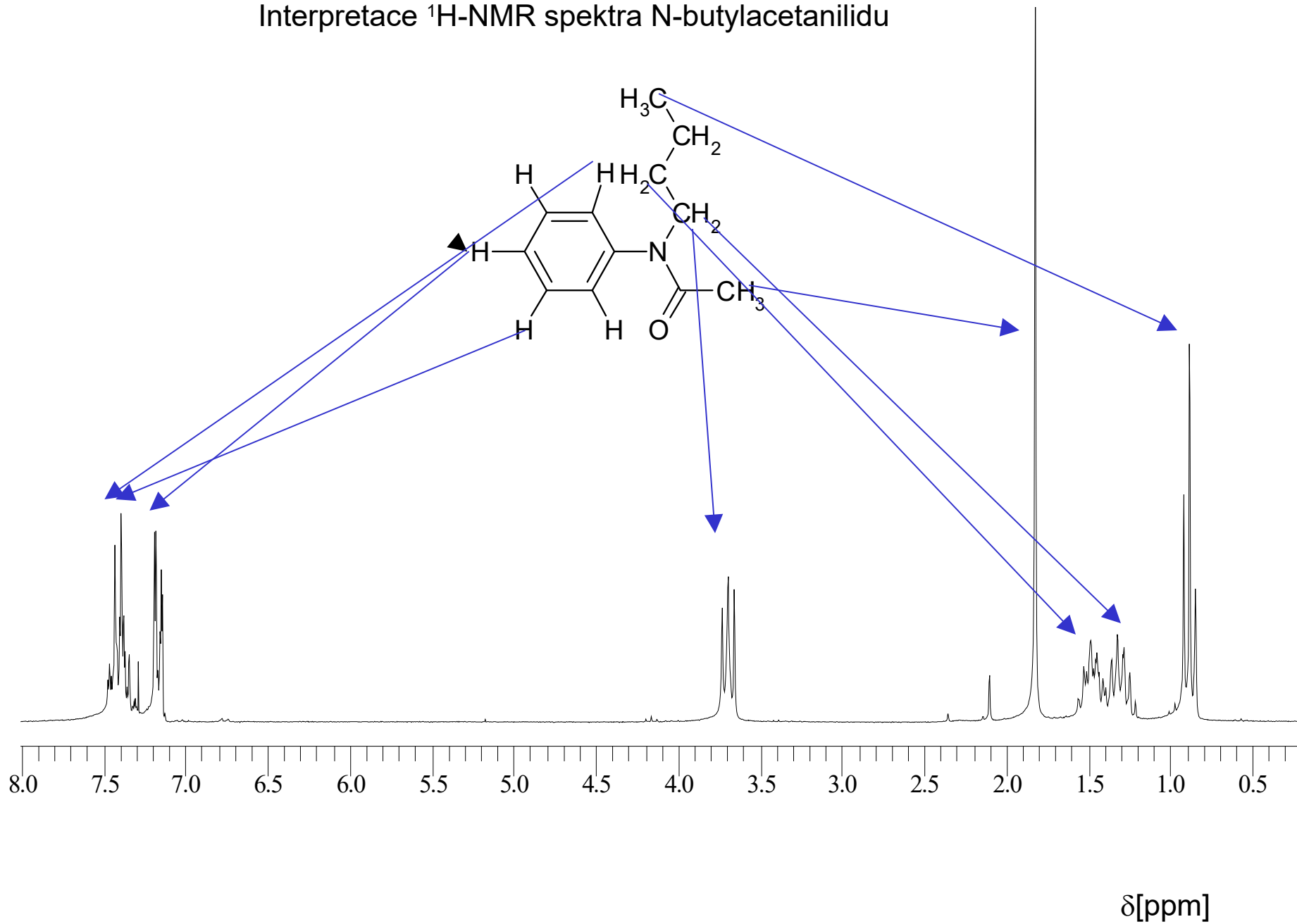
CW a FT-NMR spektroskopie

CW (continuous wave) – sleduje se, jak se mění absorpce radiového vlnění s postupnou plynulou změnou frekvence tohoto vlnění

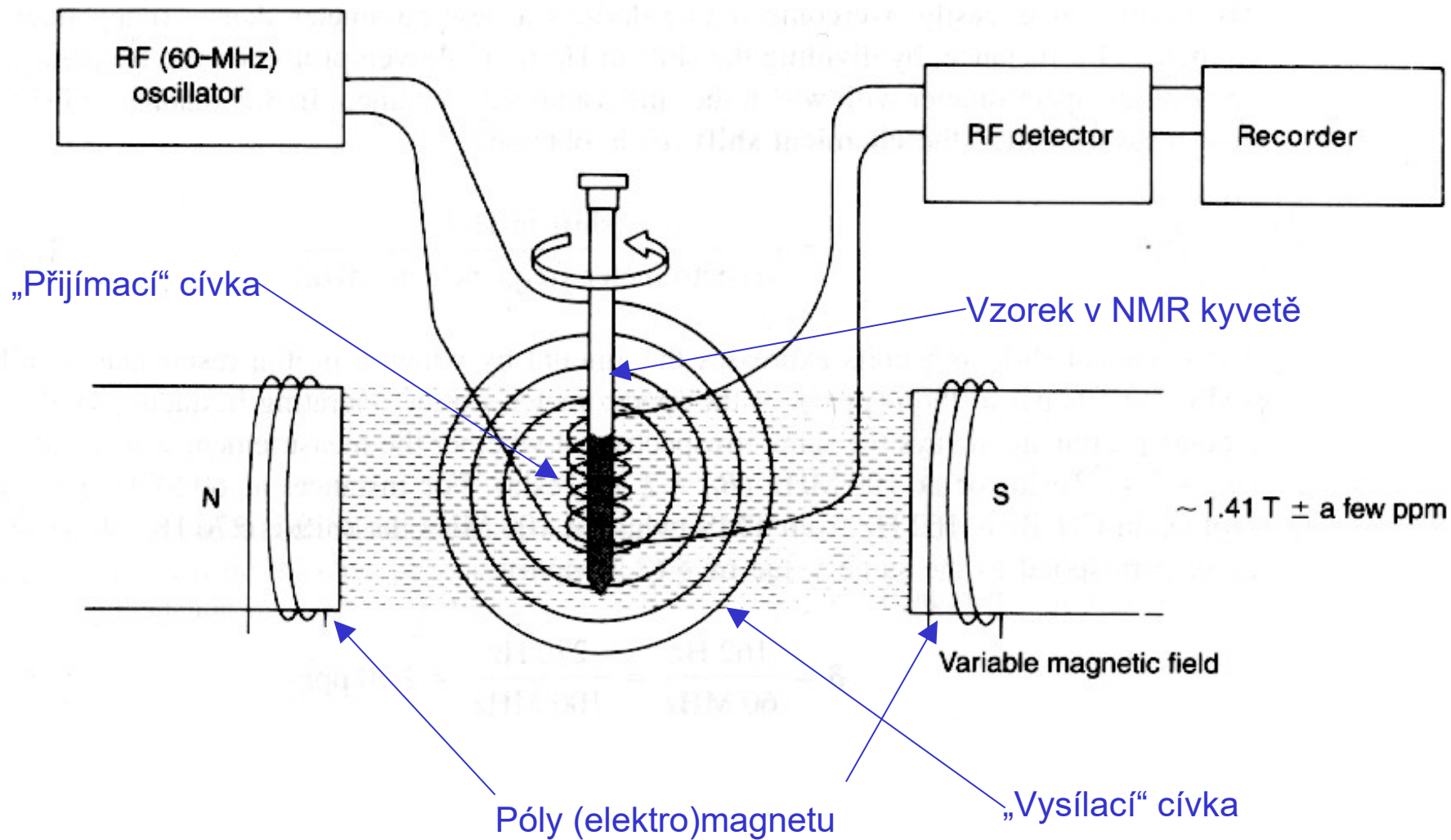
FT (Fourier transform) – krátkým vysokofrekvenčním pulzem se docílí absorpce energie v širokém frekvenčním rozsahu a matematickým zpracováním pulzní odezvy (návrat jader do základního stavu - FID - free induction decay - volné doznívání indukce) Fourierovou transformací (FT) se pak z časové závislosti získá frekvenční závislost absorbované energie

· spektra získaná oběma metodami jsou při stejné základní frekvenci spektrometru prakticky totožná

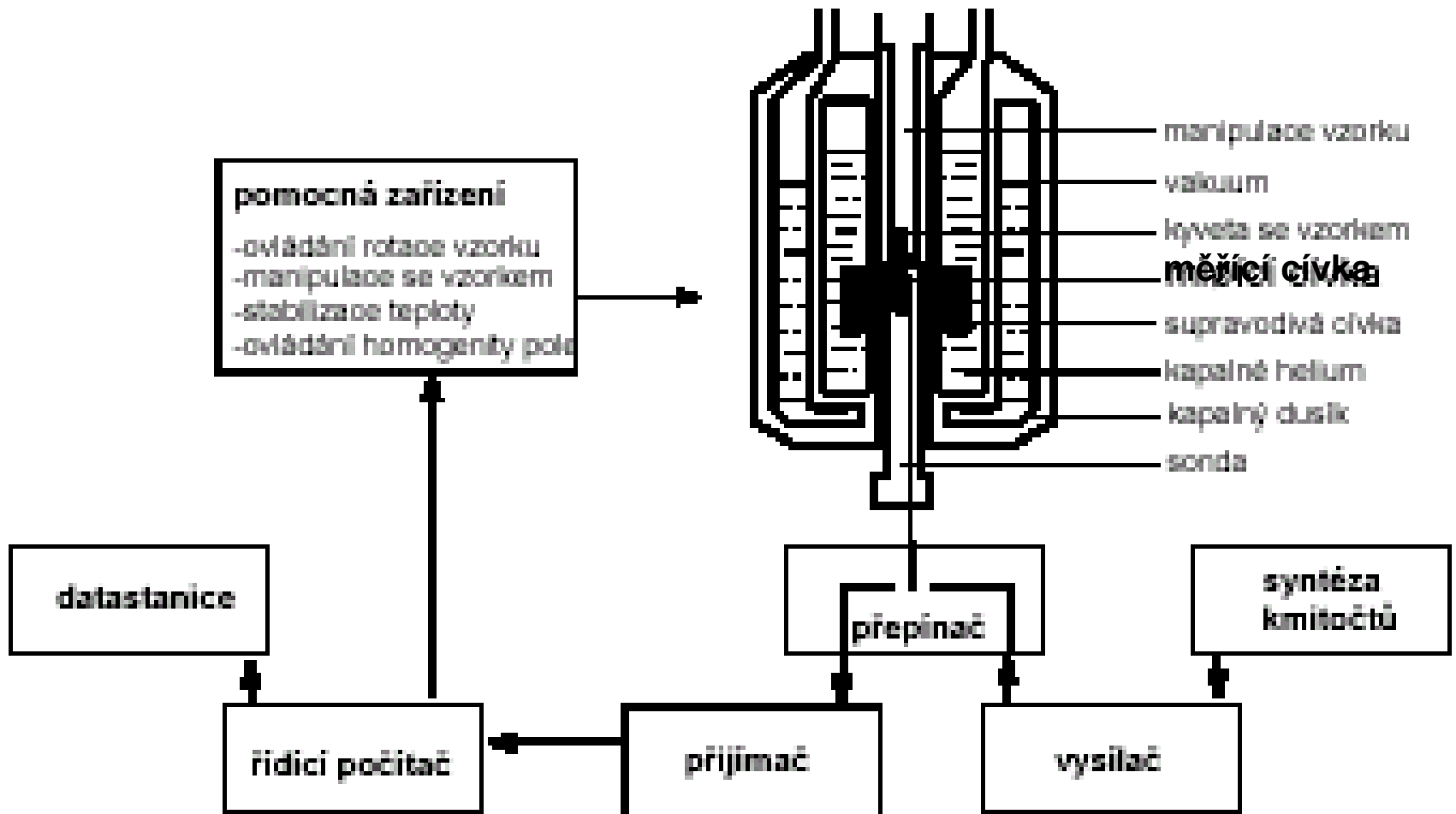
Interpretace $^1\text{H-NMR}$ spektra N-butylacetanilidu



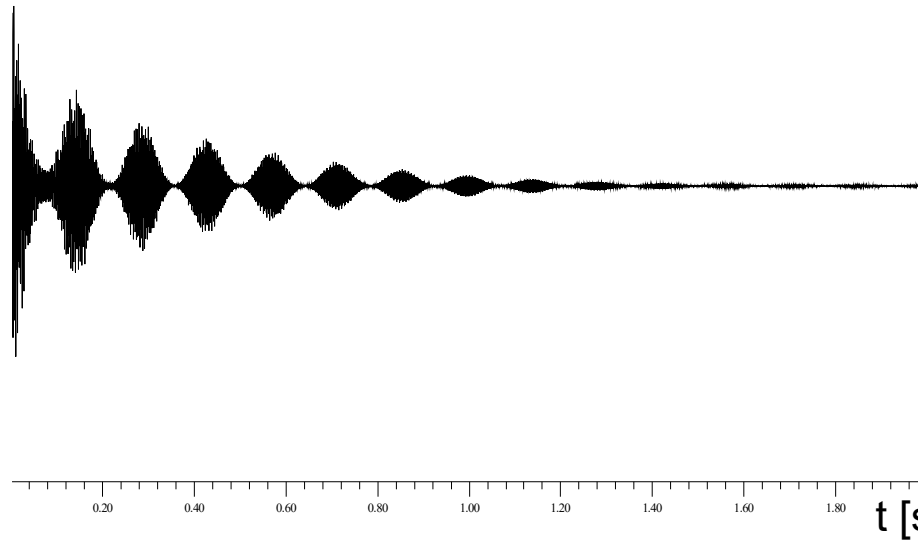
Principiální schéma CW NMR spektrometru



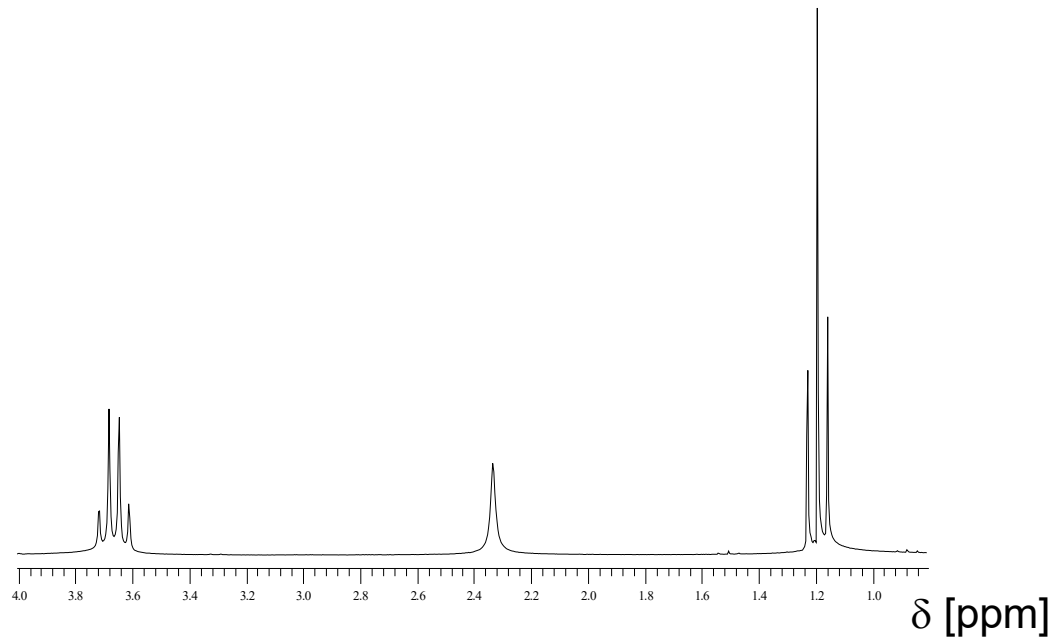
Principiální schéma FT NMR spektrometru



FID a FT-NMR spektrum ethanol



⇓ Fourierova transformace



Signály v NMR spektroskopii a jejich počet

Podmínka rezonance - závislost rezonanční frekvence, tj. frekvence, při níž do chází k absorpci energie spojené přechodem na vyšší energ. hladinu na daném jádře (izotopu)

$$2\pi f = \gamma B$$

γ ... magnetogyrický poměr - konstanta charakteristická pro daný izotop

B ... magnetická indukce

jednotlivé izotopy se navzájem liší magnetogyr. poměry, přirozeným výskytem a citlivostí

Stínění - elektrony kolem jádra i ostatní elektrony v molekule vytvářejí vlivem mag. pole magnetu spektrometru B_0 sekundární mag. pole, které specificky zeslabuje mag. pole působící na jádro \Rightarrow podmínka rezonance zohledňující indukci použitého magnetu:

$$2\pi f = \gamma B_0 \cdot (1 - \sigma),$$

kde σ je stínící konstanta charakterizující polohu jádra v molekule, čili jeho chemické okolí

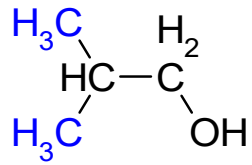
Signál = absorpční linie příslušející jednomu jádru nebo skupině jader **chemicky ekvivalentních**, která může být rozštěpena na více píků, čili tvořit **multiplet**

Jak zjistit, zda jsou jádra chemicky ekvivalentní?

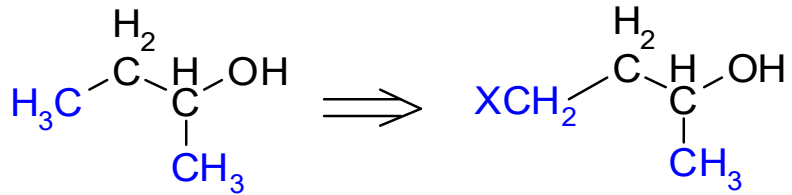
Máme-li více jader stejného izotopu v molekule,

- 1) provedeme jejich myšlenkovou substituci jiným izotopem, který se v molekule ještě nevyskytuje
- 2) zjišťujeme, zda vznikající sloučeniny jsou shodné nebo rozdílné; shodné \Rightarrow chem. ekvivalentní, neshodné \Rightarrow chem. neekvivalentní

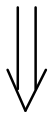
Substituční postup při zjišťování chemické ekvivalence



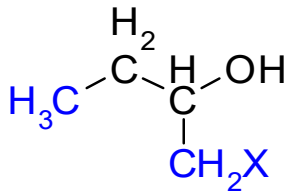
isobutylalkohol - substitucí stejné látky - metyly chem. ekvivalentní - 1 signál



sek. butylalkohol



substitucí vzniknou různé látky - metyly nejsou chem. ekvivalentní - 2 signály



Poloha signálu v NMR

závisí na umístění odpovídajícího atomu v molekule, t.j. na jeho chemickém okolí, k vyjádření se obvykle nepoužívá rezonanční frekvence v Hz, která je závislá na pracovní frekvenci přístroje, ale **chemický posun δ [ppm]**

$$\delta = (f - f_s) / f_0$$

kde f ... rezonanční frekvence jádra [Hz]

f_s ... rezonanční frekvence standardu (pro ^1H a ^{13}C tetramethylsilan) [Hz]

f_0 ... pracovní frekvence přístroje [MHz]

Spin – spinová interakce

chem. posun jádra δ je ovlivňován spinem sousedního jádra ; ovlivnění závisí na orientaci mag. momentu interagujícího jádra vzhledem k vnějšímu poli B_0 ; u jader s $I = 1/2$ jsou orientace 2: ve směru a proti směru mag. pole B_0 ;

orientace ve směru $B_0 \Rightarrow \uparrow$ lok. mag. pole $B \Rightarrow \uparrow \delta$

orientace proti směru $B_0 \Rightarrow \downarrow$ lok. mag. pole $B \Rightarrow \downarrow \delta$

obě orientace stejně pravděpodobné \Rightarrow rozštěpení signálu 1 sousedícím jádrem na 2 píky; n sousedících jader štěpí signál na $n + 1$ píků (platí pro interakci mezi anisochronními jádry, tj. s různými δ) \Rightarrow **multiplet**

Interakční konstanta J

= vzdálenost píků vzniklých rozštěpením signálu spin-spinovou interakcí vyjádřená v Hz

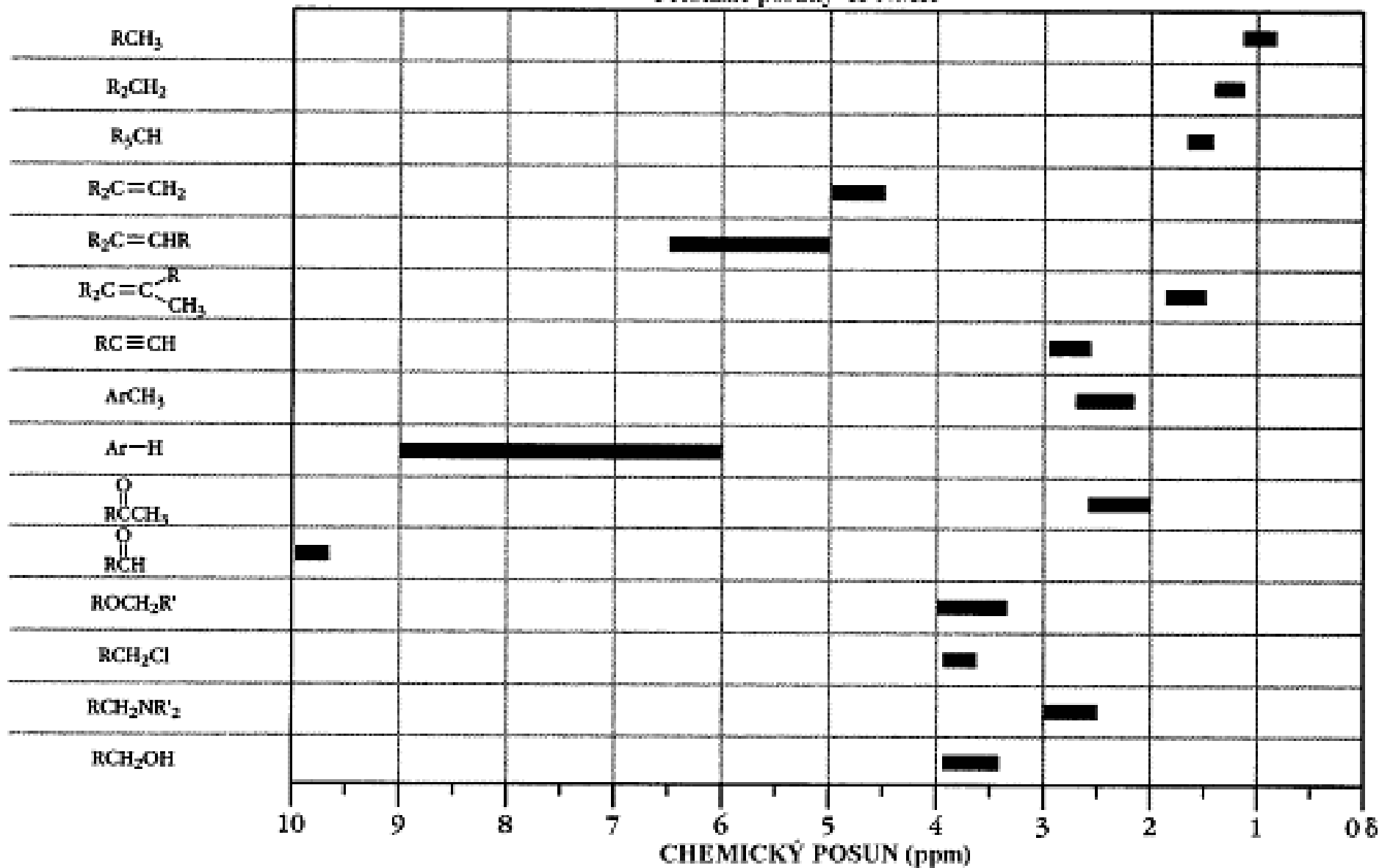
· velikost nezávisí na použitém magnetickém poli

· určitá hodnota J se ve spektru vyskytuje nejméně 2 \times , sousední jádra se štěpí navzájem

Přehled chemických posunů významnějších funkčních skupin a seskupení atomů

Typ H atomu

Přibližné posuny ¹H-NMR



Multiplety prvního řádu a určování interakčních konstant

Multiplet 1. řádu = soubor píků vzniklých štěpením signálu spin-spinovou interakcí a dokonale od sebe oddělených a s intenzitami v definovaných poměrech

Počet sous. jader	Multiplet	Zkr.	rel. intenzity
0	singlet	s	1
1	dublet	d	1 1
2	triplet	t	1 2 1
3	kvartet	q	1 3 3 1
4	kvintet	qi	1 4 6 4 1
5	sextet	sx	1 5 10 10 5 1
6	septet	sp	1 6 15 20 15 6 1

poměry intenzit platí u homonukleárního štěpení v případě, že rozdíl posunů interagujících jader v Hz je mnohem větší než. int. konstanta

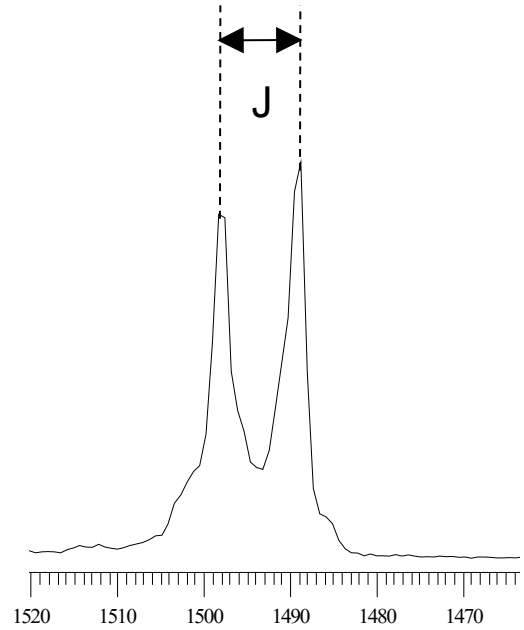
$$\Delta f \gg J$$

pokud se rozdíl řádově blíží int. konstantě (mezi šestinásobek)

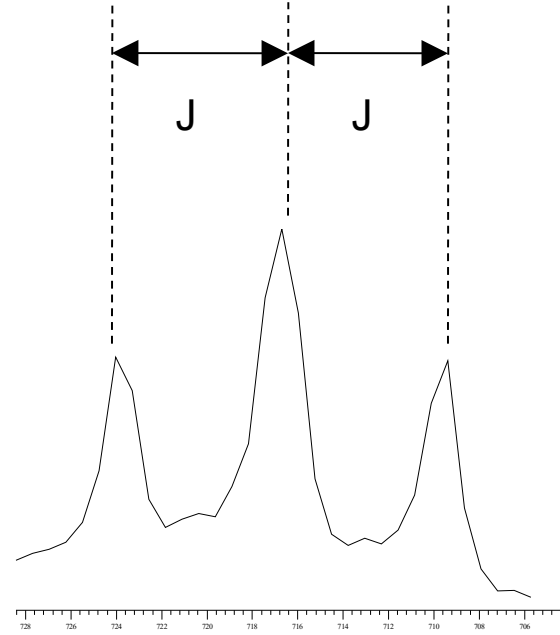
$$\Delta f \geq 6J ,$$

nastává zkreslení relativních intenzit - tzv. stříškový efekt

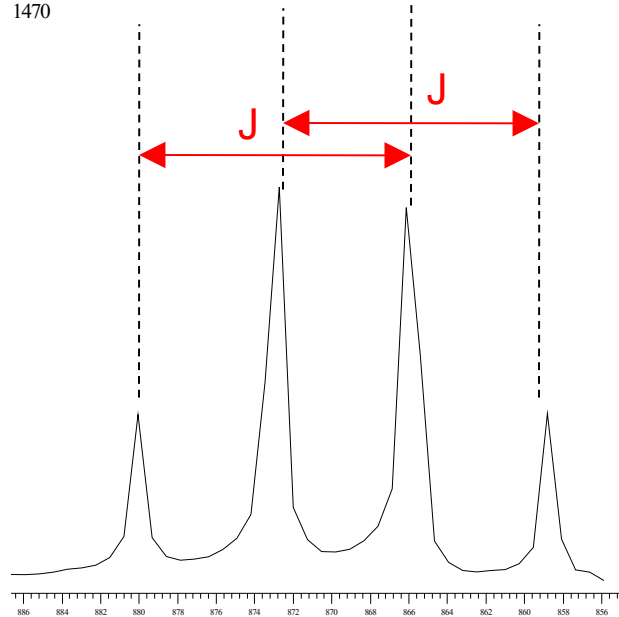
Multiplety prvního řádu a určování interakčních konstant



dublet



triplet



kvartet (kvadruplet)

Stříškový efekt

$\Delta f \sim 6 \Rightarrow$ zkreslení intenzit multipletu; na straně obrácené k signálu interagujícího jádra intenzita větší; spojnice vrcholů píků tvoří „stříšku“; lze použít ke zjištění, která jádra interagují



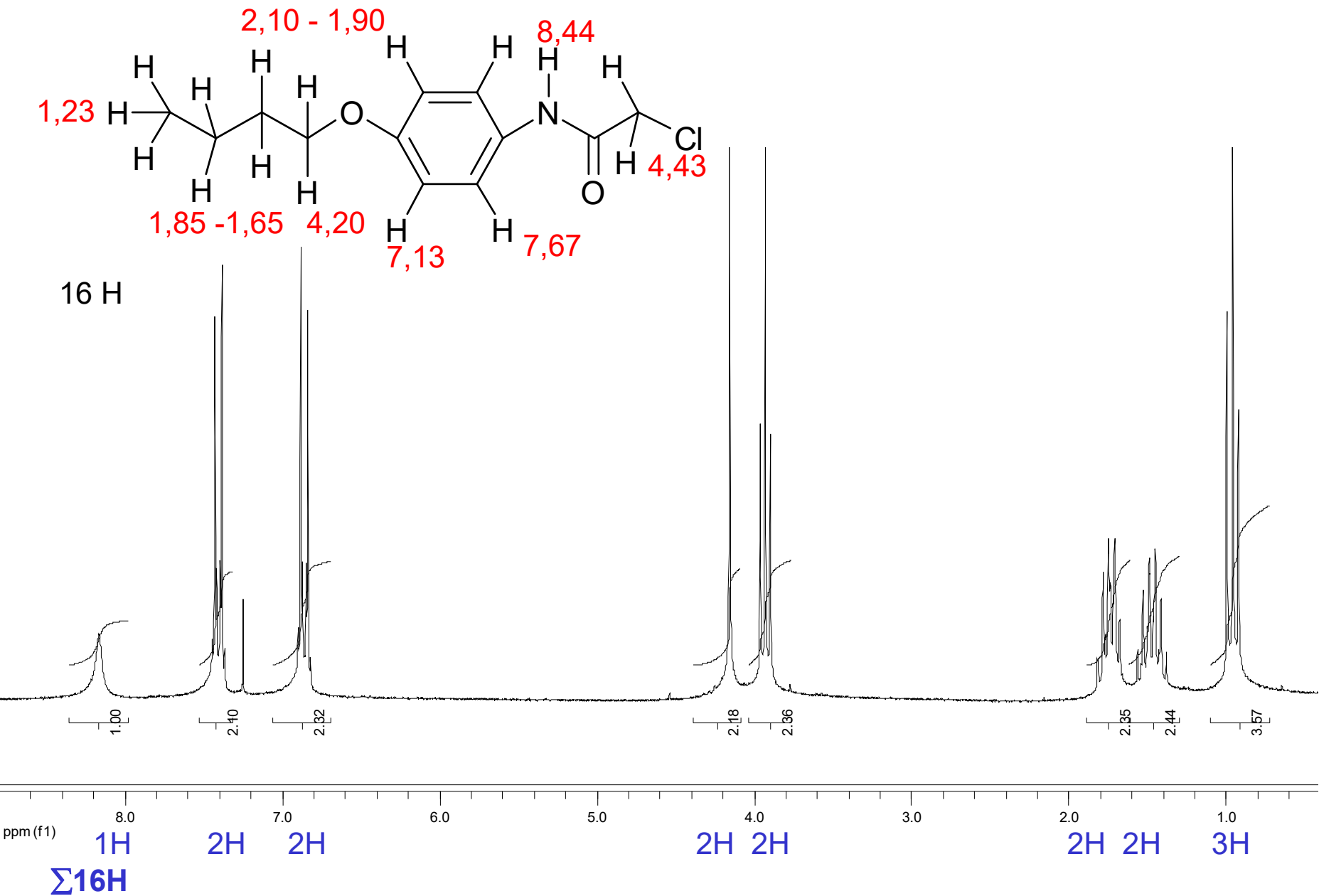
Interpretace a výpis $^1\text{H-NMR}$ spektra

Možný postup při ověřování struktury připravené (izolované) sloučeniny

1. Nakreslíme strukturní vzorec látky se všemi vodíky, vodíky spočítáme.
2. Najdeme signál, který odpovídá známému počtu vodíků, vydělením integrální intenzity (relativní plochy) tohoto signálu odpovídajícím počtem vodíků získáme podíl integrální intenzity, připadající na jeden vodík („jednotkový integrál“)
3. Vydělením integrálních intenzit „jednotkovým integrálem“ získáme počty vodíků odpovídající jednotlivým signálům.
Namísto 3. + 4. lze přiřadit signálu se známým počtem vodíků tento počet (např. 3H pro CH_3 , plochy ostatních signálů se v softwaru automaticky přepočítají).
4. Sečteme počty vodíků celého spektra a součet porovnáme s počtem vodíků předpokládané sloučeniny. V případě, že počet (alespoň přibližně) souhlasí, pokračujeme dále. Nesouhlas znamená, že se buď nejedná o předpokládanou strukturu, nebo je látka silně znečištěná.
5. Přiřazujeme δ jednotlivých signálů příslušným skupinám vodíků. Využíváme štěpení (včetně odečtení J a jejich porovnání s hodnotami v tabulkách), chemické posuny porovnáme s hodnotami v tabulkách nebo publikacích, hodnotami vypočtenými s využitím inkrementů uvedených v literatuře nebo vhodného software. Pokud tyto údaje nestačí, změříme další typy NMR spekter (^{13}C , 2D spektra).
5. Hodnoty ze spektra vypíšeme způsobem obvyklým nebo požadovaným v časopise, kde chceme přípravu (izolaci) látky opublikovat.

Interpretace a výpis ¹H-NMR spektra - příklad

N-(4-butoxyfenyl)chloracetamid



Interpretace a výpis $^1\text{H-NMR}$ spektra - příklad

N-(4-butoxyfenyl)chloracetamid

V syntetických publikacích včetně diplomových a dizertačních prací se zpravidla neuvádějí NMR spektra v grafické podobě, ale výpisy interpretovaných spekter. V detailech se liší podle požadavků jednotlivých redakcí.

Výpis $^1\text{H-NMR}$ spektra N-(4-butoxyfenyl)chloracetamidu může vypadat např. takto:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, δ [ppm], J[Hz]): 8,44 1H s (NH), 7,67 2H d J=8,8 (*o*-arom.), 7,13 2H d J=8,8 (*m*-arom.), 4,43 2H s (CH_2Cl), 4,20 2H t J=6,6 (OCH_2), 2,10-2,90 2H m (CH_3CH_2), 1,85-1,65 2H m (CH_2CH_3), 1,23 3H t J=7,3 (CH_3)

Poznámky k ^{13}C -NMR spektroskopii

• izotop ^{13}C v organické hmotě představuje jen asi 1 % veškerého uhlíku \Rightarrow metoda je méně citlivá než ^1H -NMR

- měření trvá déle, k dostatečnému odstupu signál/šum je třeba naakumulovat větší počet FIDů (standardně 1024, při malém množství vzorku řádově více)

- malá pravděpodobnost sousedství 2 jader ^{13}C \Rightarrow nedochází ke spin - spinové interakci $^{13}\text{C} - ^{13}\text{C}$, nastává však štěpení $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, to je však odstraněno elektronickým „dekaplinkem“, takže výsledné ^{13}C -NMR spektrum je čarové

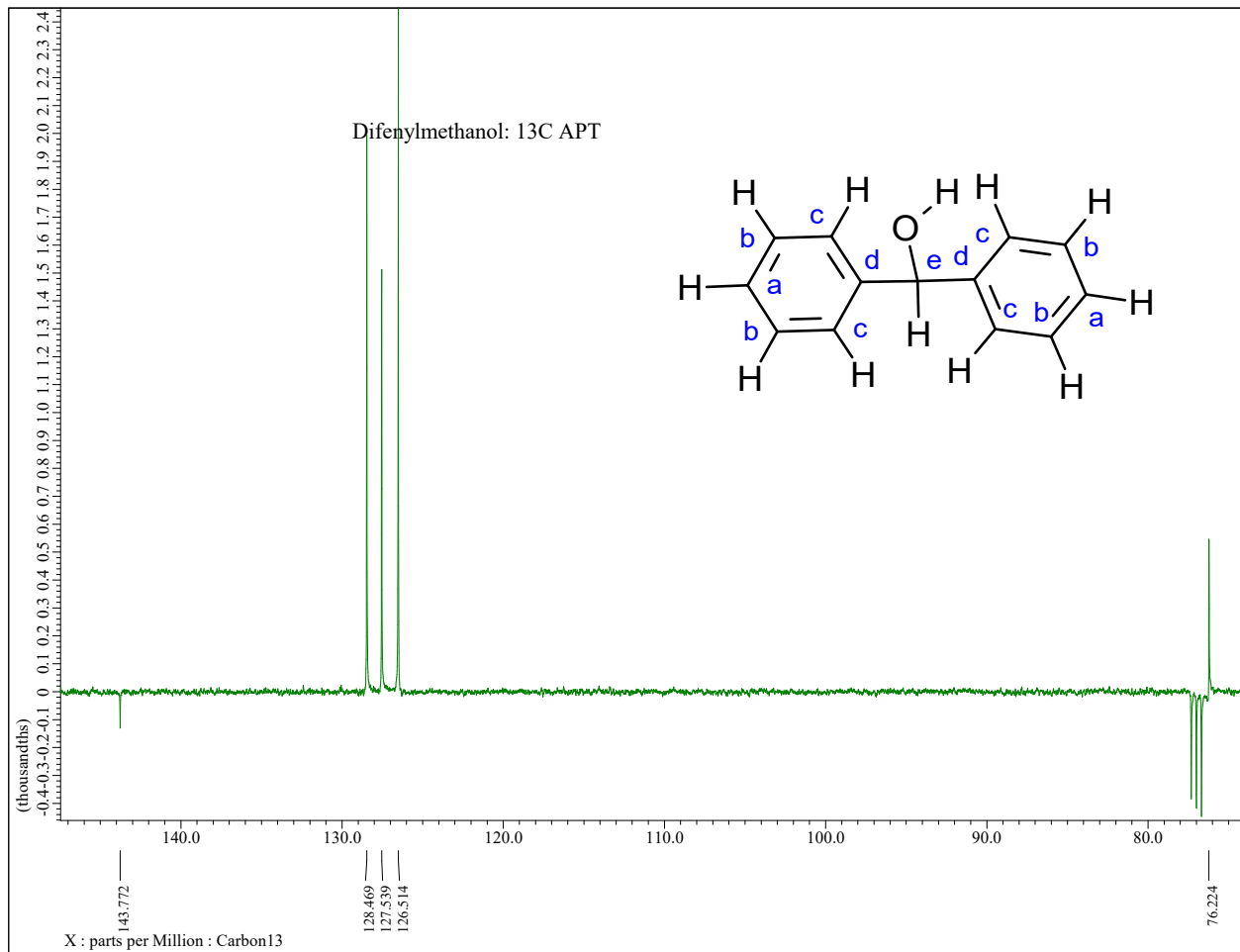
u ^{13}C spekter se obvykle nevyužívají integrální plochy, protože různě substituované typy uhlíků (primární, sekundární, terciární, kvartérní) mají různý tzv. relaxační čas, tj. čas, za který přejde jádro uhlíku zpět do základního stavu, a proto se zachytí na spektru s různou intenzitou

interpretace se provádí na základě porovnání posunů na spektru s posuny vypočtenými nebo nalezenými v literatuře, často se speciálními NMR experimenty rozlišují typy uhlíků,

- např. APT = **Attached Proton Test rozliší jádra se sudým a lichým počtem vodíků: jádra se sudým počtem vodíků (0, 2) pak směřují na jednu stranu od základní linie, jádra s lichým počtem (1, 3) na opačnou** (viz příklad na následujícím snímku)

počet čar na ^{13}C -NMR spektru musí odpovídat počtu chemicky různých uhlíků molekuly.

Interpretace a výpis ^{13}C -APT NMR spektra



- **chemicky různé** atomy uhlíku označíme ve vzorci písmeny malé abecedy
- pod zákl. linii („bejzlatnu“) zde směřují uhlíky se sudým počtem vodíků (zde pouze 0)
- nad zákl. linii uhlíky s lichým počtem (zde jenom CH)
- interpretujeme s přihlédnutím k δ a k délce čáry (delší znamená více – zde 2x více, 4x více „chemicky stejných“ uhlíků (avšak vzhledem k rozdílným relaxačním časů jednotlivých „typů“ uhlíku nelze u ^{13}C -NMR porovnávat integrální plochy)
- neoznačený triplet patří rozpouštědлу (CDCl_3)

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ [ppm]): 143,8d; 128,5b; 127,6a; 126,5c; 76,2e