

# **. Základy fytochemie a farmakognozie P6**

## **2024/2025**

**Spektrofotometrické metody, spektroskopie, identifikace látek,  
kvantifikace**

# Analytické techniky

## – Určené ke

- Strukturní analýze
- Kvalitativní analýze
- Kvantitativní analýze

## – Spojené s

- Spektrofotometrií
- Kolorimetrií
- HPLC
- GC
- TLC

- Infračervená spektrometrie
- Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti
- Hmotnostní spektrometrie
- Nukleární magnetická rezonance
  
- Jejich online kombinace se separačními technikami

## F. W. Herschel (1738-1822)

Zakladatel oboru  
infračervené spektroskopie



Paprsek elmag. záření o intenzitě  $I_0$  prochází látkou:

- Dochází k absorpci.
- Prochází bez absorpce - úplná transmitance.
- Záleží na frekvenci paprsku a charakteru (ne)absorbující molekuly

Elmag. záření je energie - při absorpci dochází ke změně energetického stavu látky: ze stavu základního přechází na vyšší energetickou hladinu.

Pokud frekvence záření neodpovídá tzv. Bohrově frekvenční podmínce (kvantum energie paprsku odpovídá rozdílu energií dvou energetických stavů látky), nedochází k absorpci.

Spektrum látky = rozdíl mezi dopadajícím zářením a procházejícím.

$$E_{kon.} - E_{poč.} = E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

## Typy absorpční spektroskopie

Závisí na typu přechodu do vyšších energetických hladin a odpovídajícímu rozsahu frekvencí absorbovaného záření.

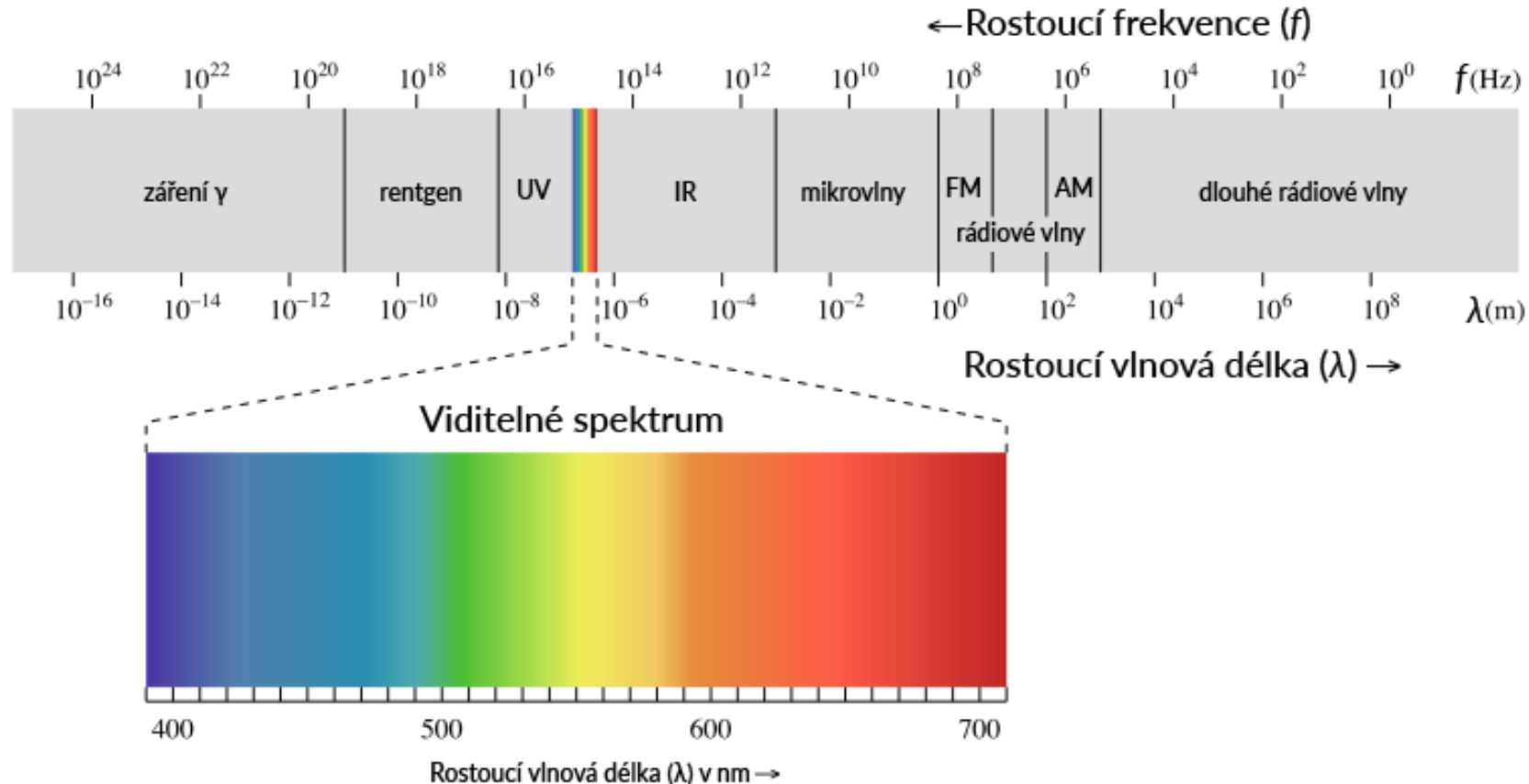
- Rotační stav.
- Vibrační stav.
- Excitace valenčních elektronů.

# Typy absorpční spektroskopie:

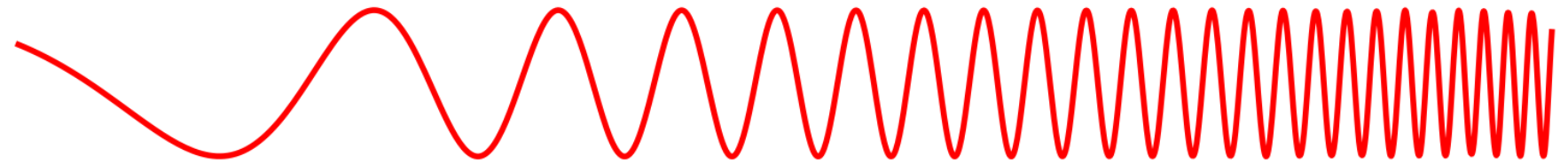
Mikrovlnná spektroskopie

Infračervená spektroskopie

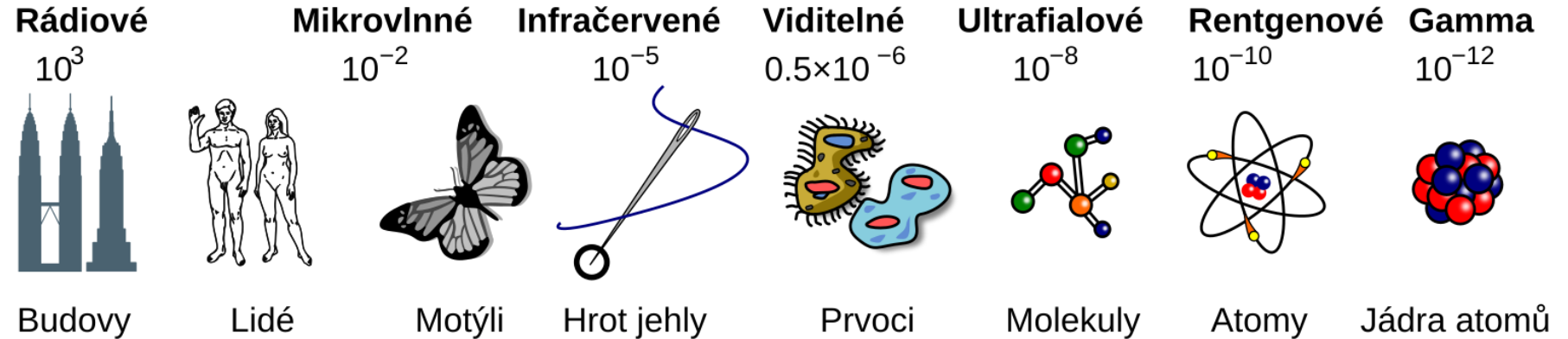
UV/Vis spektroskopie



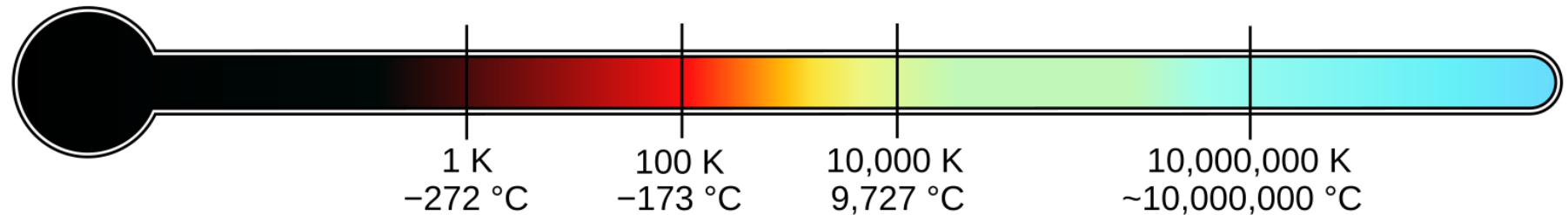
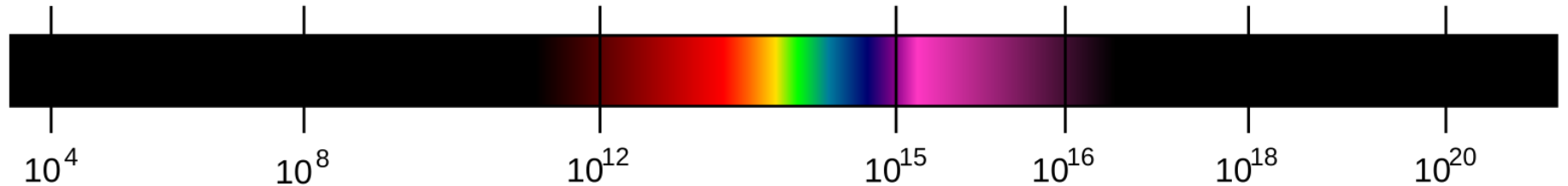
Projde Atmosférou?



Druh záření  
Vlnová délka (m)



Frekvence (Hz)



- Infračervená oblast leží mezi červenou oblastí viditelného světla a mikrovlnou oblastí.
- IČ oblast
  - Blízká (NIR).
  - Střední (fundamentální).
  - Vzdálená (FIR).

# Infračervená spektroskopie

Molekula se může pohybovat různým způsobem:

**V prostoru určitým směrem a rychlostí** - translační pohyb, je spojen s kinetickou energií molekuly

existují 3 translační stupně svobody

**Rotace podle jisté vnitřní osy-**

rotační pohyb, spojen s kinetickou rotační energií

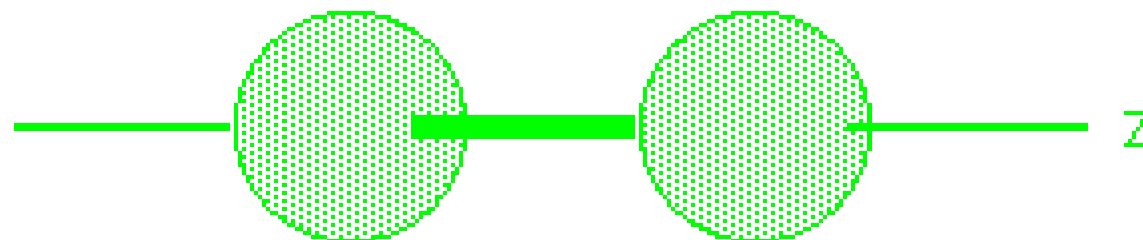
existují 3 rotační stupně svobody

$$E_K = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m_x v^2 + \frac{1}{2}m_y v^2 + \frac{1}{2}m_z v^2$$

$$E_{k\ rot} = \frac{1}{2}I_x \omega_x^2 + \frac{1}{2}I_y \omega_y^2 + \frac{1}{2}I_z \omega_z^2$$



Možnost vibrace - 1 stupeň vibrační volnosti  
Dvouatomová molekula



Lineární molekuly:  $3N-5$  stupňů volnosti

Nelineární molekuly:  $3N-6$  stupňů volnosti

Každý z vibračních pohybů se projeví jistou charakteristickou frekvencí.

Každý z vibračních pohybů je spojen s jistým energetickým stavem.

Molekula může přejít do jiného energetického stavu přijutím energie.

Frekvence světelného paprsku musí odpovídat frekvenci vibrace.

Můžeme měřit frekvence vibrací pomocí frekvencí světla absorbovaného látkou.

$$E_{kon.} - E_{poč.} = E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

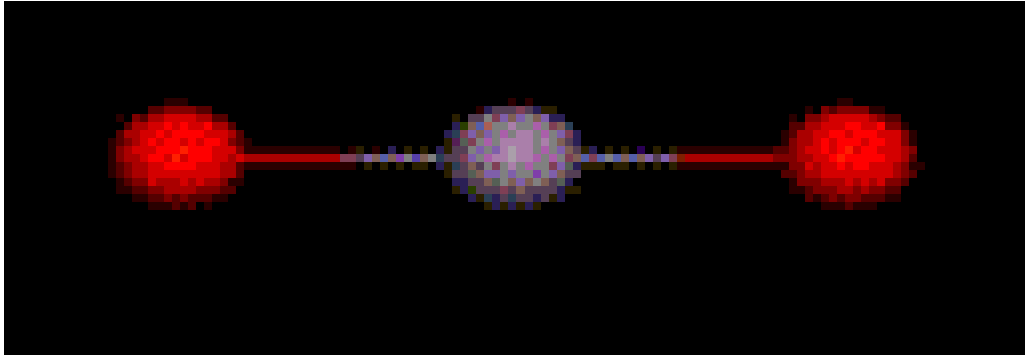
Infračervené spektrum látky je pak graf závislosti intenzity IČ světla propuštěného nebo absorbovaného látkou na energii IČ světla vyjádřené ve vlnóčtech ( $\text{cm}^{-1}$ ) nebo vlnových délkách (mikrony). Transmitanci volíme v případě přehledových spekter, absorbanci při kvantitativním sledování intenzity.



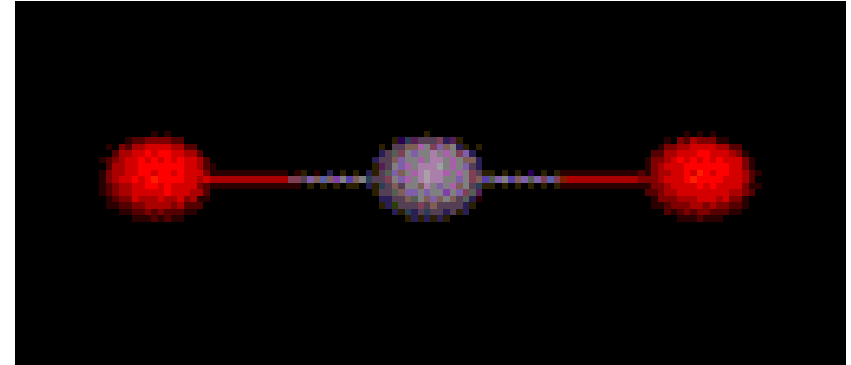
Vibrace molekuly neznamená přímo absorpci IČ světla. Molekula musí mít jistý dipolový moment. Může být stalý (HCL) nebo vzniká vibrací molekuly (CO<sub>2</sub>).



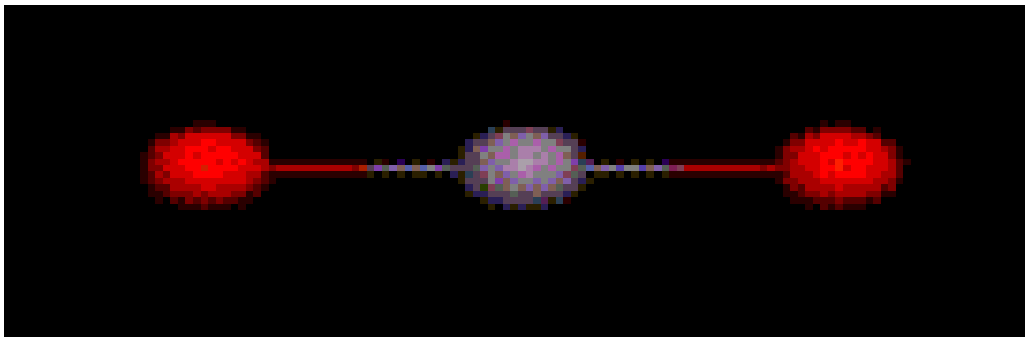
Asymetrický stretch



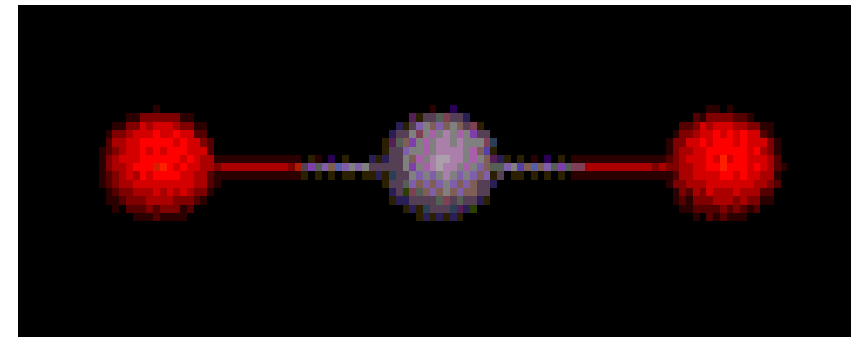
Vertical bend



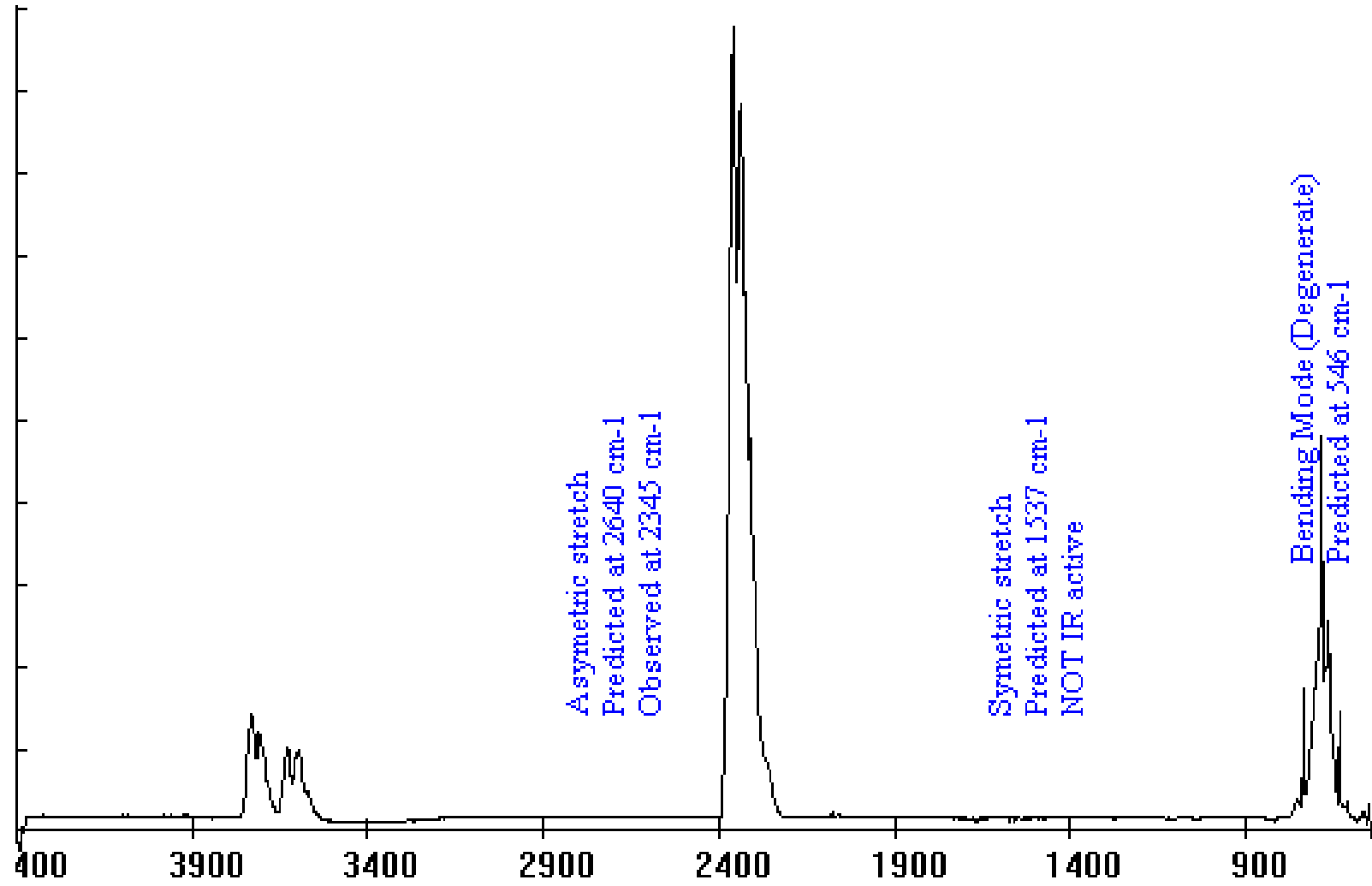
Symetrický stretch



Horizontal bend



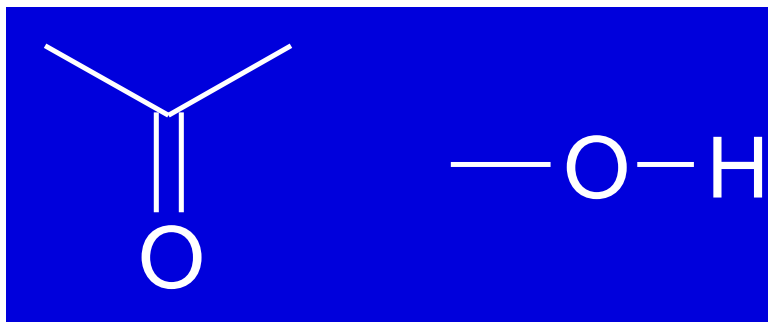
# IČ spektrum oxidu uhličitého



# Aplikace infračervené spektroskopie v organické chemii

Funkční skupiny organických molekul obsahují atomy o různé hmotnosti spojené vazbami různé síly. Různé vibrační frekvence.

Příklad:



Karbonyl:  $1700\text{ cm}^{-1}$

Hydroxyl:  $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$

– V organické chemii IČ spektrum dělíme do 3 oblastí:

1. 4000-1300  $\text{cm}^{-1}$

2. 1300-900  $\text{cm}^{-1}$

3. 900-600  $\text{cm}^{-1}$

1. Oblast funkčních skupin a vazebných vibrací.

2. Oblast otisku prstu.

3. Oblast absorpcí aromatického jádra.



## Nejdůležitější vybrané frekvence:

Typ vazby	Typ sloučeniny	Rozsah frekvencí
C-H	Alkany	2960-2850(s) stretch 1470-1350(v) scissoring and bending
	Alkeny	3080-3020(m) stretch 1000-675(s) bend
C-O	Alkoholy, ethery, karboxylové kyseliny, estery	1260-1000(s) stretch
C=O	Aldehydy, ketony, karboxylové kyseliny, estery	1760-1670(s) stretch
O-H	Primární alkoholy	3640-3160(s,br) stretch
	Alkoholy a fenoly s vodíkovým můstkem	3600-3200(b) stretch
	Karboxylové kyseliny	3000-2500(b) stretch

# Využití:

1. Strukturní analýza.
2. Identifikace neznámé látky v kombinaci s dalšími metodami.
3. Identifikace neznámé látky srovnáním se standardem nebo knihovnou spekter.
4. Čistota.
5. Kvantitativní analýza.
6. Sledování průběhu chem. reakcí.

# Příprava vzorku pro IČ spektroskopii

## – Kapalný vzorek:

- Kapalná látka nebo naředěný a rozpuštěný vzorek
- Lepší neředit- interakce rozpouštědla a látky.
- Nutná velmi krátká optická dráha (0,1 mm)- kyveta nebo dvě destičky.
- Ředění na  $\sim 0,2$  M roztok ( $\text{CCl}_3$ ,  $\text{CS}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).
- Kyveta nebo film.

## – Pevné vzorky:

### 1. Metoda tzv. Mull (nujolová metoda)

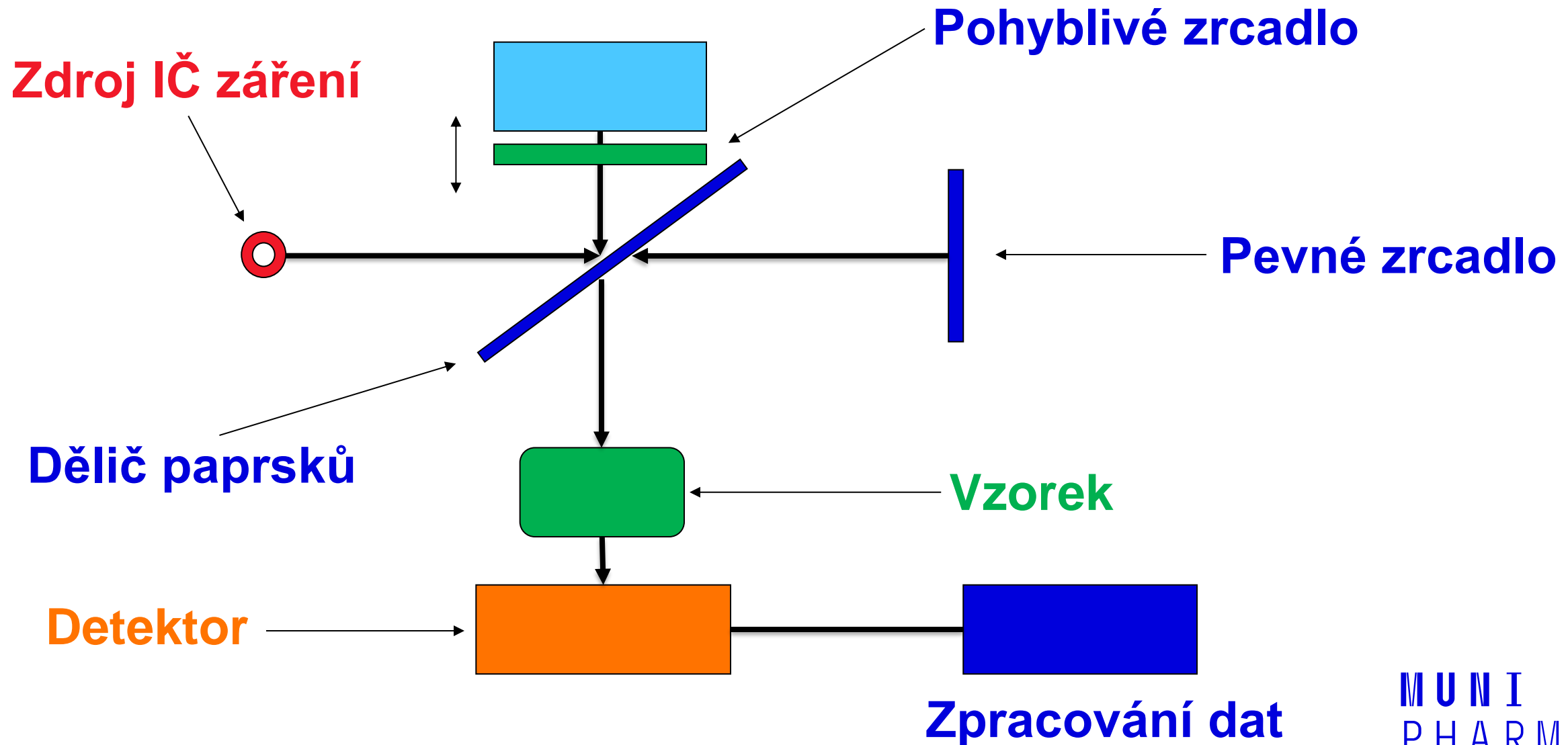
- Vzorek se po rozdrcení smísí s malým množstvím netěkavého rozpouštědla- vytvoří se pasta, která se rozetře mezi destičky.
- Pohodlnější, rychlejší, žádné extrémní podmínky.

### 2. Metoda KBr tablety (pastilková metoda)

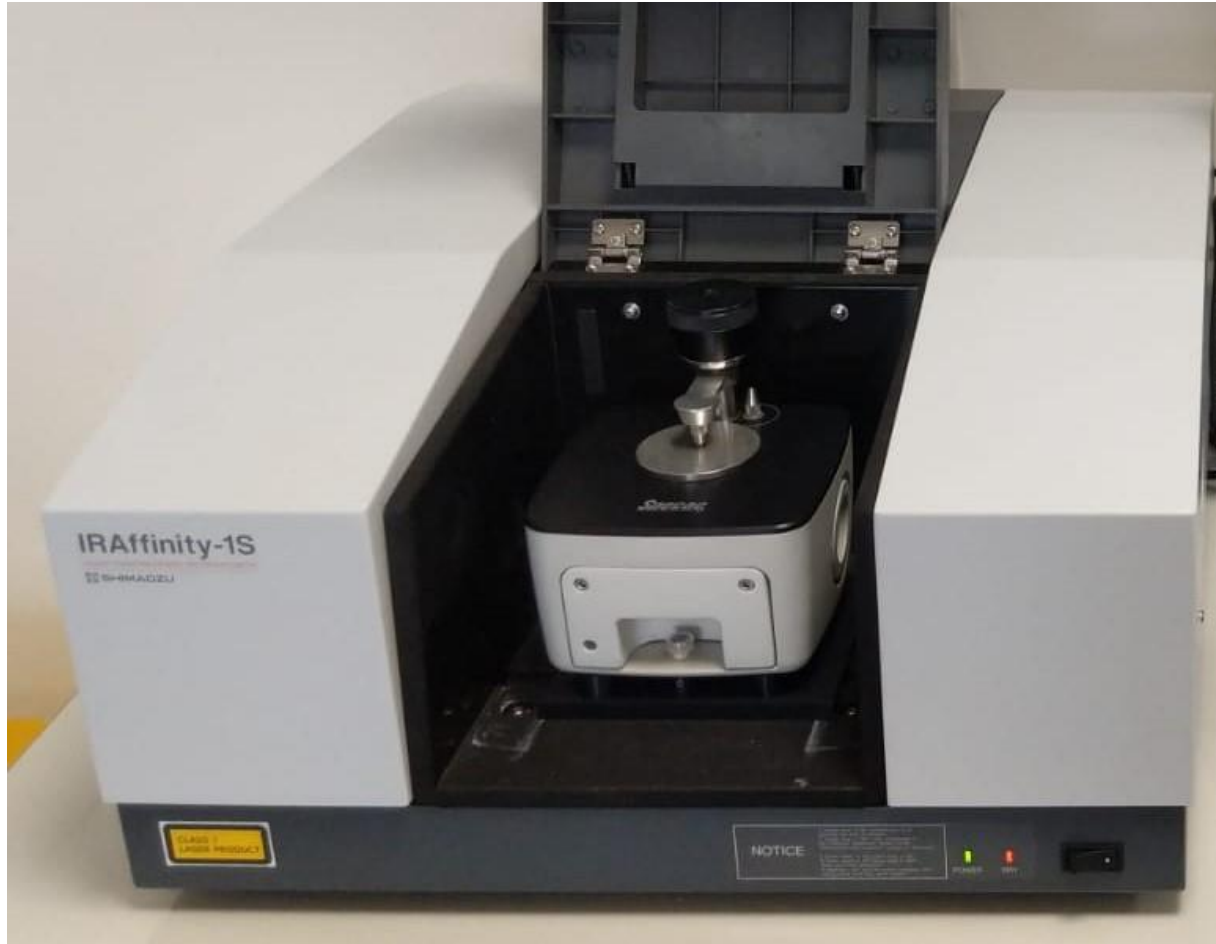
- KBr neadsorbuje v IČ nad  $250\text{ cm}^{-1}$ .
- Nutná absence vlhkosti.
- Lepší v případě termostabilních látek, lepší homogenizovatelnost materiálu, kvalitnější spektra.

### 3. Metoda ATR

# Instrumentace FTIR



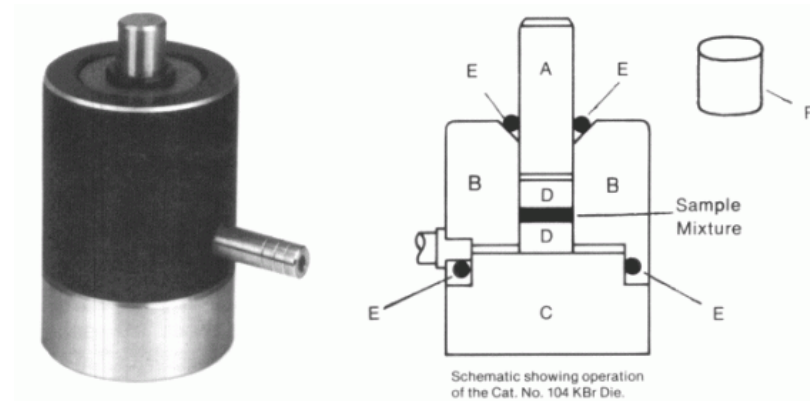
# Instrumentace FTIR



By Keshavana - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=79781005>



4.2: IR Spectroscopy - Chemistry LibreTexts; Autor: Paul Derry



<https://chem.washington.edu/instruments/kbr-pellet-press>

# Ultrafialová spektrometrie

Definice pojmů:

$\lambda$  – vlnová délka

$\nu$  – vlnčet

$\nu$  – frekvence

$c$  – rychlost světla ve vakuu

$h$  – Planckova konstanta  $6,61 \times 10^{-34}$  J/s

Energie absorbovaná molekulou je kvantová a musí splňovat rezonanční Bohrovu podmínku.

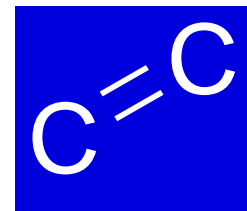
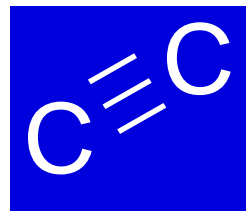
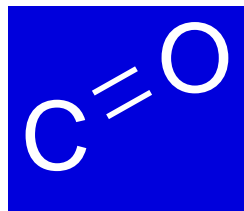
$$\frac{1}{\lambda} = \nu = \frac{\nu}{c}$$

$$E = h \cdot \nu$$

# Všeobecné principy absorpce elmag. Záření v oblasti 200 až 900 nm

Za absorpci záření jsou odpovědné určité strukturní elementy, které se nazývají chromofory.

Chromofory- izolované krátké vazby

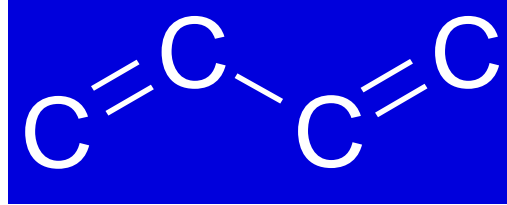


Jedná se převážně o  $\pi - \pi^*$  přechody

Další absorbující skupiny - auxochromy: působí

- Batochromní posun (červený)
- Hypsochromní posun (modrý)
- Hyperchromní posun
- Hypochromní posun

# Konjugované systémy



Vliv prostředí a rozpouštědla

- Změna polohy a/nebo intenzity pásu

Chemický vliv

Tvorba komplexů

Tvorba tautomerů

Polarita rozpouštědla a samotné látky

Disociace



## – Energetické hladiny:

Při absorpci elmag. záření přecházejí elektrony z jednoho energetického stavu do druhého, molekula tím pádem přechází ze stavu základního do excitovaného.

Interpretace přechodů pomocí molekulových orbitalů

Elektrony se řadí podle energie:

$$\sigma < \pi < n$$

$\sigma$  - vazebný elektron

$\pi$  -  $\pi$  elektron dvojných a trojných vazeb

$n$  - elektron volného elektronového páru

Nejčastější přechody:

$$n - \pi^*$$

$$\pi - \pi^*$$

$$\sigma - \pi^*$$

## Výběrová pravidla:

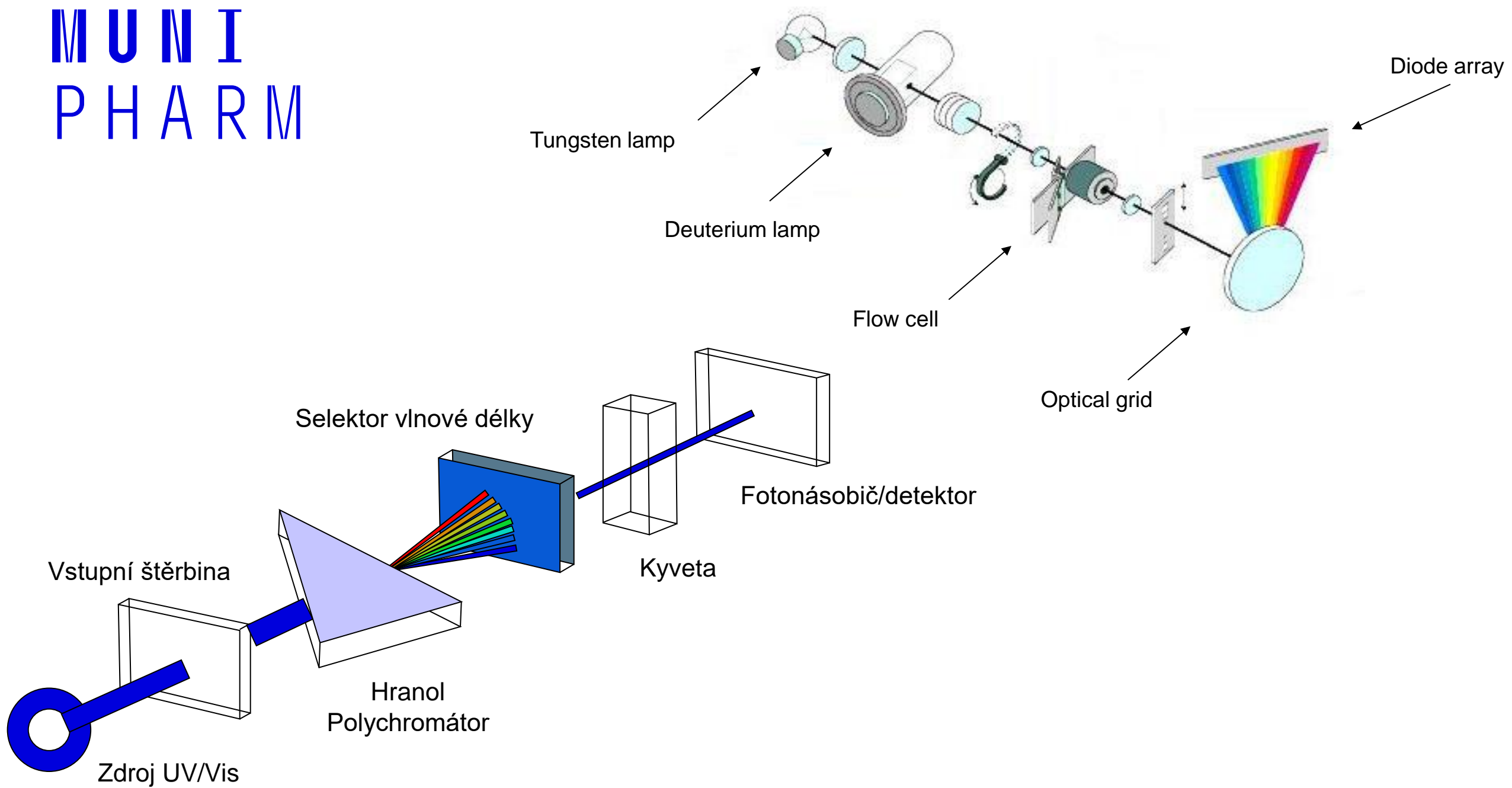
Podle nich se řídí jestli k přechodu dojde nebo ne.

1. Při pohlcení kvanta energie se do vzbuzeného stavu může dostat pouze jeden elektron.
2. Spinové kvantové číslo se při pohlcení energie nesmí změnit.

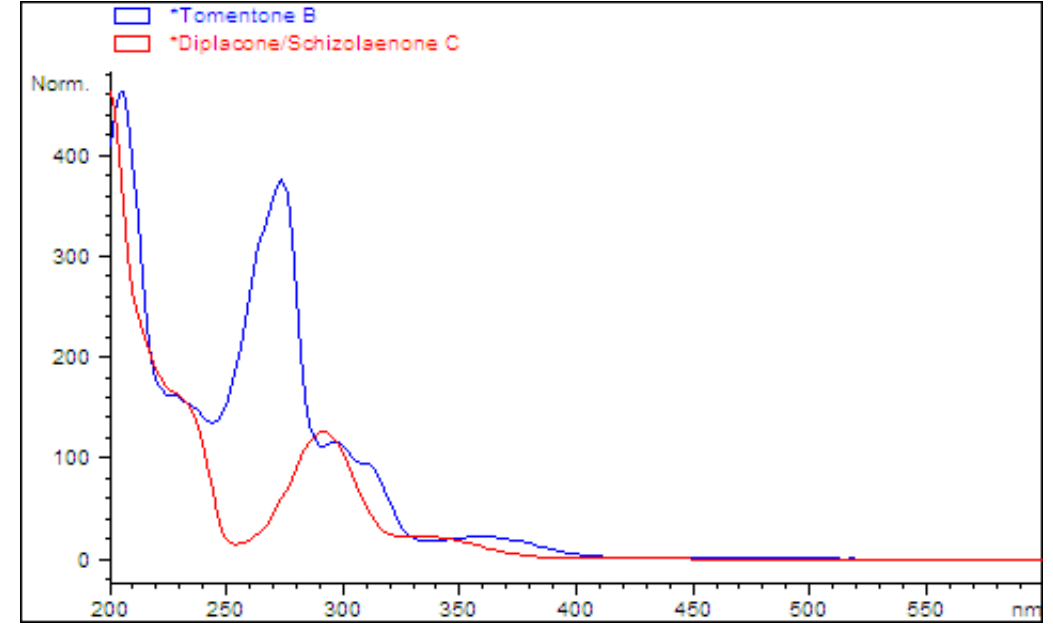
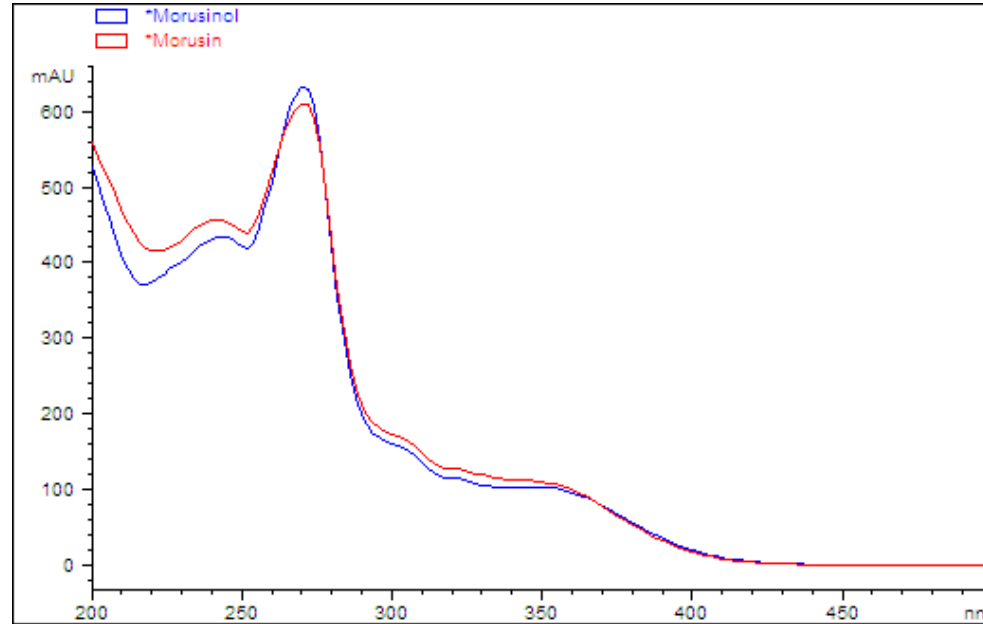
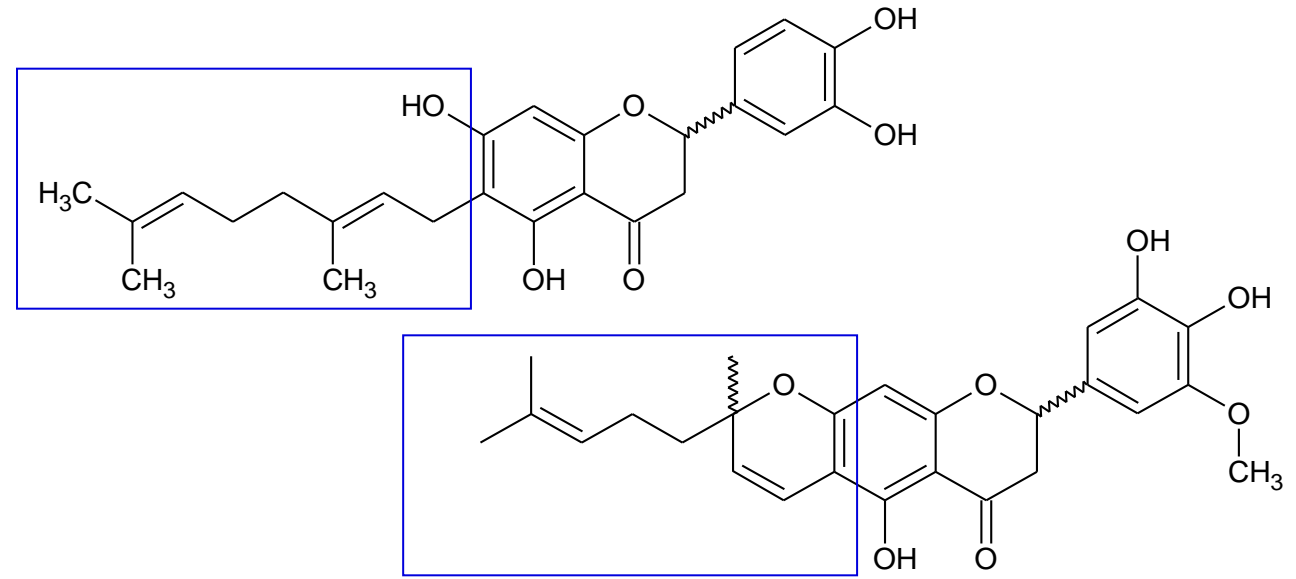
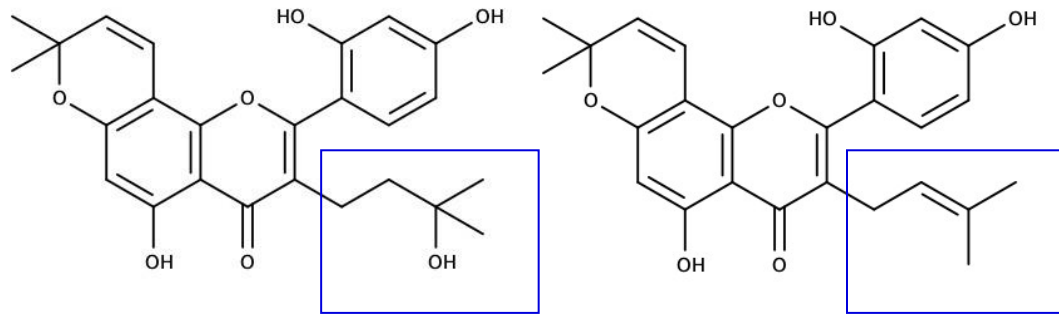
Lambert-Beerův zákon

$$A = \log(I_0 / I) = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

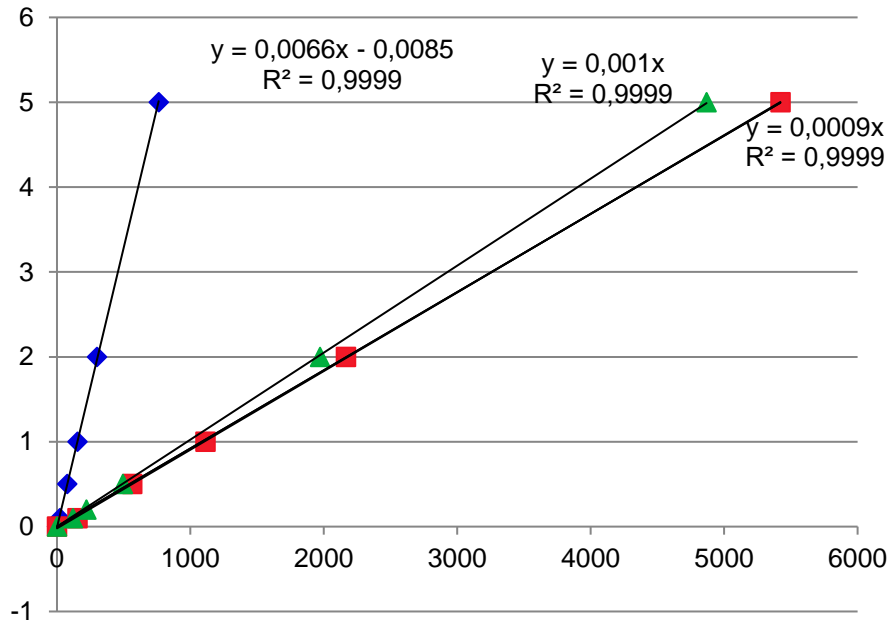
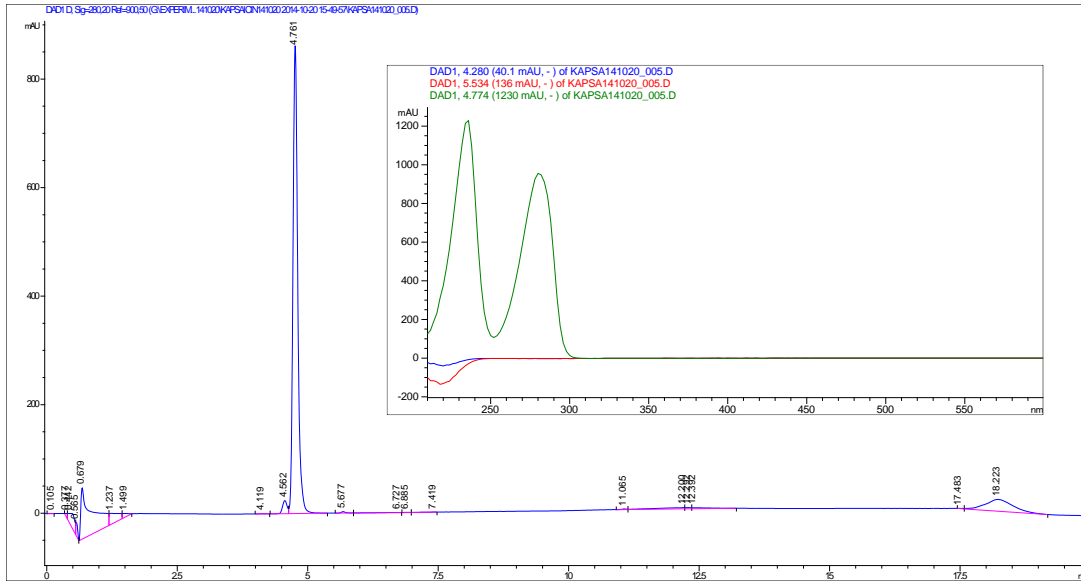
# MUNI PHARM



# Strukturní analýza



# Využití pro kvantifikaci



## Kapsaicin kalibrace

Metoda:

Kolona Ascentis Express RP-Amide 2.7 μm, 100 × 2.1 mm

Gradien acetonitril : 0.2% HCOOH

0. minut 30:70, 10. minuta 71:29

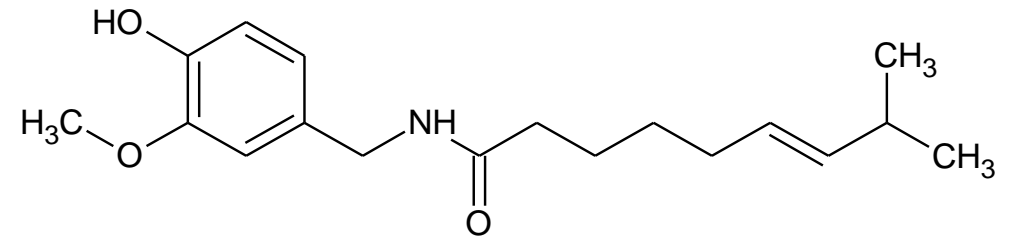
Průtok 0.5 mL/min

Teplota 40 °C

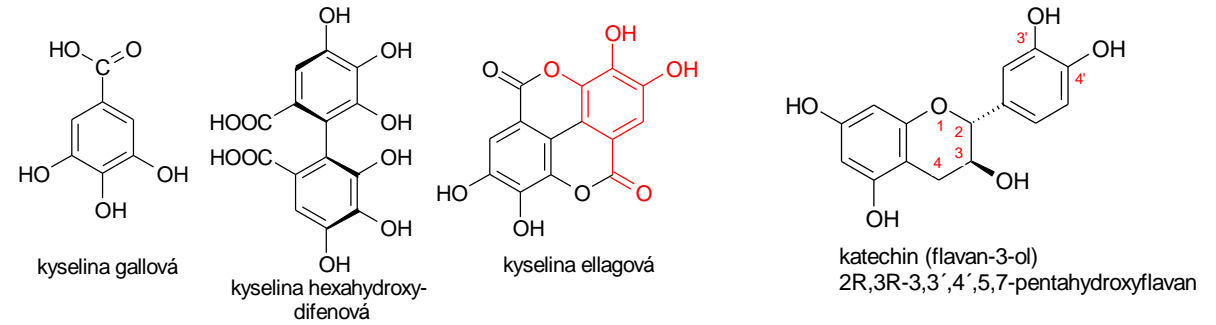
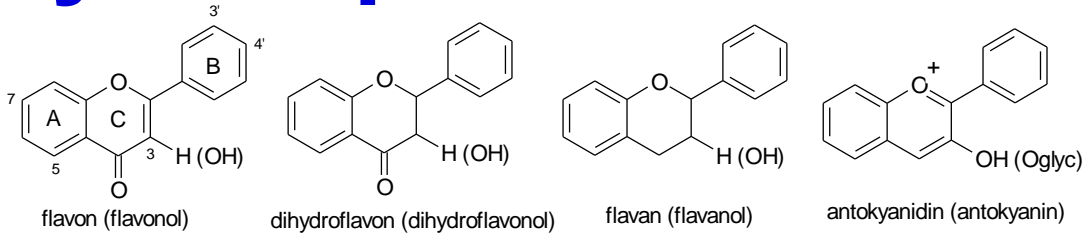
Detekce 254 a 280 nm

Nástřik 1 μl

Nástřik [μL]	Množství v nástřiku [μg]	Kapsaicin		Dihydrokapsaicin
		Plocha 254 nm	Plocha 280 nm	Plocha 280 nm
0	0	0	0	0
0,1	0,1	21,4	153,4	120
0,2	0,2			221
0,5	0,5	76,8	561,7	493
1	1	152,9	1112,8	
2	2	299,9	2164,3	1970
5	5	762,1	5421,2	4868



# Využití pro kvantifikaci



Kolorimetrické stanovení je založené na vzniku barevných komplexů se solemi hlinitými nebo zirkoničitými.

**Tvorba komplexů flavonoidů s chloridem hlinitým** se provádí nejlépe v rozpouštědle sestávajícím ze směsi kyseliny octové a pyridinu.

V tomto rozpouštědle nedochází ke vzniku sraženin, které absorbují na svém povrchu část účinných látek a tak způsobují snížení výsledků.

Doprovodné látky (např. chlorofyl) rušící stanovení se mohou odstranit vytřepáním extraktu chloridem uhličitým. Výsledky měření se vztahují na standard, kterým je často rutosid.

0,500 g drogy se ve varné baňce smíchá se 150 ml vody. Zahřeje se k varu a vaří se dalších 30 minut pod zpětným chladičem. Ochladí se pod tekoucí vodou, směs se převede kvantitativně do 250ml odměrné baňky a doplní se vodou po značku. Po usazení částic drogy se roztok zfiltruje. Prvních 50 ml filtrátu se odstraní.

Celkové polyfenoly: 5,0 ml filtrátu se zředí vodou na 25,0 ml. 2,0 ml tohoto roztoku se smíchají s 1,0 ml **zkoumadla fosfomolybdenan-wolframového**, 10,0 ml vody a 17,0 ml 20% roztoku uhličitanu sodného. Přesně po 2 minutách od přidání posledního roztoku se měří absorbance (A) při 750 nm za použití vody jako kontrolní tekutiny.

Obsah tříslovin v procentech se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{3,125 \times A}{0,316 \times m} \quad \text{m je navážka v gramech.}$$

# **Hmotnostní spektrometrie**

**Principy, zařízení, využití**

# Principy metody

- Fyzikálně-chemická metoda pro stanovení hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich přeměně na ionty.
- Možnost charakterizace struktury analyzovaných látek.
- Propojení hmotnostního spektrometru s moderními separačními technikami pro provádění kvantitativní a kvalitativní analýzy stopových sloučenin a komplexní matrice.
- Dostupnost moderních iontových zdrojů rozšířila aplikační oblasti RS na vysokomolekulární netěkavé sloučeniny (biochemický, klinický výzkum).



# Obvyklá sestava zařízení

## Základní stavební části:

- Iontový zdroj
- Hmotnostní analyzátor
- Detektor
- Řídící jednotka

## Práce ve vysokém vakuu

### Iontový zdroj

Převod analyzované sloučeniny do ionizovaného stavu

V prostoru iontového zdroje probíhá většina fragmentačních reakcí

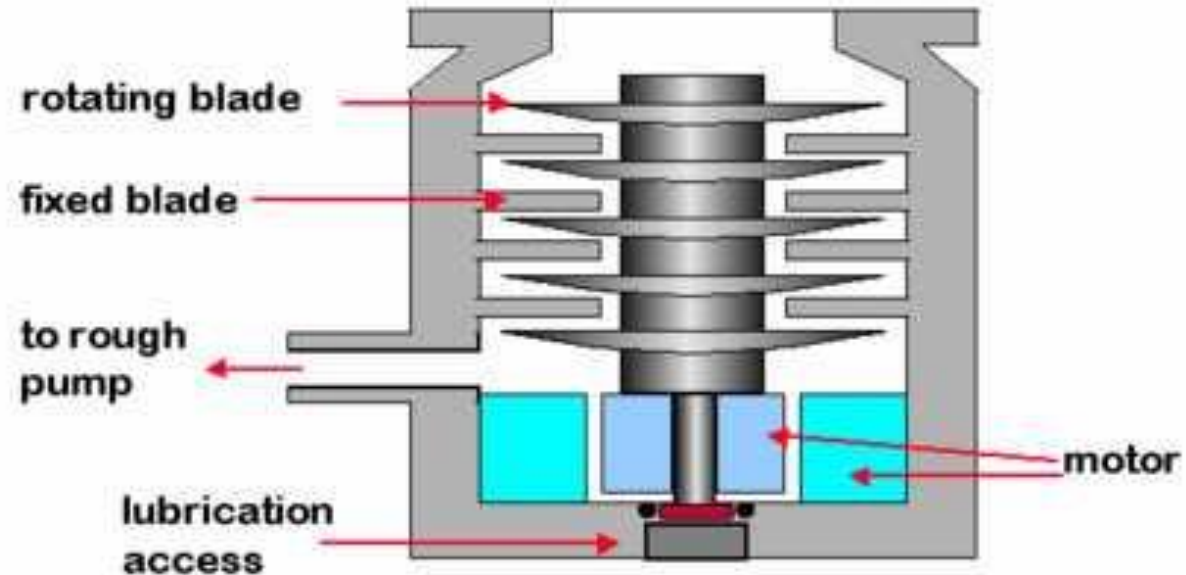
Hmotnostní analyzátor – umožňuje separaci směsi iontů s různými poměry hmotnost/náboj v prostoru nebo čase

Detektor – závisí na počtu padajících iontů

- Součástí každého hmotnostního spektrometru je výkonný, obvykle dvoustupňový systém generování vakua, umožňující udržet dostatečné vakuum pro pracovní podmínky.

## Turbomolecular pump

A turbomolecular pump relies on a series of blades or airfoils that spin at 30,000 - 90,000 RPM. This tends to deflect gas molecules down and out the outlet.



# Ionizace a iontové zdroje v MS

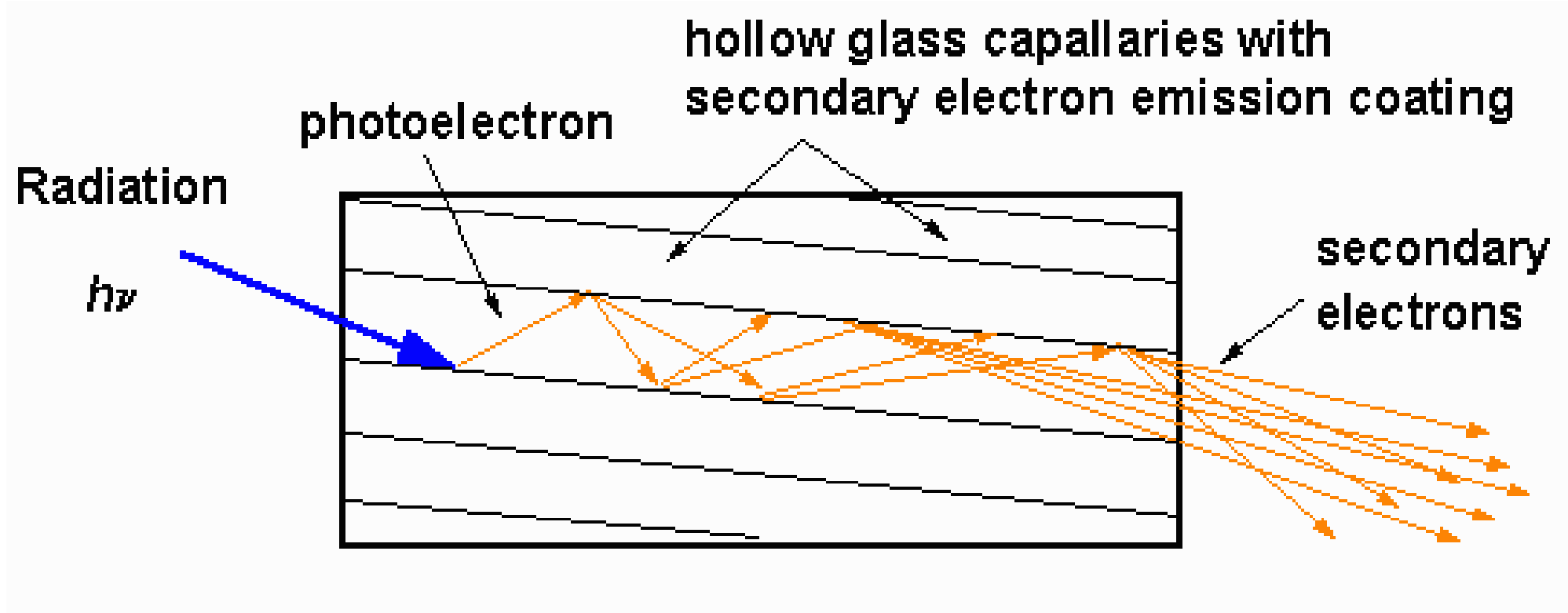
Veškeré informace poskytované hmotnostní spektrometrií se týkají pouze nabitých částic (iontů).

Energetická náročnost závisí na typu analyzované sloučeniny (7–16 eV).

Použitý charakter ionizace podstatně ovlivňuje aplikaci metody.

Vývoj nových typů iontových zdrojů rozšířil aplikace do oblasti netěkavých sloučenin s vysokou molekulovou hmotností.

Výtěžek ionizace u většiny technik jen výjimečně překračuje 0,01 %, proces ionizace omezuje citlivost a dosahovanou mez detekce použité metody.



# Hmotnostní spektrum

- Hmotnostní spektrum představuje závislost odezvy detektoru (intenzity iontového proudu) na hodnotě  $m/z$
- Hmotnostní spektra jsou většinou programově převáděna do normalizovaného tvaru (%)
- Nejintenzivnějšímu píku ve spektru přísluší hodnota 100 %
- V hmotnostním spektru obvykle pozorujeme pík odpovídající ***molekulárnímu iontu*** a píky odpovídající ***fragmentovým iontům***

# Molekulární ion

- Molekulární ion má v procesu určení struktury zkoumané látky mimořádný význam
- Molekulární ion má ve spektru nejvyšší hmotnost (s výjimkou píků izotopických)
- Molekulární ion je iontem s nepárovým elektronem
- Molekulární ion koresponduje s ostatními ionty ve spektru
- Svým relativním zastoupením musí molekulární ion odpovídat postulované struktuře
- Intenzita molekulárního iontu ve spektru má přímý vztah ke struktuře stanovované látky
- S rostoucím počtem násobných vazeb a cyklů v molekule intenzita píku molekulárního iontu roste
- Pík odpovídající molekulárnímu iontu může být ve spektru pro některé sloučeniny dominantní (strychnin), avšak pro jiné sloučeniny (n-dodekan) může být velmi nevýrazný

# Fragmentace v hmotnostní spektrometrii

- Možnost detailního poznání procesů fragmentace je limitována neznalostí konkrétních struktur vznikajících iontů
- Obsahuje-li molekulový ion přebytek vnitřní energie, rozpadne se za vzniku iontového fragmentu a elektroneutrální částice
- Pravděpodobnost rozpadu molekulového iontu roste s jeho hmotností, násobné vazby zvyšují stabilitu molekulového iontu
- Míra fragmentace iontů závisí na přebytku energie, kterou tyto ionty obsahují
- V procesu ionizace je nejpravděpodobnější odtržení elektronu s nejnižší ionizační energií, z energeticky nejvyšších vazebných molekulových orbitalů nebo orbitalů nevazebných
- Díky nízkému tlaku při EI ionizaci jsou reakce probíhající v iontovém zdroji prakticky výhradně monomolekulární
- Relativní zastoupení iontu ve spektru je dáno rozsahem fragmentace vedoucím k jeho vzniku a také jeho stabilitou
- Fragmentové ionty se při přebytku energie mohou dále rozpadat

# Významné mechanismy fragmentace organických molekul

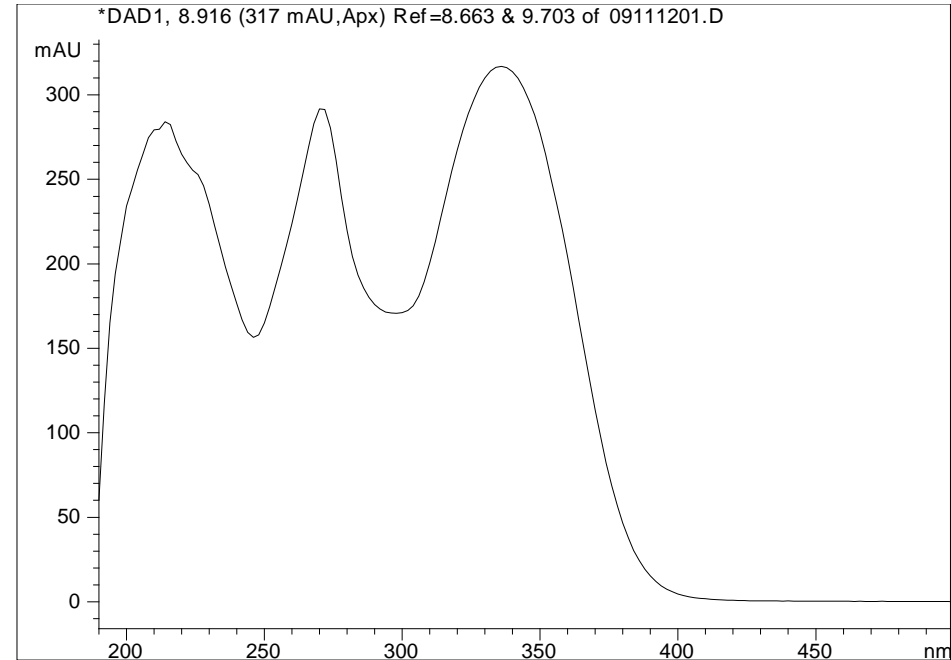
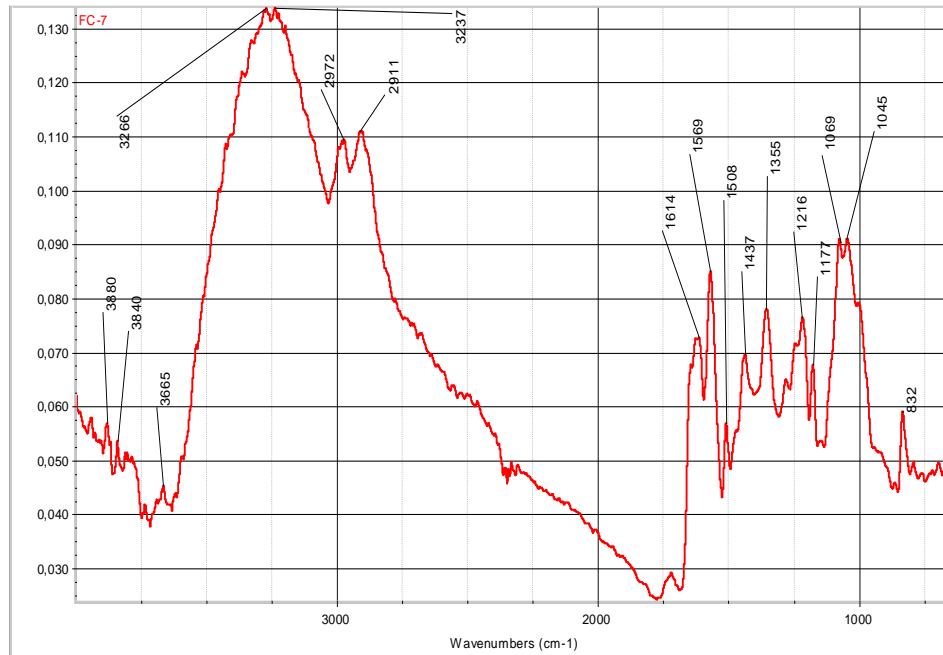
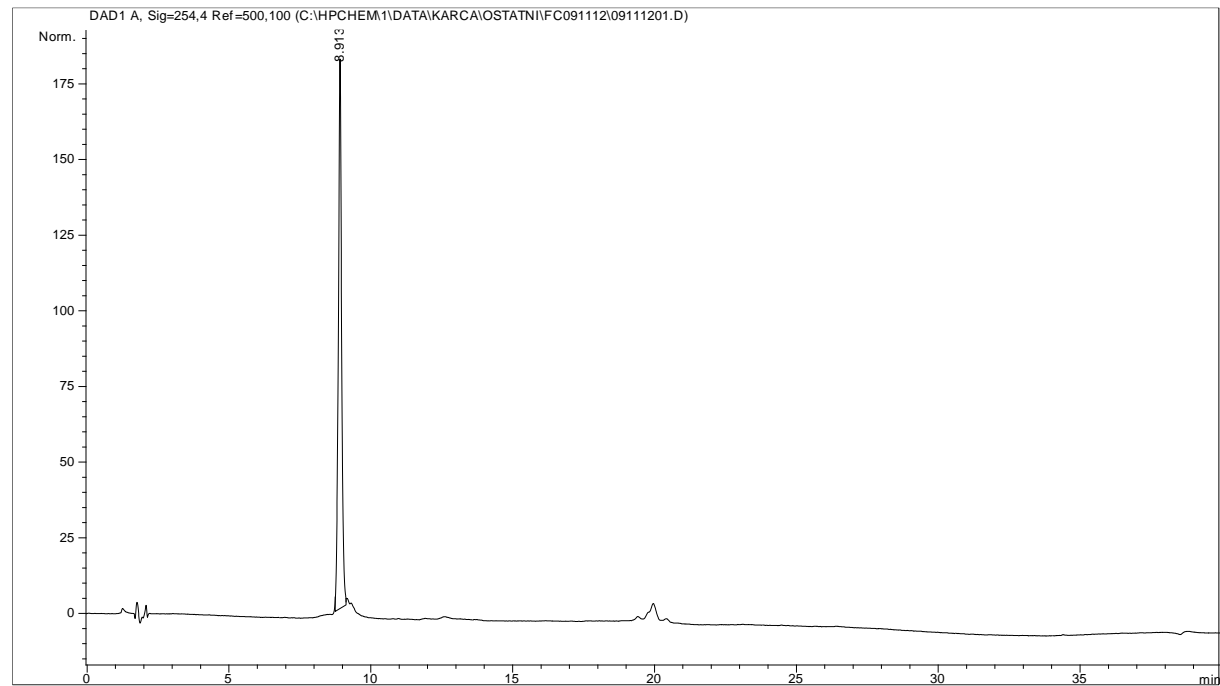
- štěpení s-vazby (iniciované radikálovým centrem)
- $\alpha$ -štěpení iniciované radikálovým centrem
- štěpení iniciované nábojovým centrem
- štěpení cyklických struktur spojené s rozrušením více vazeb
- přesmyky iniciované radikálovým centrem
- přesmyky iniciované nábojovým centrem

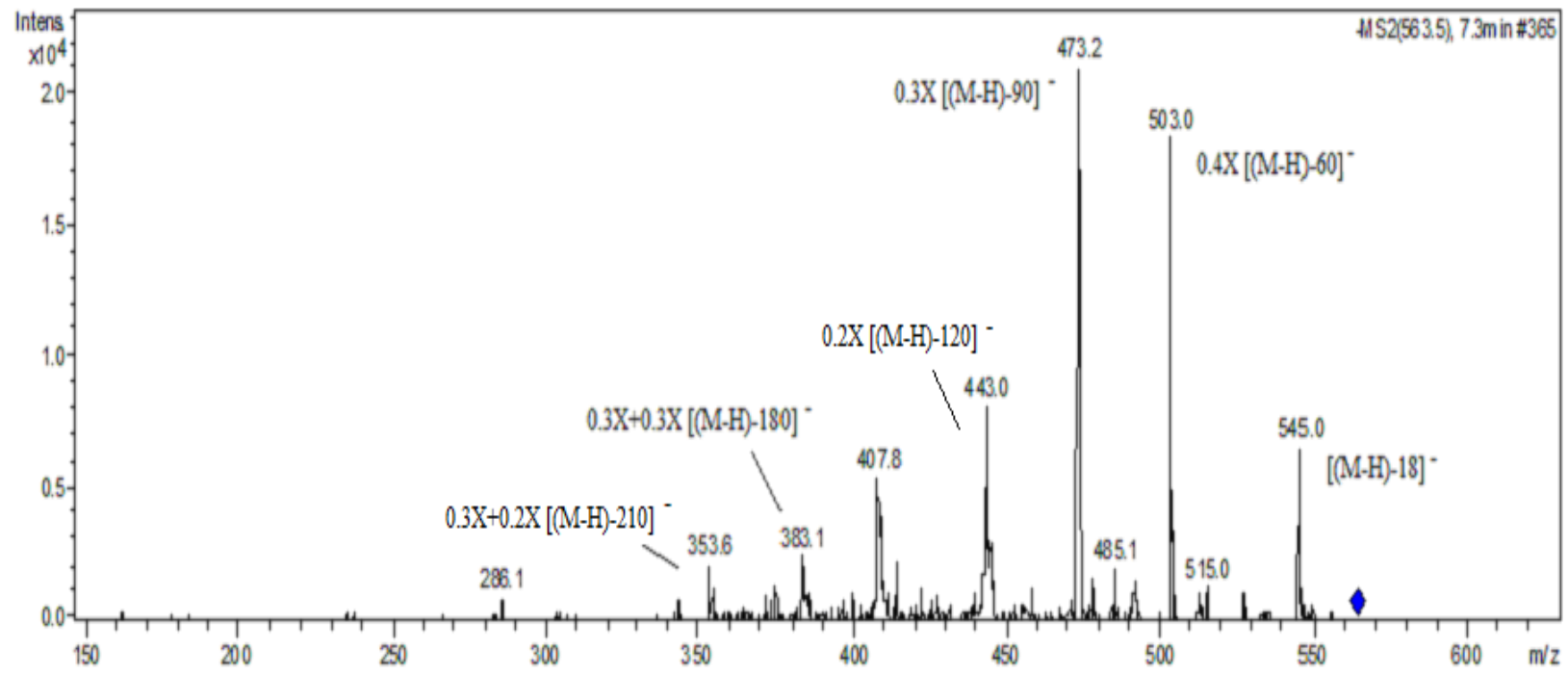
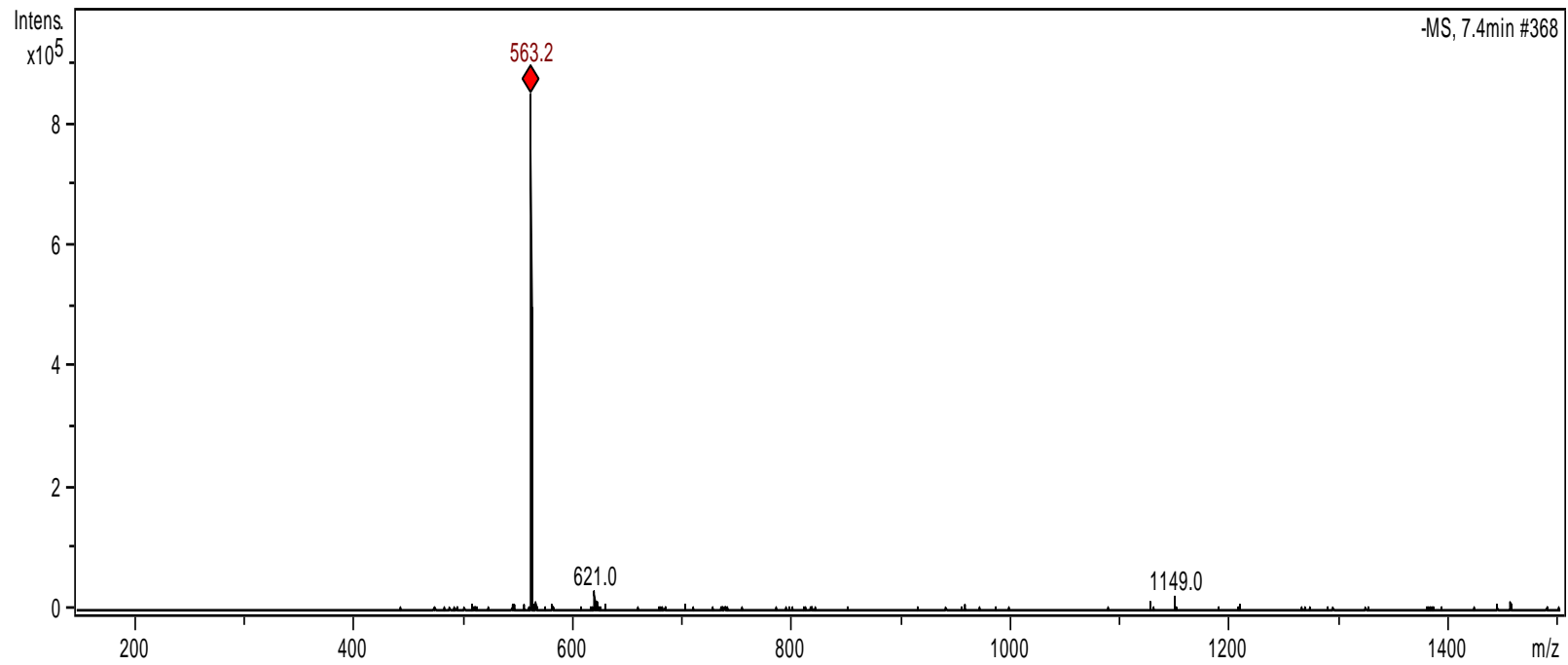


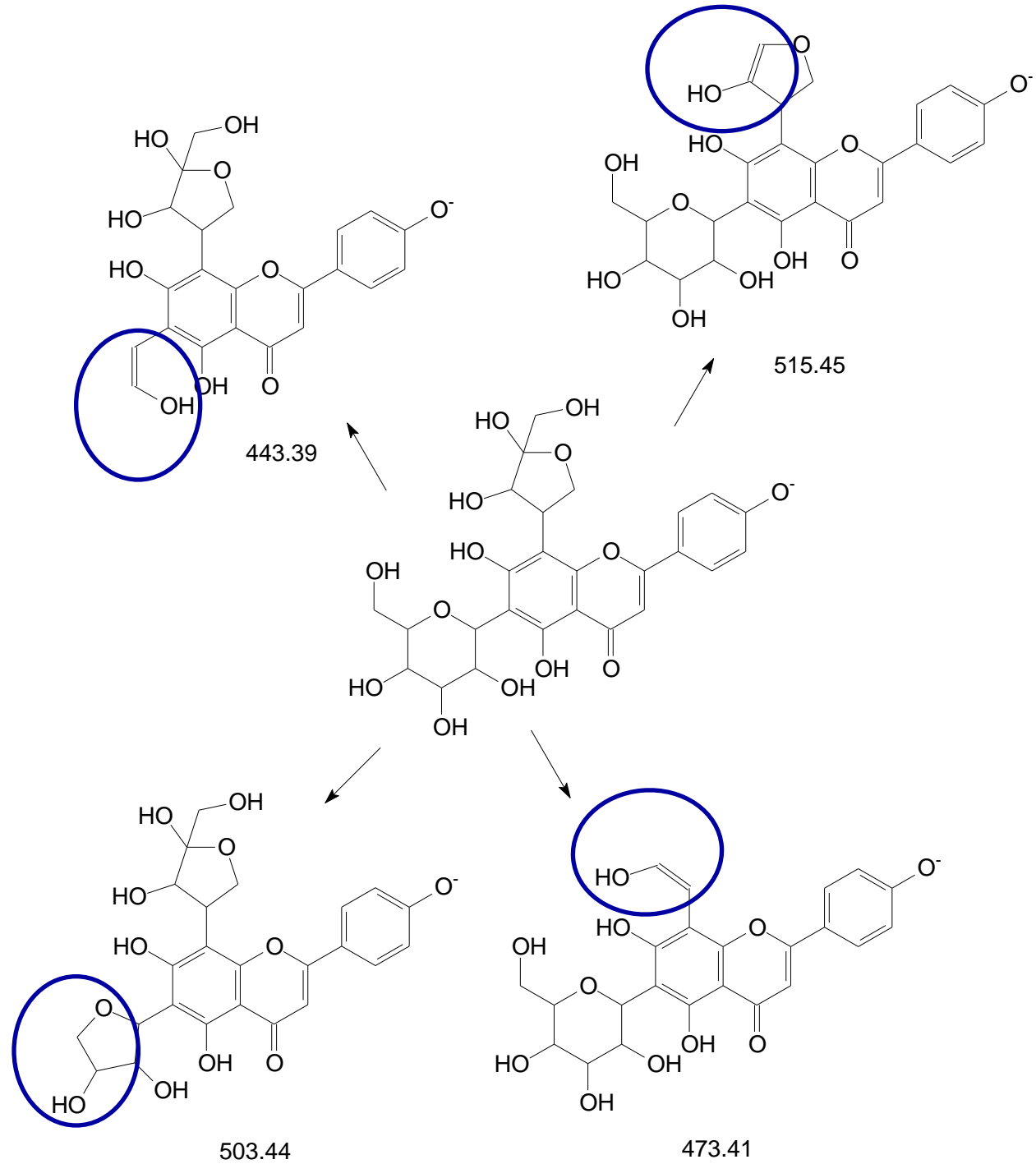
# Využití hmotnostní spektrometrie

- Strukturní analýza a identifikace chemických individuí
- Informace o funkčních skupinách obsažených v molekule analyzované látky
- Možnost určení izotopového složení
- Rychlá identifikace chlorovaných a bromovaných sloučenin na základě zastoupení jejich izotopů ( $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$ ;  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ )
- Využití MS jako detektoru pro GC a HPLC
- Stopová analýza plynných směsí anorganického i organického původu
- Určování nečistot ve velmi čistých látkách
- Možnost aplikace v kvantitativní analýze na základě lineární závislosti mezi iontovým proudem a koncentrací látky
- Analýza povrchů tuhých látek za použití hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

# Strukturní analýza

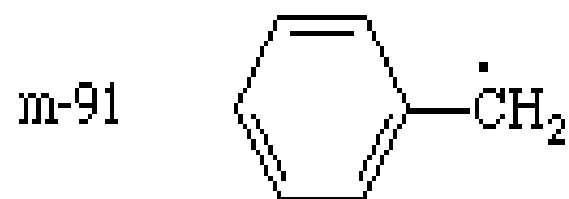




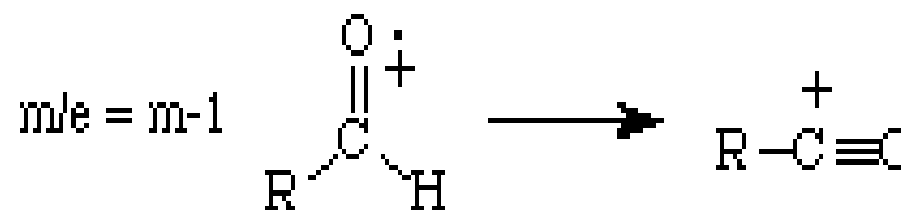
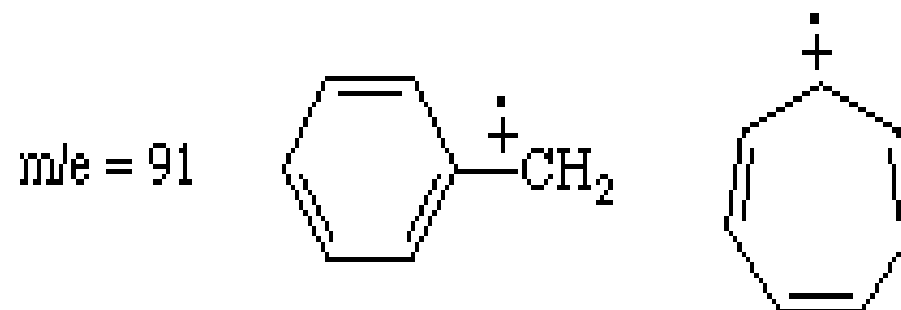


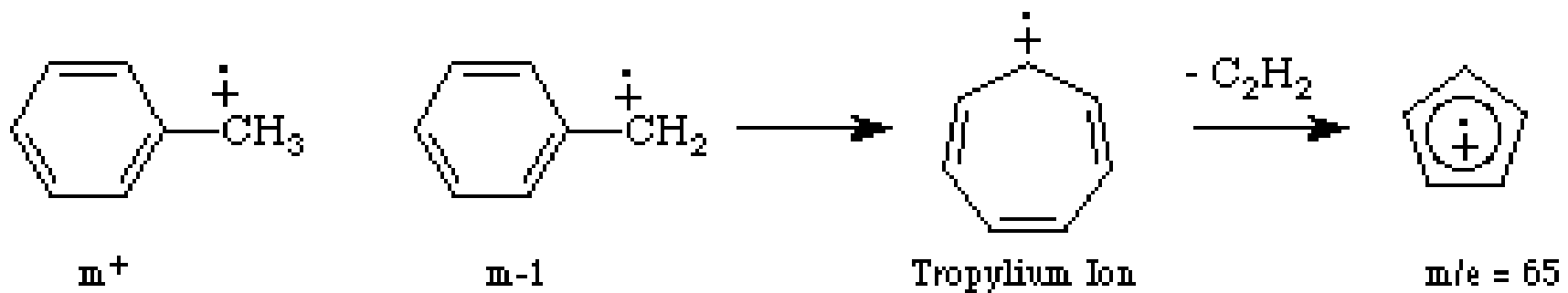
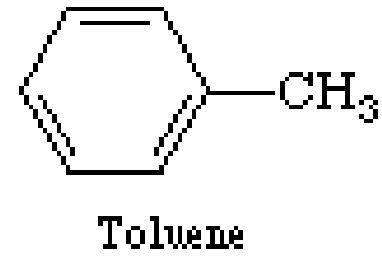
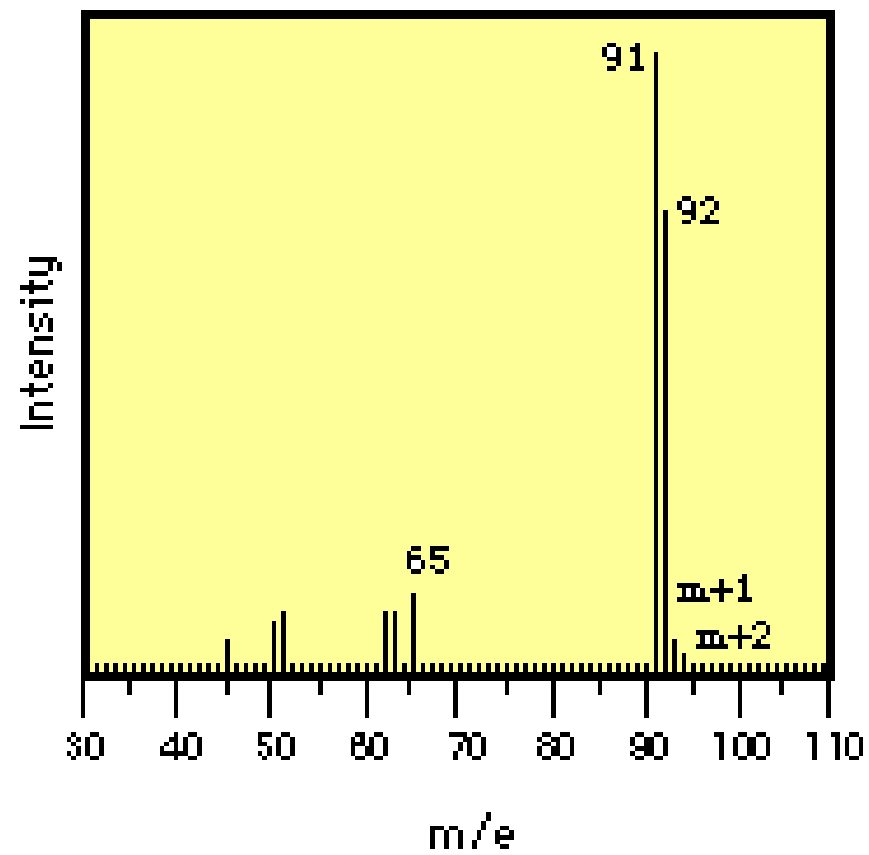
## Commonly Lost Fragments

- m-15  $\cdot\text{CH}_3$
- m-17  $\cdot\text{OH}$
- m-26  $\cdot\text{CN}$
- m-28  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$
- m-29  $\cdot\text{CH}_2\text{CH}_3$      $\cdot\text{CHO}$
- m-31  $\cdot\text{OCH}_3$
- m-35  $\cdot\text{Cl}$
- m-43  $\text{CH}_3\dot{\text{C}}=\text{O}$
- m-45  $\cdot\text{OCH}_2\text{CH}_3$

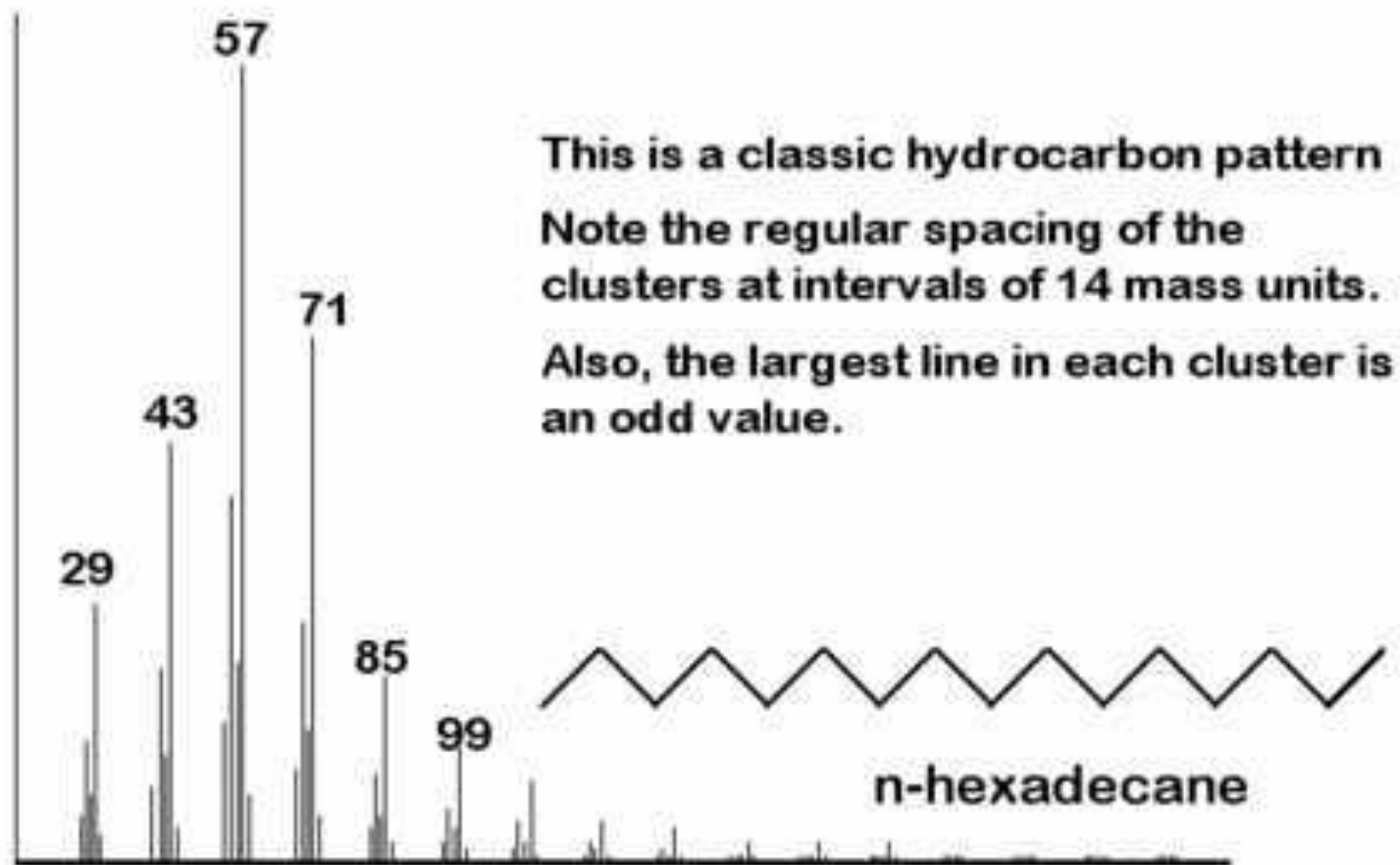


## Common Stable Ions

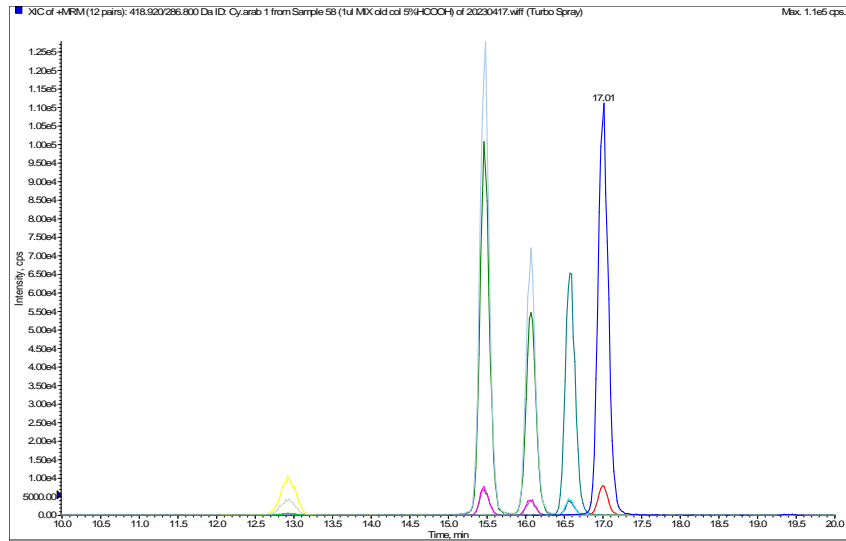




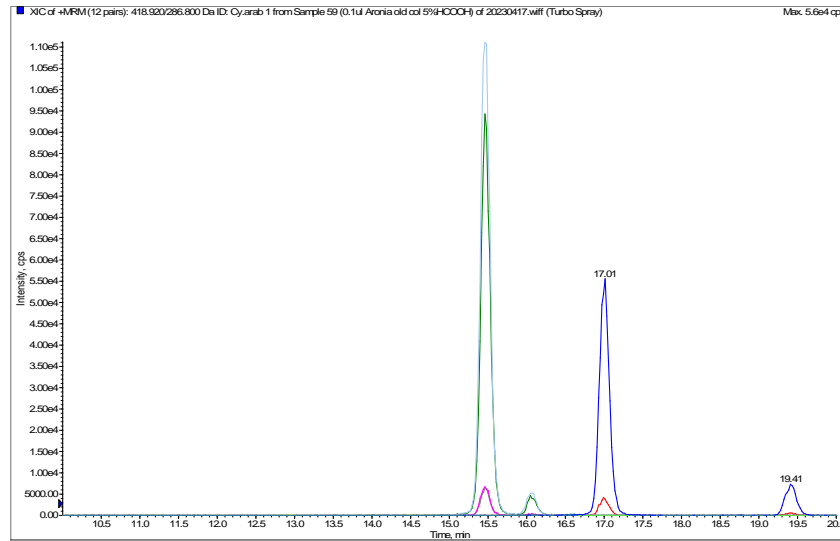
## Saturated hydrocarbons



### ZOOM 1ul MIX std HPLC-MS/MS pos. mode

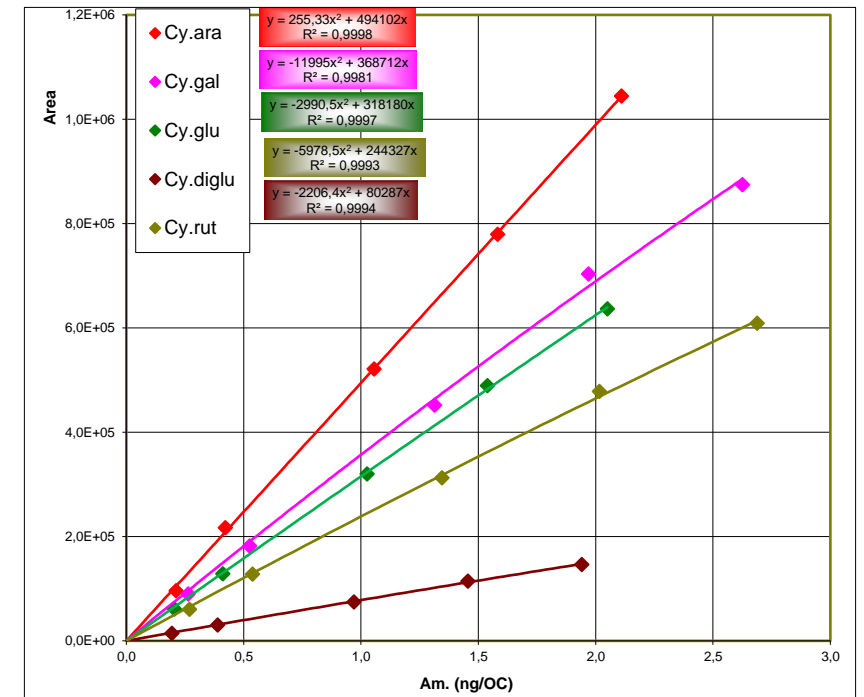
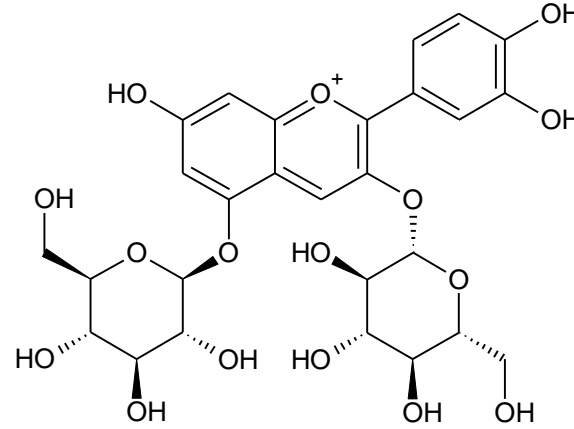


### ZOOM 0.1ul Aronia extract HPLC-MS/MS pos. mode



#### Retention order on MS

Cyanidin diglucoside	12.92 min.
Cyanidin galactoside	15.48 min.
Cyanidin glucoside	16.07 min.
Cyanidin rutinoside	16.57 min.
Cyanidin arabinoside	17.01 min.



Autor: I, User:Pawvic, CC BY-SA 3.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2385601>