

Міністерство освіти і науки України
Донбаська державна машинобудівна академія (ДДМА)

Г.Л. Юсіна

**ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ
ХІМІЧНИХ СПОЛУК**

Краматорск, 2020

УДК 547 (07)

Ю 88

Фізико-хімічні методи ідентифікації органічних сполук :
скорочений конспект лекцій для студентів спеціальності «Хімія» / Укл.:
Юсіна Г.Л. – Крама-торськ : ДДМА, 2020. – 56 с.

Укладач

Г.Л.Юсіна, доц.

Відповідальний за випуск

А.П.Авдеєнко, проф.

Скорочений конспект лекцій з дисципліни " Фізико-хімічні методи ідентифікації органічних сполук" містить теоретичні основи хроматографічних, рефрактоскопічних та спектральних методів дослідження органічних сполук, приклади, що стосуються вживання спектральних методів, і деяки аспекти кожного з них.

Зміст

1 Хроматографічні методи.....	4
2 Рефрактометричний аналіз.....	16
3 Масс-спектроскопія	25
4 Молекулярна спектроскопія.....	34
5 Електронні спектри поглинання	37
6 Додаток.....	50
7 Список літератури.....	55

1. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ

Коротка характеристика методу

Хроматографія – фізико-хімічний метод розділення речовин біоматеріалу, що базується на різниці їх коефіцієнтів розподілу між рухомою (мобільною) і нерухомою (стаціонарною) фазами хроматографічної системи. Основний принцип хроматографічного методу полягає у розділенні речовин на основі різниці їх фізичної або хімічної спорідненості до певних сполук, які є основою хроматографічної системи. Розподіл відбувається у процесі переміщення рухомої фази шляхом спонтанної або примусової дифузії вздовж нерухомої у певному напрямку та з певною швидкістю. Метод хроматографії використовується для вирішення трьох основних завдань:

1. **Ідентифікація** - якісне та кількісне визначення сполук у біоматеріалі як аналітичний метод,
2. **Виділення** - одержання відносно великих кількостей чистих речовин, як препаративний метод,
3. **Очистка** - розділення окремих компонентів суміші або позбавлення від домішок.

Використання хроматографічного методу дає цілу низку переваг. **По-перше**, речовини під час розділення, в основному, не змінюються, що є дуже важливим для подальших біохімічних досліджень. **По-друге**, цей метод цілком придатний для розділення рідких та газоподібних сполук. **По-третє**, він може бути використаний для фракціонування сумішей речовин, які близькі за біохімічним складом, властивостями та будовою. **По-четверте**, хроматографія має високу точність розділення речовин, є відносно простою у використанні та доступною для будь-якої лабораторії.

Типова хроматографічна система базується на розподілі компонентів між двома фазами, одна з них є **нерухомою** - стаціонарна з великою поверхнею, а інша переміщується відносно першої – **рухома** фаза. Як нерухома фаза використовується тверда речовина або рідина, яка наноситься на спеціальний твердий носій. Компоненти, що розділяються, разом з рухомою фазою, яка являє собою рідину або газ, проходять крізь нерухому. Розділення речовин пов'язано з сорбційно-десорбційним процесами і можливе тільки у випадку, якщо нерухома фаза, або так званий сорбент, характеризується різною **абсорбційною здатністю** щодо кожної з речовин, що піддаються розділенню. При цьому під **абсорбцією** розуміють будь-який процес, що пов'язаний з накопиченням того чи іншого компонента в нерухомій фазі або на межі розподілу фаз.

Класифікація методів хроматографії на сьогодні значно розширилася і може базуватися на декількох основних принципах. За **апаратним забезпеченням** виділяють **колоночну** та **площинну** (планарну) хроматографію, остання, у свою чергу поділяється на **паперову** та **тонкошарову**. В той же час, за **агрегатним станом рухомої фази**, хроматографія може бути **рідинною** або **газовою**. Нарешті, за **видом і механізмом розподілу речовин**, що розділяються, методи хроматографії діляться на **адсорбційну**, куди відносяться йонообмінна, гідрофобна, афінна хроматографії, та **неадсорбційну хроматографію**, до якої відноситься хроматографія, що поділяється за розміром. **Спеціальними методиками** хроматографічного розділення вважаються хроматографія оберненої фази, хроматографія високого та низького тисків, швидка хроматографія білків, двовимірна, піролітична, протиточна та хіральна хроматографії.

Загальні поняття і термінологія

Аналіт (analyte) – речовина-компонент дослідної суміші, яка піддається хроматографічному розділенню.

Аналітична хроматографія – вид хроматографії, який використовується для визначення присутності аналітів у дослідній суміші, а також їх вмісту/концентрації.

Елюат (eluate) – розчинник з аналітами, який вже пройшов через хроматографічну систему і збирається на її виході для їх детекції.

Елюент (eluent) – розчинник, за допомогою якого відбувається «вимивання» аналітів з хроматографічної системи.

Елюотропна серія (eluotropic series) - список розчинників у порядку збільшення/зменшення їх сили елюції.

Зв'язана фаза (bonded phase) – компонент нерухомої фази, який ковалентно приєднаний до поверхні хроматографічної матриці на площині або всередині колонки.

Зворотня фаза (reverse phase) – нерухома фаза, основою якої є неполярні компоненти, наприклад, насичені алкільні ланцюги вуглеводнів.

Коефіцієнт розподілу – характеристичний коефіцієнт, що є основою хроматографічного розділення і залежить від спорідненості певного аналіту до обох фаз.

Нерухома фаза (immobilized phase) – стаціонарна фаза хроматографічної системи, певним чином іммобілізована на поверхні хроматографічної матриці.

Препаративна хроматографія – використовується для очищення значних кількостей певних речовин з метою їх подальшого використання.

Пряма фаза (forward phase) – нерухома фаза, яка у своїй основі містить полярні компоненти, такі як силікагель, сефадекс, тощо.

Рухома фаза (mobile phase) – фаза, яка у процесі хроматографічного розділення рухається з певною швидкістю і у певному напрямку вздовж нерухомої. Рухома фаза може бути рідиною, як у випадку рідинної хроматографії (Liquid Chromatography – LC) або капілярної електрохроматографії (Capillary Electrochromatography - SEC), газом – у газовій хроматографії (Gas Chromatography - GC), або ж суперкритичною рідиною, як у суперкритично-рідинній хроматографії (Supercritical-fluid Chromatography - SFC). Типова рухома фаза складається з дослідного зразку з певною кількістю аналітів та розчинника, який переміщує аналіти відносно нерухомої фази хроматографічної системи.

Хроматограма – будь-яка візуальна репрезентація ходу хроматографічного розділення, як правило, у вигляді графіку, який складається з певної кількості піків. У випадку ідеального розділення кількість піків відповідає кількості аналітів, а площа – їх концентраціям (рис. 1.1).

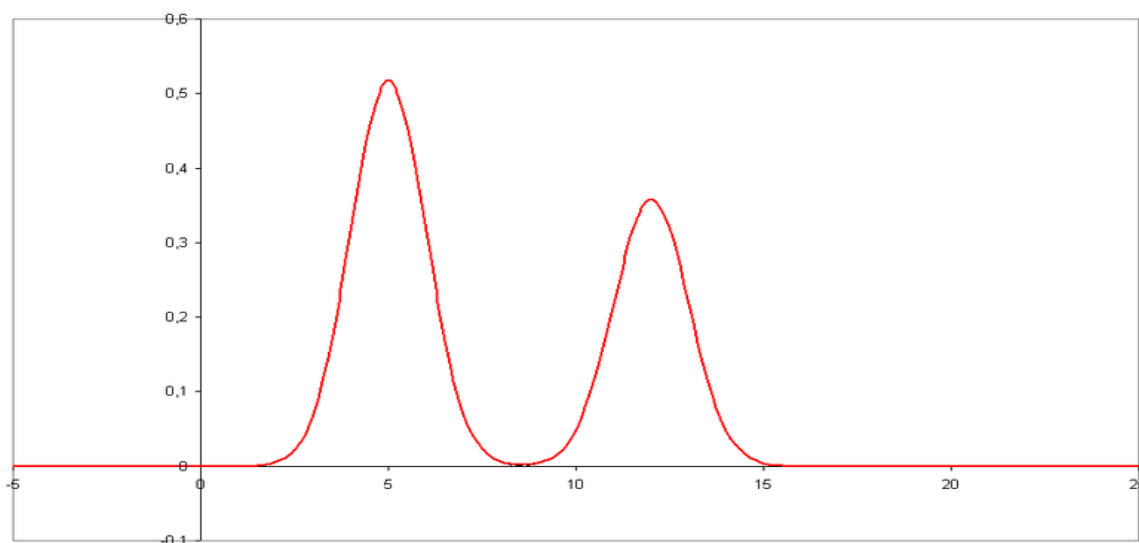


Рис. 1.1. Типова хроматограма дослідної суміші, що складається з двох аналітів. Вісь абсцис - час або об'єм утримання, вісь ординат – рівень сигналу детектора (спектрофотометричного, мас-спектрометричного, тощо). Зміни сигналу оптимальної хроматографічної системи відповідають часу виходу аналітів з неї і є прямо пропорційними їх

Хроматограф – прилад, що дозволяє проводити хроматографічне розділення, контролювати і реєструвати його хід у часі.

Хроматографічна матриця (носії) – компонент хроматографічної системи, на поверхні якого іммобілізують нерухому фазу. Приклад – сорбенти для адсорбційної хроматографії (сефароза, сефадекс, тощо).

Хроматографічний зразок – речовина або суміш речовин, отримані з біоматеріалу, які аналізуються хроматографічно. До зразку відносяться лише

речовини, які безпосередньо цікавлять дослідників, все інше сприймається як хроматографічний непотріб.

Хроматографічний розчинник – будь-яка суміш речовин визначеного складу, яка здатна розчинити компоненти зразку. Відповідає рухомій фазі у рідинній хроматографії.

Хроматографія – фізико-хімічний метод розділення речовин біоматеріалу, що базується на різниці їх коефіцієнтів розподілу між рухомою (мобільною) і нерухомою (стаціонарною) фазами хроматографічної системи. Розподіл відбувається у процесі переміщення рухомої фази шляхом спонтанної або примусової дифузії вздовж нерухомої у певному напрямку та з певною швидкістю.

Час утримання (retention time) – характеристичний час, потрібний для повного проходження певного аналіту через хроматографічну систему за певних умов.

Параметри розділення та пов'язані з ними терміни

Нульова (базова) лінія хроматограми – лінія, що відповідає нульовій концентрації аналітів у елюаті.

Шум – статистичні флуктуації нульової лінії хроматограми. Рівень шуму залежить від статистичних коливань усіх параметрів сигналу детектора.

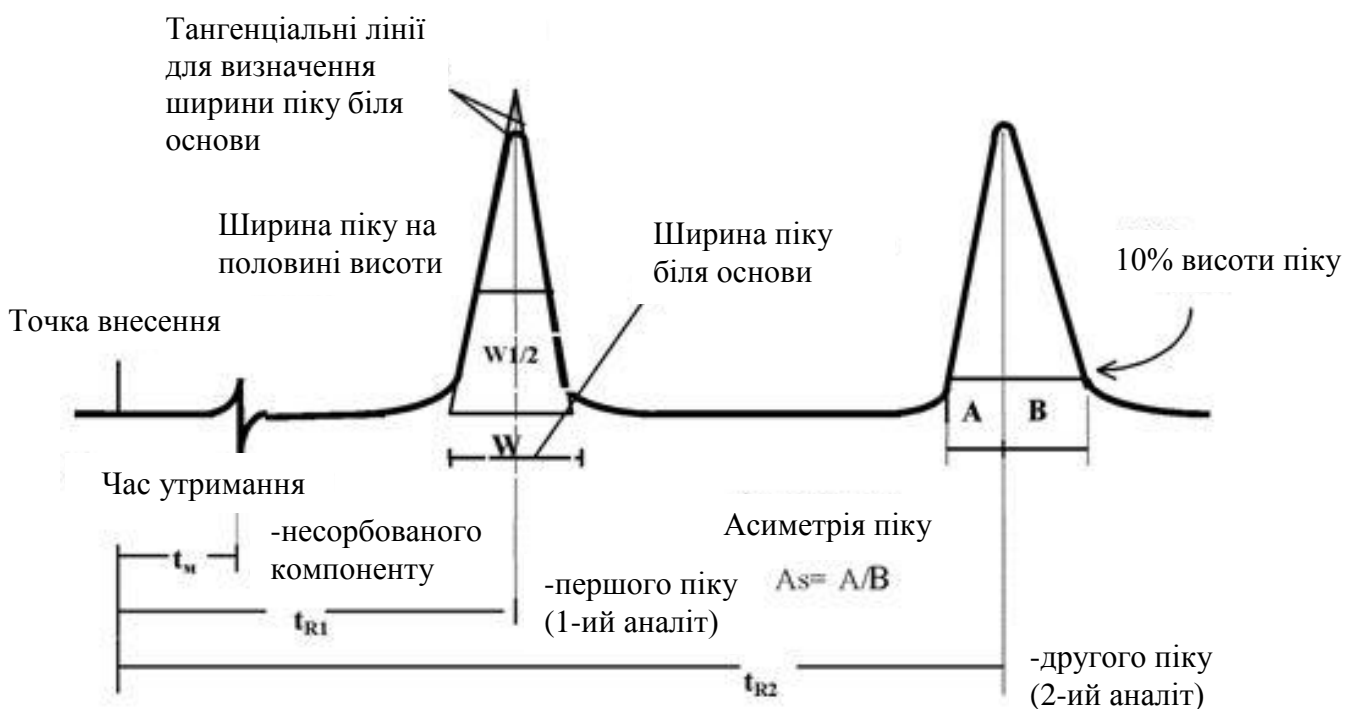


Рис. 2.2 Хроматографічні параметри та терміни (пояснення у тексті).

Дрейф нульової лінії – поступове зміщення нульової лінії на хроматограмі.

Хроматографічний пік – ділянка хроматограми, що відповідає площі, яка обмежена функцією хроматограми в момент виходу аналіту з колонки, та нульовою лінією.

Основа піку – продовження нульової лінії, що з'єднує початок і кінець хроматографічного піку.

Висота піку (h) – відстань від максимуму піку до його основи, яка виміряна вздовж осі відгуку детектора.

Ширина піку біля основи (W_b) – відрізок основи піку, що відсікається двома дотичними, які проведені в точках перегинів висхідної та низхідної гілок хроматографічного піку (.2).

Ширина піку на половині висоти (W_h) – відрізок лінії, що відсікається піком на середині його висоти, проведений паралельно основі піку (рис. 2).

Площа піку (S) – площа хроматограми між піком та його основою:

$$S = h \times W_h$$

Геометричний об'єм колонки (V_c) – увесь внутрішній простір пустої колонки.

Вільний об'єм колонки (V_0) – частина об'єму, що не зайнята сорбентом.

Об'єм утримання речовини (V_R) – об'єм рухомої фази, що витрачається на елюцію компонентів зразку. Визначається між точками внесення зразку та реєстрації максимуму сигналу відповіді детектора.

Абсолютний об'єм утримання речовини (V_N) – об'єм рухомої фази, що визначається від точки внесення зразку у хроматографічну систему до точки реєстрації максимуму хроматографічного піку, який відповідає певному аналіту.

«Мертвий» об'єм (V_M) – об'єм рухомої фази між точками внесення зразку та його першої появи у елюаті. Включає в себе вільний об'єми колонки, дозатора, в якому вноситься зразок, детектора, а також комунікацій між усіма частинами хроматографічної системи.

Приведений об'єм утримання ($V_{R'}$) – об'єм утримання аналіту без «мертвого об'єму»:

$$V_{R'} = V_R - V_M$$

Абсолютний час утримання речовини (t_R) – час перебування аналіту в хроматографі. Визначається від моменту внесення зразку у хроматографічну систему до моменту реєстрації максимуму хроматографічного піку, який відповідає даному аналіту (2.2).

«Мертвий» час утримання (t_M) – час перебування несорбованої речовини у хроматографі. Визначається від моменту внесення несорбованої речовини у

хроматографічну систему до моменту реєстрації максимуму сигналу детектора, що відповідає цій речовині.

Приведений час утримання ($t_{R'}$) – абсолютний час утримання без врахування «мертвого часу»:

$$t_{R'} = t_R - t_M$$

Ефективність хроматографічної системи – кількість ступенів встановлення рівноваги між рухомою і нерухою фазами за обраних умов, здатність до утворення вузької концентраційної зони індивідуального аналіту дослідної суміші, що піддається розділенню. У чисельному вираженні визначається значеннями числа теоретичних тарілок (N) і висотою, яка є еквівалентною теоретичній тарілці (H). Як правило, більш ефективною для розділення певних аналітів є та колонка, в якій ширина піку є вужчою за однакового часу утримання. Також, чим більшою є величина N , тим ефективнішою вважається колонка, оскільки N прямо впливає на розширення концентраційної зони дослідної речовини у процесі хроматографічного розділення зразку, а, отже, і на ширину піку після виходу аналітів з колонки.

Число теоретичних тарілок (N) – величина, яка характеризує ефективність колонки і розраховується за параметрами утримання обраного аналіту:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,545 \times \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

Висота, еквівалентна теоретичній тарілці (H) – величина, яка характеризує ефективність колонки і розраховується як відношення довжини колонки (L) до числа теоретичних тарілок (N):

$$H = \frac{L}{N}$$

Приведене число теоретичних тарілок (N') – відношення розрахованого числа теоретичних тарілок на реальній колонці певної довжини (L , см) до умовної колонки довжиною 1 метр:

$$N' = 100 \times \frac{N}{L}$$

Приведена висота, еквівалентна теоретичній тарілці (H') – відношення розрахованої висоти теоретичної тарілки (H) до середнього ефективного діаметру частинок сорбенту (d , мкм), також є характеристикою ефективності колонки.

Значення, що дорівнює 3-3,5d прийнято вважати задовільним, а 2d – дуже хорошим.

Фактор утримання/коефіцієнт ємності (k') – безрозмірна величина, що характеризує процес утримання речовини і дорівнює відношенню абсолютного об'єму утримання до вільного об'єму колонки:

$$k' = \frac{V_N}{V_0}$$

або відношенню приведенного часу утримання до «мертвого» часу:

$$k' = \frac{t_R}{t_M}$$

Фактор селективності/відносного утримання ($\alpha_{R/cm}$) та фактор розділення (α) – параметри, що є мірою вибірковості хроматографічної системи, здатності до формування специфічних взаємодій рухомої та нерухомої фаз з молекулами аналіту з певними структурними ознаками, що призводить до різної швидкості переміщення концентраційних зон індивідуальних компонентів суміші. Кількісно селективність виражається трьома способами:

- 1) Як безрозмірна величина, що дорівнює відношенню приведених об'ємів або часу утримання речовини-стандарту та аналіту, що піддаються хроматографічному розділенню у ідентичних умовах:

$$\alpha_{R/cm} = \frac{k_R}{k_{cm}} = \frac{t_{R'}}{t_{cm'}} = \frac{V_{R'}}{V_{cm'}}$$

- 2) Як величина, що пропорційна відношенню приведенного часу утримання двох піків:

$$\alpha \sim \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

- 3) Як безрозмірна величина, що характеризує роздільну здатність колонки по відношенню до аналітів А та Б. Чисельно дорівнює відношенню факторів утримання або приведених об'ємів/часу утримання цих аналітів:

$$\alpha_{A/B} = \frac{k_{A'}}{k_{B'}} = \frac{t_{A'}}{t_{B'}} = \frac{V_{A'}}{V_{B'}}$$

На селективність впливають вид сорбенту, геометрія колонки, умови розділення, в тому числі, й термодинамічні – температура, тиск у колонці. Все це здатне змінити коефіцієнти розподілу речовин між рухомою та нерухомою фазами.

Коефіцієнт асиметрії (A_s) – відношення двох відрізків, що утворені на горизонтальній лінії, проведеній на 1/10 висоти піку від його основи, під час перетинання цією лінією з вертикаллю, опущеною з вершини піку (рис. 2.2):

$$A_s = \frac{A}{B}$$

Роздільна здатність піків (R_s) – параметр, що характеризує ступінь розділення піків і визначається як відношення відстані між максимумами двох сусідніх піків до напівсуми їх ширини у основи (в одних і тих же одиницях виміру):

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})}$$

Роздільна здатність, як правило, збільшується по мірі зростання селективності (оскільки значення чисельника зростає), а також внаслідок росту ефективності (у цьому випадку значення знаменнику падає через зменшення ширини піків).

Екстраколоночне розширення піку – розмивання хроматографічної зони, що відбувається у інжекторі, з'єднувальних капілярах, комірці детектора, тощо.

Хроматографія, що поділяє за розміром

Хроматографія, що поділяє за розміром (size-exclusion chromatography - SEC) - направлена на розподіл речовин згідно розмірів їх молекул, або, якщо точніше, згідно різниці гідродинамічних діаметрів та/або об'ємів останніх. У даному випадку сорбент являє собою пористу полімерну гідрофільну речовину. Таким чином, у ході розділення, менші молекули дослідної суміші можуть входити у пори, і, таким чином, виключаються з рухомої фази. Середній час перебування молекул у порах сорбенту залежить від розмірів перших. Однак, ті з молекул дослідної суміші, які є більшими за розміри пор, майже не затримуються на сорбенті і вимиваються із системи у перших фракціях. Оскільки даний метод хроматографії не володіє високою роздільною здатністю, він часто використовується на фінальній стадії очистки речовин, як правило, білків. Також він є придатним для визначення третинної та четвертинної структур очищених білкових молекул, оскільки може проходити в умовах збереження нативності останніх.

Сорбентами для даного типу хроматографії, є, як правило, або пористі натуральні полімери - **агароза** чи **декстран**, або синтетичні високомолекулярні сполуки - **поліакриламід**, **сефадекс**, **сефакрил**, **сефароза**, тощо. Завдяки полімерній будові ці сполуки формують жорстке молекулярне сито, що складається з перехрещених поздовжніх та поперечних ланцюгів (агароза, сефакрил, поліакриламід), або ж гранул з мікроскопічними виїмками (сефадекс). У якості сорбенту можна використати і неорганічну пористу речовину, наприклад, **оксид алюмінію** чи **кремнію**. В даному випадку для запобігання денатурації білків оксид кремнію вкритий гідрофільним шаром. Взагалі, у випадку молекулярно-ситової хроматографії сорбент не повинен хімічно впливати на молекули, що піддаються розділенню. Тому вирішальним фактором розподілу є розмір та густина пор. Однак поверхневі взаємодії не виключені, і, як правило, визначають відмінність між типами сорбентів.

Йонообмінна хроматографія

В основі **йонообмінної хроматографії (ion-exchange chromatography - ІЕС)** лежить нетривала електростатична взаємодія між зарядженими групами дослідних речовин у рухомій фазі та протийонами, експонованими на поверхні сорбенту у якості нерухомої фази (**катіоніту** або **аніоніту**). За умови введення у таку хроматографічну систему буферного розчину достатньо високої йонної сили відбувається конкуренція йонів буфера з йонами дослідних сполук за місця зв'язування з функціональними групами йонообмінного сорбенту, таким чином, розділення у цьому випадку можливе лише для заряджених речовин і залежить від сили їх йонних взаємодій з розміщеними на поверхні сорбенту групами катіоно- або аніонообмінників. Сорбентом може бути сіткоподібний полімер, до якого за допомогою спейсерних молекул і «пришиваються» відповідні заряджені катіонні (в **аніонітах**), або аніонні (у **катіонітах**) хімічні групи. **Елюція** у даному випадку проводиться шляхом **збільшення йонної сили буферного розчину**, молекули якого витісняють дослідні речовини шляхом конкурентного зв'язування із зарядженими ділянками, «пришитими» до сорбенту-носія. Зміна йонної сили може бути лінійною –градієнтна елюція, або ступінчастою - ступінчата елюція. За умов ізокритичної елюції йонна сила хроматографічної систему підтримується на постійному рівні. Різні значення рН буферних розчинів забезпечує отримання фракцій на основі сили заряду груп у складі дослідних речовин.

В йонообмінній хроматографії використовують два принципово різних види сорбентів. Частіше застосовується **аніонообмінні (аніоніти)**, які мають **позитивно заряджені групи** (наприклад, **амінні**), «пришиті» до хроматографічної матриці. Цей тип хроматографічного сорбенту

використовується, наприклад, для розділення сумішей полінуклеотидів (завдяки негативно зарядженим фосфатним групам останніх), а також білків і невеликих пептидів за значення рН, що перевищує ізоелектричну точку, коли дані речовини є негативно зарядженими. За залежністю від рН у певному діапазоні значень та йонною силою груп аніоніти поділяються на «слабкі», наприклад, **діетиламіноетилсефароза (ДЕАЕ-сефароза)**, та «сильні», наприклад, сорбенти з **четвертинними аміноетильними групами (ЧАЕ-сефароза)**. Функціональні групи **катионообмінників (катионітів)** заряджені негативно, тому притягують позитивно заряджені радикали амінокислот, пептидів, білків та інших речовин за рН буферного розчину нижче ізоелектричної точки дослідних речовин. В катионітах зарядженими групами є, наприклад, **карбоксиметильна (КМ-сефароза)** або **сульфопропільна (СП-сефароза)**, причому перша з них належить «слабкому», а остання - сильному катионообміннику. Для йонного обміну з участю великих макромолекул заряджена група зазвичай «пришивається» до сорбенту (матриці) через спейсер.

Афінна хроматографія

Афінна хроматографія (affinity chromatography - АС) у своїй основі має найвищий ступінь специфічності та спорідненості взаємодії дослідних речовин з нерухомою фазою. Така спорідненість досягається не тільки наявністю поверхневих властивостей хроматографічного сорбенту, а також високою специфічністю та чітко визначеною структурною відповідністю приєднання лігандів, наприклад, фермент-субстрат, антитіло-антиген, рецептор-ліганд, тощо. Таким чином, не існує універсальних афінних середовищ, кожне з них розроблене для певної речовини чи класу речовин. Елюція у даному випадку може проводитись або шляхом конкуренції з молекулами дослідної речовини, або через варіабельність складу рухомої фази, наприклад, використання буферних розчинів з різними значеннями рН з метою змін властивостей дослідних молекул та/або високоспецифічних лігандів на матриці.

Афінні **сорбенти** складаються з пористої хроматографічної матриці, до якої певним чином приєднуються високоспецифічні ліганди. Розмір пор матриці повинен бути достатньо великим, щоб забезпечити місце приєднання для високомолекулярних лігандів та полегшити доступ до них. За специфічністю взаємодії функціональні групи сорбенту можна розділити на дві групи - **групоспецифічні** і **моноспецифічні**. До **групоспецифічних** відносяться, наприклад, **білки А та G** для імуноглобулінів, **лектини** для глікопротеїнів, **барвники** для НАД- та НАДФ-залежних ферментів, **полінуклеотиди** з комплементарними послідовностями для нуклеїнових кислот, тощо. Сюди також відносяться **комплексоутворюючі** та **хелатуючі групи**, наприклад,

імінооцтова кислота, що використовуються для специфічної сорбції йонів металів. Самі **йони металів** також можуть використовуватись для сорбції певних речовин, наприклад, **амінокислот (гістидину, цистеїну)** у методі афінної хроматографії з імобілізованими металами. Такий метод зручно застосовувати, наприклад, для очистки рекомбінантних білків, мічених полігістидиновим «хвостом». **Моноспецифічні** ліганди є найбільш селективною групою і зв'язуються з дуже обмеженою кількістю дослідних речовин у рухомій фазі. Прикладами є амінокислота **лізин**, яка зв'язує плазміноген, а також вітамін **біотин** для специфічного приєднання авідину.

Високоспецифічні зв'язки, як правило, є доволі міцними, тому потребують жорстких умов елюції розчиненої у рухомій фазі речовини. Класичним прикладом лігандів такої високої специфічності зв'язування є **антитіла** або **антигени**, тому вони набули досить великої популярності у методі афінної хроматографії. Тип афінного сорбенту з імобілізованими на ньому антитілами або антигенами отримав назву **імуноадсорбенту**. На сьогоднішній день виконуються спроби максимально зменшити ліганди **імуноадсорбентів** і вводити лише активний фрагмент молекули для підвищення щільності розміщення на матриці, а, отже, і роздільної здатності методу.

Хроматографія гідрофобних взаємодій

У основі **хроматографії гідрофобних взаємодій (hydrophobic chromatography - HC)** лежить розділення молекул з експонованими **гідрофобними ділянками** на поверхні за допомогою взаємодії з **неполярним лігандом** у складі нерухомої фази. Така взаємодія опосередковується полярним розчинником і підсилюється високою іонною силою рухомої фази. **Елюція** найчастіше проводиться шляхом **зниження йонної сили**, а отже, і **полярності рухомої фази** для збільшення **розчинності** дослідних молекул в ній. Основний принцип розділення подібний до хроматографії оберненої фази, однак умови є м'якшими і забезпечують збереження четвертинної структури і активності білків, хоча сильні гідрофобні взаємодії, в принципі, можуть викликати зміни конформації.

Сорбенти для хроматографії гідрофобних взаємодій – це **сорбенти гель-фільтрації** з експонованими на поверхні **гідрофобними групами**, наприклад, **аліфатичних насичених вуглеводнів** або **циклічних ароматичних сполук**. Дані групи розміщуються в порядку зростання сили взаємодій у порядку **бутил < октил < феніл**. Сила зростає лінійно зі збільшенням щільності розміщення груп, а ступінь їх заміщення є на один-два порядки меншою, ніж у випадку хроматографії оберненої фази. Концентрації функціональних груп, як правило, знаходяться в інтервалі від 10 до 50 мкмоль на 1 мл хроматографічного

сорбенту, причому забезпечується білок-зв'язуюча ємність хроматографічної системи до 60 мг/мл.

Хроматографія оберненої фази

Під час проведення **хроматографії оберненої фази (reverse phase chromatography - RPC)** гідрофобні речовини, що розчинені в полярному розчиннику, вибірково взаємодіють з нерухомою фазою. Рідка фаза складається із водного буферу, який містить органічний модифікатор, розчинений у воді, і цей модифікатор формує рідку межу розподілу між двома фазами, причому **рухома є полярною, а нерухома – гідрофобною**. Хроматографія на оберненій фазі використовується головним чином для розділення пептидів, оскільки високе значення коефіцієнту поверхневого тяжіння нерухомої фази у цьому випадку обумовлює значну взаємодію з розчиненою речовиною. А така взаємодія, як правило, порушує третинну структуру складних білків, що призводить до денатурації, і, отже, втрати активності. Тому використання хроматографії на оберненій фазі для препаративної очистки білка зазвичай обмежується стабільними розчиненими речовинами або речовинами, які денатурують обернено. Необхідність використання органічних модифікаторів у буферному розчині іноді до концентрації 60-70% і навіть вище обмежує застосування методу через значну вартість розчинника.

Сорбенти для даного виду хроматографії складаються з **базової матриці** до якої «пришиваються» **органічні ліганди**, що, як правило, являють собою алкіловані ланцюги вуглеводнів. У деяких випадках базова матриця є достатньо неполярною для того, щоб забезпечити ліпофільне середовище, тому спеціальне прикріплення лігандів до неї не потрібне. **Базові матриці** включають **оксид кремнію** або **цирконію**, а також **полістирол** чи **дивінілбензол** або інші типи органічних полімерів. Обраний тип базової матриці не повинен впливати на процес розділення. **Оксид кремнію** найбільш ефективно використовується в ролі базової матриці для аналітичної хроматографії, оскільки його невелика стійкість за лужних значень рН є недостатньою, щоб застосовувати цей метод для очистки речовин у промислових масштабах.

Ліпофільне середовище (покриття) нерухомої частини хроматографічної системи підбирається таким чином, щоб притягувати молекули органічного модифікатора для утворення рідкої адсорбційної фази. У якості **покриття матриці оксиду кремнію** використовують різні групи, найчастіше - **бутилові, октилові і октадецилові**, що позначаються як **C4, C8 і C18**.

2. РЕФРАКТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД

Рефрактометрія є одним з найпростіших і доступних оптичних методів аналізу.

Рефракцією (лат. *refractio* – заломлення) називають явище заломлення світлового променя на межі поділу двох різних за своєю природою оптичних середовищ. Кількісною характеристикою заломлення (рефракції) світла є *показник заломлення*.

Рефрактометрія – це оптичний метод аналізу, що ґрунтується на вимірюванні показника заломлення, який є сталою величиною для кожної речовини, її індивідуальною характеристикою.

Закони відбиття і заломлення світла. Показник заломлення

У різних оптично прозорих середовищах (вакуум, повітря, розчини, скло) світло рухається (поширюється) завжди прямолінійно, але з різною швидкістю, яка залежить від густини середовища (максимальна швидкість світла у вакуумі дорівнює $3 \cdot 10^{10}$ см/с).

При падінні променя світла АО на межу поділу двох різних прозорих середовищ під кутом α , частина світла відбивається від поверхні розділу фаз (промінь ОВ) під кутом γ , а частина світла заломлюється (промінь ОС) під кутом β (рис. 2.1).

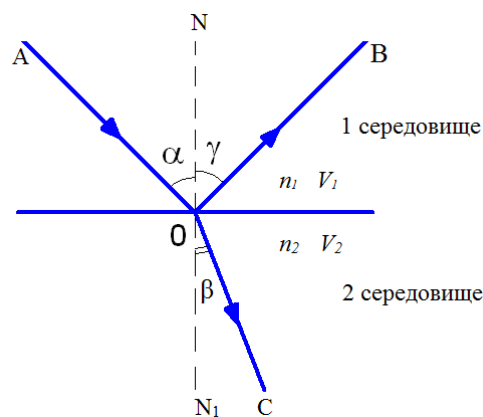


Рисунок 2.1 – Відбиття і заломлення світла на межі поділу двох середовищ

Кут, утворений падаючим променем АО із перпендикуляром (нормаллю NN_1) до площини поділу середовищ, називається *кутом падіння* променя α .

Кут, утворений відбитим променем ОВ із перпендикуляром (нормаллю NN_1) до площини поділу середовищ, називається *кутом відбиття* променя γ .

Кут, утворений заломленим променем ОС із перпендикуляром (нормаллю NN_1) до площини поділу середовищ, називається *кутом заломлення* променя β .

Закон відбиття світла складається з двох частин і формулюється наступним чином:

- падаючий промінь АО, нормаль NN_1 і відбитий промінь ОВ лежать в одній площині;
- кут падіння α дорівнює куту відбиття γ .

Відбиття світла буває дзеркальним і дифузним або розсіяним. Дзеркальне відбиття характерне для гладких поверхонь, а дифузне (розсіяне) – для шорстких поверхонь.

Закони заломлення світла Снелліуса

Процес заломлення світла підпорядковується двом законам заломлення світла, які часто називають законами Снелліуса:

- падаючий на межу розділу двох оптично неоднорідних середовищ промінь AO , заломлений в друге середовище промінь OC і нормаль NN_1 , лежать в одній площині;
- відношення синуса кута падіння α до синуса кута заломлення β променя є величиною сталою для двох даних середовищ. Ця стала називається **відносним показником заломлення** другого середовища відносно першого і позначається латинською буквою n_{21} :

$$\frac{\sin\alpha}{\sin\beta} = n_{21}. \quad (2.1)$$

Вочевидь, що заломлення променя світла зумовлене зміною швидкості його розповсюдження при переході з одного середовища в інше.

Фізичний сенс відносного показника: він дорівнює відношенню швидкості поширення світла в першому середовищі V_1 до швидкості поширення світла в другому середовищі V_2 :

$$n_{21} = \frac{V_1}{V_2}. \quad (2.2)$$

Іншими словами, n_{21} показує, у скільки разів швидкість світла в першому середовищі більша (або менша) від швидкості світла в другому середовищі.

Якщо першим середовищем є вакуум, то показник заломлення любого середовища відносно вакууму має назву **абсолютного показника заломлення** $n_{\text{абс.}}$:

$$n_{\text{абс.}} = \frac{\sin\alpha}{\sin\beta} = \frac{c}{V_2}, \quad (2.3)$$

де c – швидкість світла у вакуумі;

V_2 – швидкість світла в певному середовищі.

Отже, абсолютний показник заломлення $n_{\text{абс.}}$ показує у скільки разів швидкість світла у вакуумі більша, ніж у даному середовищі.

Взаємозв'язок відносного показника заломлення n_{21} з абсолютними показниками заломлення двох середовищ n_1 і n_2

Розглянемо два різні середовища:

1 середовище – абсолютний показник заломлення n_1 ; швидкість поширення світла V_1 ;

2 середовище – абсолютний показник заломлення n_2 ; швидкість поширення світла V_2 .

З рівняння (4.3) випливає, що оскільки

$$V_1 = \frac{c}{n_1}, \text{ а } V_2 = \frac{c}{n_2}, \quad (2.4)$$

то підставивши (4.4) в (4.2) отримуємо:

$$n_{21} = \frac{V_1}{V_2} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (2.5)$$

Таким чином, закон заломлення Снелліуса в остаточному вигляді має вигляд:

$$n_{21} = \frac{V_1}{V_2} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin\alpha}{\sin\beta}, \quad (2.6)$$

або
$$n_1 \sin\alpha = n_2 \sin\beta \quad (2.7)$$

Оскільки швидкість світла в будь-якому середовищі завжди менше швидкості світла у вакуумі, по-цьому абсолютний показник заломлення реальних середовищ є числом більшим за одиницю. Для повітря, наприклад,

$$n_{\text{пов.}} = \frac{c}{V_{\text{пов.}}} = 1,00027.$$

Вимірювання абсолютного показника заломлення відносно вакууму складна технічна задача. Тому, оскільки показник заломлення повітря не надто відрізняється від одиниці, то на практиці вимірювання показників заломлення рідких і твердих речовин здійснюють відносно повітря. Показник заломлення, який вимірюють відносно повітря, називають просто показником заломлення і позначають літерою n .

Для того, щоб одержати значення абсолютного показника заломлення середовища відносно вакууму, значення показника заломлення середовища відносно повітря потрібно помножити на абсолютний показник заломлення повітря.

Середовище з більшим показником заломлення називається *оптично більш щільним* середовищем, з меншим показником заломлення – *оптично менш щільним* середовищем.

Висновки

1. Абсолютні показники заломлення n_x завжди більше одиниці.
2. Відносні показники заломлення n_{21} можуть бути як більші, так і менші за одиницю, залежно від того, з якими швидкостями поширюється світло в межуючих середовищах, тобто залежно від значення їх абсолютних показників заломлення n_1 і n_2 . Дійсно, з рівняння (4.6) випливає, що:
 - якщо світло падає з середовища менш оптично щільного n_1 (наприклад, повітря) в середовище оптично більш щільне n_2 (наприклад, скло), то кут

падіння α буде більший за кут заломлення β , і $n_1 < n_2$, отже тоді, відносний показник заломлення буде більшим за одиницю ($n_{21} > 1$).

- якщо перехід світла здійснюється у протилежному напрямку (перше середовище є оптично більш щільним, ніж друге), тобто кут $\alpha < \beta$ ($n_1 > n_2$), тоді вочевидь, що $n_{21} < 1$.

Фактори, що впливають на значення показника заломлення

Вплив різних факторів розглянемо, використовуючи рівняння (2.5):

- **природа речовини** – чим більша густина середовища, тим менша швидкість розповсюдження світла в ньому V_2 , тим більше значення показника заломлення, наприклад, показник заломлення води 1,333, скла – 1,519.

- **концентрація речовини** – з ростом концентрації речовини в розчині показник заломлення збільшується. Це пов'язано із збільшенням густини розчину та зростанням взаємодії світла з речовиною, що приводить до зменшення швидкості світла V_2). Залежність n від концентрації речовини в розчині має вигляд лінійного рівняння:

$$n = n_0 + kC, \quad (2.8)$$

де n_0 – показник заломлення чистого розчинника;

C – концентрація речовини в розчині;

k – емпіричний коефіцієнт.

Графік залежності показника заломлення від концентрації має вигляд прямої не з початку координат (рис. 2.2).

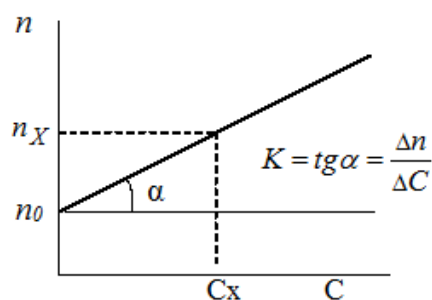


Рисунок 2.2 – Залежність показника заломлення від концентрації

Цей факт має практичне значення для визначення концентрації речовин в розчинниках. Емпіричний коефіцієнт k розраховується як:

$$k = \text{tg} \alpha = \frac{\Delta n}{\Delta C}. \quad (2.9)$$

- **довжина хвилі падаючого світла λ** . Залежність показника заломлення від довжини хвилі λ називається **дисперсією D** (лат. disperses – розсіяний). Чим менше λ , тим вище показник заломлення (рис. 2.3).

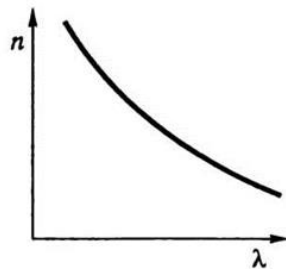


Рисунок 2.3– Залежність показника заломлення від довжини хвилі

Наслідком дисперсії є розкладання в спектр пучка білого світла при проходженні його крізь скляну призму. Таким чином, очевидно, що максимально заломлюється фіолетове світло, а менш усього – червоне світло.

Для отримання співставних результатів при вимірюванні показників заломлення різних речовин, вимірювання проводять, використовуючи монохроматичне світло однієї довжини хвилі, в основному – жовте світло ($\lambda=589\text{nm}$, D -лінія спектра газоподібного натрію). Це позначається нижнім індексом n_D .

• **температура** – при збільшенні температури показник заломлення зменшується, що зумовлено зменшенням густини розчину і, отже, збільшенням швидкості поширення світла. Для отримання співставних результатів вимірювання показників заломлення проводять при монохроматичному світлі і постійній температурі (зазвичай 20°C), що вказується у вигляді верхнього індексу n^{20} . Таким чином, остаточний запис показника заломлення має вигляд n_D^{20} .

Емпірично встановлено, що в інтервалі температур $15\text{-}25^\circ\text{C}$ із зростанням температури на 1°C показник заломлення зменшується на $0,0005$:

$$n_D^t = n_D^{20} - (20 - t) \cdot 0,0005. \quad (2.10)$$

Граничний (критичний) кут. Повне внутрішнє відбиття

Розглянемо наступну ситуацію: світло падає з середовища оптично більш щільного з показником заломлення n_1 (наприклад, скло) в середовище менш щільне з показником заломлення n_2 (наприклад, розчин). Очевидно тоді, що кут α менше за кут β , а $n_1 > n_2$ (рис. 2.4,а).

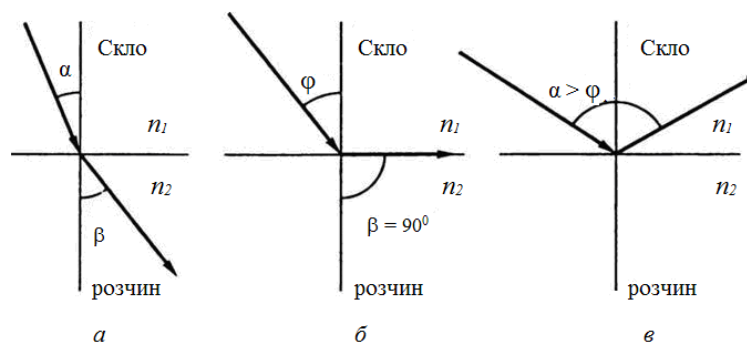


Рисунок 2.4 – Повне внутрішнє відбиття

Із зростанням кута падіння α зростає і кут заломлення β . Зрештою настане момент, коли із зростанням кута падіння α , кут заломлення β досягне 90° , тобто промінь не ввійде у друге середовище (розчин), а скочне по поверхні розділу середовищ. Кут падіння, за якого кут заломлення β дорівнює 90° , називають *граничним (критичним) кутом* (φ) (рис. 2.4 б). Якщо кут падіння α стане більшим за граничний кут φ , то падаючий промінь повністю відіб'ється від межі розділу середовищ. Це явище має назву *повне внутрішнє відбиття* (рис. 2.4,в). Наприклад, для діамантів повне внутрішнє відбиття відбувається за умов $\alpha = 30^\circ$, тому діаманти так блищать.

Явище повного внутрішнього відбиття використовується в призмах повного відбиття, які дозволяють повертати промені на 90° або 180° . Такі призми застосовуються в оптичних приладах (наприклад, в біноклях, перископах, рефрактометрах і світловодах).

Практичне вимірювання показника заломлення

У лабораторному практикумі для вимірювання показника заломлення використовують рефрактометр типу Аббе, принципова схема якого наведена на рисунку 2.5.

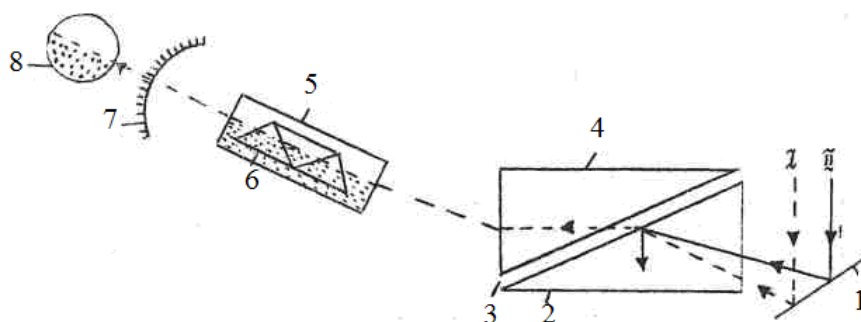


Рисунок 2.5 – Принципова схема рефрактометра Аббе:

1– дзеркало; 2– освітлювальна призма; 3– досліджувана речовина;

4– вимірювальна призма; 5– зорова трубка; 6–призма Амічі;

7– шкала рефрактометра; 8– об'єктив окуляра

Головною частиною рефрактометра є дві прямокутні призми, стулені діагональними площинами (2,4). Верхня скляна призма з матовою гіпотенузною гранню є *освітлювальна* (2), нижня призма з полірованою гіпотенузною гранню – *вимірювальна* (4).

Біле поліхроматичне світло (денне або електричне) спочатку потрапляє на дзеркало (1), яке знаходиться під призмовим блоком, відбивається від нього і входить в освітлювальну призму (2), від матової грані якої інтенсивно відбивається. Перше заломлення відбувається на межі освітлювальна призма (2) – розчин речовини (3). Друге заломлення відбувається на межі розчин речовини (3) – вимірювальна призма (4) (промінь I на рис. 13). Потім заломлений промінь

потрапляє в зорову трубку (5) і об'єktiv окуляру (8). Такий шлях проходять усі промені світла, які падають під кутом меншим, ніж граничний кут φ .

Повертаючи призмий блок відносно джерела світла (маховик зліва) можна домогтися такого його положення, коли кут падіння світла α на освітлювальну призму стане рівним або більшим граничного кута φ . Тоді світло не потрапить ні в розчин, ні в вимірювальну призму, ні в зорову трубку, ні в окуляр внаслідок повного внутрішнього відбиття (промінь II, рис. 2.5).

Якщо на шляху променів, що виходять з вимірювальної призми, поставити зорову трубу, то нижня половина її поля зору буде темна, а верхня залишиться світлою. При цьому положенні межа світлотіні визначається променем, відповідним граничному куту φ . Іншими словами, якщо $\alpha < \varphi$, то поле зору в окулярі буде освітленим, якщо $\alpha \geq \varphi$ – поле зору в окулярі буде темним. Межа поділу світла і тіні відповідає умові $\alpha = \varphi$.

При вимірюванні показника заломлення кут нахилу призми відносно дзеркала міняють доти, поки межа поділу темної і світлої половин не буде встановлена точно на перехресті окуляра (8). Значення показника заломлення знімають за шкалою (7).

В полі зору об'єктива одночасно видні перехрестя (візирний хрест), межа поділу світла і тіні та шкала показників заломлення з візирної лінією (рис. 2.6), які жорстко зв'язані з призмий блоком.

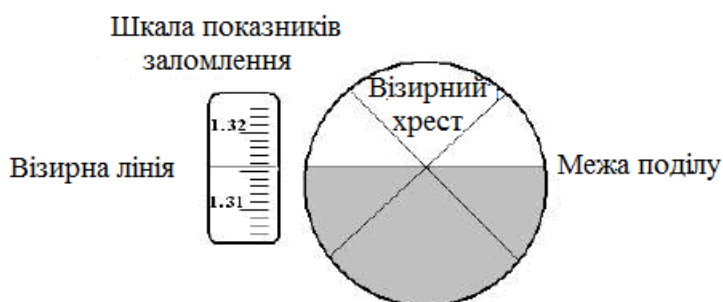


Рисунок 2.6 – Поле зору об'єктива рефрактометра

Проблемою при вимірюванні показників заломлення є те, що при спостереженні в білому світлі замість різкої межі світла і тіні може утворюватися розмита райдужна смуга, внаслідок дисперсії (розкладання) білого світла. Для усунення райдужності та отримання різкого зображення межі використовують *компенсатор дисперсії* (рис. 2.5, поз. 6), що складається з двох призми Амичі, які можуть обертатися у взаємно перпендикулярних напрямках. Кожна призма Амичі склеєна з трьох тригранних призми (рис. 2.7), виготовлених із скла різного гатунку (крон і флінт), підібраних таким чином, що тільки жовті промені не змінюють напрямку, коли проходять крізь призму.

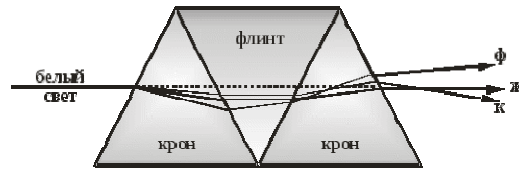


Рисунок 2.7– Хід променів у призмі Амичі

Тому показник заломлення відносять до жовтої D - лінії натрію. Якщо біле світло проходить через компенсатор при положенні призми I (рис. 2.8), воно розкладеться в спектр, а при положенні призми II - залишиться не розкладеним, знову збереться в білий промінь, напрямком якого буде тотожним напрямку поширення жовтого променя.

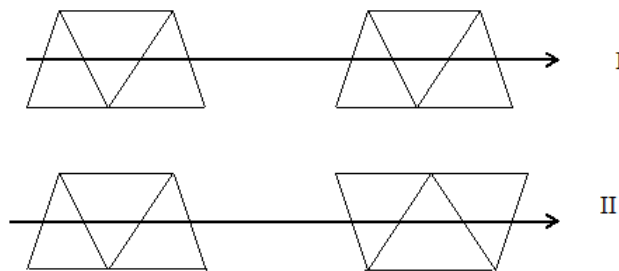


Рисунок 2.8 – Схема двох крайніх положень призми компенсатора

Рефрактометрію використовують для ідентифікації речовин, їх чистоти, визначення концентрації речовин у розчинах. Ідентифікацію проводять шляхом порівняння вимірних і табличних значень показників заломлення. Визначення концентрації речовини здійснюють або методом градуйованого графіка, або розрахунковим методом.

Визначення концентрації речовин за показником заломлення

1. Метод градуйованого (калібрувального) графіка

- готують 4-6 стандартних розчинів з відомою концентрацією досліджуваної речовини C ;
- виміряють показник заломлення кожного стандартного розчину при певній температурі, а також розчину, який досліджують (n_x);
- для стандартних розчинів будують градуйований графік залежності показника заломлення від концентрації $n = f(C)$ (див. рис. 10) і за n_x знаходять C_x .

2. Розрахунковий метод

Для розчинів різних речовин у широкому діапазоні концентрацій залежність показника заломлення від концентрації розчину може бути як лінійною,

так і нелінійною. Якщо в якомусь інтервалі концентрацій ця залежність лінійна, то рівняння залежності n від концентрації розчину має вигляд

$$n = n_0 + F \cdot C, \quad (2.11)$$

де n_0 – показник заломлення чистого розчинника;

C – концентрація розчину, %;

F – рефрактометричний фактор.

Рефрактометричний фактор F характеризує величину приросту показника заломлення при збільшенні концентрації розчину на 1%.

Таким чином, концентрацію речовини C можна розрахувати, виходячи з формули (2.11):

$$C = \frac{n - n_0}{F}. \quad (2.12)$$

Рефрактометричний фактор F знаходять експериментально. Для цього вимірюють значення показників заломлення n_1 і n_2 двох розчинів з вмістом визначеної речовини відповідно C_1 і C_2 (у %), після чого розраховують рефрактометричний фактор:

$$F = \frac{n_2 - n_1}{C_2 - C_1}. \quad (2.13)$$

Значення n_1 і n_2 вибирають таким чином, щоб n досліджуваного розчину знаходилося як найближче до n_1 і n_2 , а сам інтервал $(n_2 - n_1)$ був невеликим.

Переваги рефрактометричного методу: висока швидкість, технічна простота і точність вимірювання показника заломлення, незначні витрати речовин і реактивів.

Контрольні запитання

1. На вимірюванні якого показника ґрунтується рефрактометрія?
2. Які фактори і яким чином впливають на показник заломлення?
3. Що називається абсолютним і відносним показниками заломлення середовища та який їх фізичний зміст?
4. Що таке явище повного внутрішнього відбиття?
5. Який кут називається граничним кутом?
6. Способи визначення концентрацій у рефрактометрії.
7. В яких координатах будують калібрувальний графік у рефрактометрії?
8. Що таке рефрактометричний фактор?

3. МАС-СПЕКТРОМЕТРІЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

Мас-спектроскопія являє собою метод дослідження, що базується на визначенні маси і відносної кількості іонів, які утворюються при іонізації речовини, що вивчаються. Прилади, які дозволяють одержувати мас-спектри, мають назву мас-спектрометрів. За типом зарядів іонів, які утворюються, відрізняють мас-спектрометрію позитивних або негативних іонів /1-4/. Які ж основні процеси можуть відбуватися в молекулі під дією іонізатора.

Утворення іонів під дією іонізуючого випромінювання зумовлено процесами, які ділять на первинні і вторинні. Первинними процесами називають зміни в електронній структурі молекули або атому при енергіях, які є близькими або ненабагато перебільшують потенціал цих частинок /6-14 eV/. Такими є:

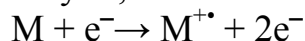
- збудження: $M \rightarrow M^*$;
- відрив електрону: $M \rightarrow M^+ + e^-$;
- приєднання електрону: $M + e^- \rightarrow M^-$

При більш високих енергіях мають місце вторинні процеси:

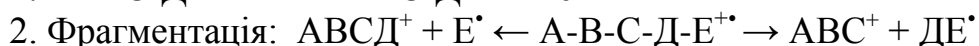
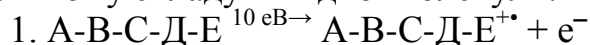
- автоіонізація $M^* \rightarrow M^+ + e^-$;
- дисоціативна іонізація $M^+ \rightarrow A^+ + B$;
- утворення іонної пари $M^* \rightarrow A^+ + B^-$

Повний мас-спектр містить позитивні, так і негативні іони.

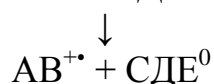
Первинним процесом іонізації є утворення молекулярного іону M^+ , який характеризує молекулярну масу і емпіричну формулу сполук. Молекулярний іон, який утворюється з нейтральної молекули, являє собою катіон-радикал:



Вторинні процеси розпаду ведуть до утворення осколкових або фрагментних іонів. Ці процеси розпаду супроводжуються перегрупуваннями. Нехай якась молекула АВСДЕ зазнає удару електронного пучка різної енергії. Молекулярний іон, який утворюється в процесі іонізації відповідає масі і елементному складу вихідної молекули:



3. Перегрупування з наступною фрагментацією:



Всі ці реакції в умовах низького тиску в мас-спектрометрії являють собою мономолекулярні процеси розпаду. Осколковий іон може бути катіоном або катіон-радикалом; частинка, що утворюється (E, DE тощо) може бути як радикалом, так і нейтральною молекулою.

Такі послідовні розпади, що реєструються мас-спектрометром, називають *шляхами* або *напрямами фрагментації*. Молекулярний іон і кожний з осколкових іонів можуть розпадатись за кількома напрямками. Об'єднуючи їх, складають схему фрагментації, що є типовою для кожного типу сполук.

В мас-спектрометрії іони розподіляються за масами. Останні вимірюються в одиницях відношення маси до заряду – m/z . Найчастіше утворюються однозарядні іони $/z=1/$.

Розглянемо принцип роботи магнітного мас-спектрометра. Після прискорення іону з масою m і зарядом z його потенційна енергія zV (де V – прискорюючий потенціал, тобто різниця потенціалів між прискорюючими електродами) перетворюється у кінетичну енергію $\frac{1}{2}mv^2$ (де v - швидкість іону в магнітному полі). При повному прискоренні маємо [1]: $zV = \frac{1}{2}mv^2$ (1).

В магнітному полі відцентрова сила врівноважується доцентровою силою дії поля:

$$mv^2/r = Hzv,$$

де r – радіус траєкторії руху іону в магнітному полі, а H – напруженість магнітного поля. Визначаємо швидкість: $mv = Hzr$, $v = Hzr/m$.

Виключаємо її з рівняння (1) і маємо основне рівняння мас-спектроскопії:

$$zV = H^2 z^2 r^2 / 2m \quad \text{або} \quad m/z = H^2 r^2 / 2V.$$

Змінюючи напруженість магнітного поля (H) при постійній напрузі (V), послідовно подають на колектор іони з певною масою. Так здійснюється магнітне сканування спектру. Реєстрацію іонних струмів в мас-спектрографах здійснюють за допомогою фотоемульсії.

Іонне джерело

Найширше використання знайшли прилади з іонізацією молекул електронним ударом. Енергію іонізуючих електронів можна регулювати зміною різниці потенціалів між катодом та іонізаційною камерою. Цю величину можна плавно змінювати від 5 до 100 еВ. При енергіях електронів 10-25 еВ одержують низьковольтові мас-спектри, які містять лише незначну кількість піків іонів і використовуються при ідентифікації молекулярного іона речовини, що досліджується.

За способом розділення “іонізованого газу” на пучки іонів з рівними масами відрізняють магнітні (найбільш розповсюджені), квадрупольні, час-прольотні і прилади іонциклотропного резонансу. Важливою характеристикою приладу є його розділяюча сила, яка є мірою його здатності розділяти два іони з масами M і $M+\Delta M$. Розділяюча здатність визначається таким чином: якщо два сусідніх піки мають рівні інтенсивності, і рівень провалу між ними не перевищує 10 %, то:

$$A = M/\Delta M.$$

Обробка і спосіб зображення мас-спектру

Сучасні прилади дозволяють за допомогою ЕОМ провести автоматичну обробку мас-спектру. Ручна обробка мас-спектру потрібна у разі відсутності комп'ютерного приладу в мас-спектрометрі.

Основні етапи роботи студента з мас-спектром: вибір точки відліку (у разі відсутності мас-відмітника); розрахунок коефіцієнту чутливості; складання таблиці мас-спектру; побудова графіку.

Для вибору точки відліку використовують область масових чисел в межах 14-40 а.е.м. (рис.1) Іони з $m/z=15$ в мас-спектрі органічних сполук мають склад CH_3 , іони з $m/z=17$ або 18 – OH або H_2O , відповідно, а з $m/z=28$ або 32 – кисень (O_2) або азот (N_2) (співвідношення їх інтенсивностей для повітря $\approx 4:1$). Іони з m/z 39, 41 або 43 є типовими вуглеводневими іонами (вони зумовлені слідами випарів масла з насосів).

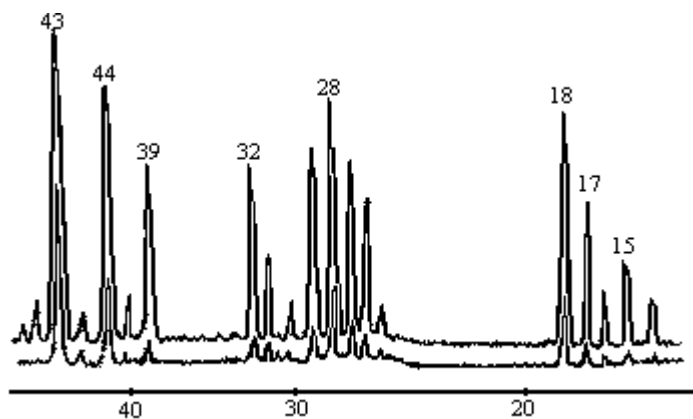


Рис. 3.1

У мас-спектрі піки часто розміщені групами, поміж яких інші піки відсутні. Для того, щоб розмітити маси, до лівої і правої груп піків треба прикласти по смужці паперу і позначити на них положення центрів піків (рис.3.2). Тоді смужки посувають назустріч одне одному на кілька поділок доти, доки крайні риски не збіжаться (рис.3.3). Таким же чином ідентифікують і багатозарядні іони.

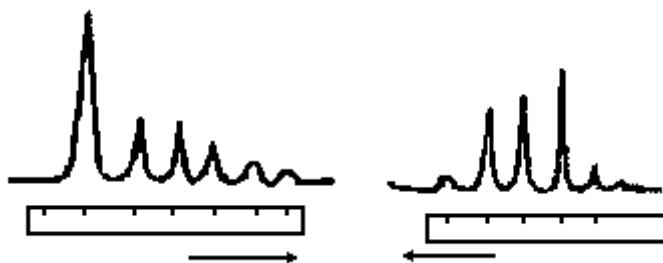


Рис. 3.2

Мас-спектр наводять, як правило, у вигляді таблиці або графіку, в яких позначені відносні інтенсивності сигналів для різних мас. Визначення інтенсивності кожного з піків зводиться до вимірювання їх висоти в міліметрах.

Світлопроменевий багатослейфовий осцилограф записує одночасно 3 або 5 спектрів різної чутливості на фотопапері, що є чутливим до УФ випромінювання і тому не потребує проявлення в розчинах. Невідомий коефіцієнт чутливості легко розрахувати, вимірюючи висоту в міліметрах двох “не зашкалених” піків одного й того ж іону. Але на різних шкалах (рис.3.1).

Висоту піків відлічують від базисної лінії по найчутливішому записові, який не виходить за межі шкали і множиться на відповідний коефіцієнт чутливості. Висота піків пропорційна кількості іонів кожної маси. Одержані дані записують в таблицю (табл. 3.1), де в першому стовпчиківі наводиться масове чмсло іону (m), в в другому – висота (інтенсивність) піку на відповідній шкалі (доріжці), в третьому – інтенсивність того ж піку, але помножена на коефіцієнт чутливості шкали (зведена інтенсивність), в четвертій – інтенсивність піку в відсотках відносно піку з максимальною інтенсивністю. Такий пік називають *основним* або *базовим піком* спектру, а такий запис мас-спектру називають *нормалізованим*. Іноді інтенсивність піків наводять у відсотках до повного іонного струму.

Таблиця 3.1 - Фрагмент таблиці мас-спектру

m/z	Інтенсивність, I		
	мм (шкала)	Зведена (до 1-ої шкали)	% до базового піку
134	18 (1)	18	1.3
133	27 (2)	270	19.3
132	14 (3)	1400	100
127	25 (1)	25	1.8
122	15 (2)	150	10.7
121	66 (1)	66	4.7

Графічний спосіб зображення мас-спектру є більш наочним і легше інтерпретується. При цьому на вісі абсцис відкладаються значення m/z, а на вісі ординат – відносна інтенсивність у відсотках.

Використання методу мас-спектрометрії дає можливість дослідникові одержати інформацію про молекулярну масу і формулу, а за характером фрагментації визначити структуру сполуки тощо [8-10].

Визначення молекулярної маси за піком тмолекулярного іону.

Молекулярний іон M^+ виникає при втраті молекулою одного електрону. Інтенсивність його залежить від стабільності молекулярного іону, що, як і стабільність інших іонів, залежить від ступеня делокалізації позитивного заряду в ньому по можливості як найбільшій кількості зв'язків. Для кількісної характеристики стабільності M^+ , часто використовують величину стабільності молекули до електронного удару (W_M):

$$W_M = (I_M / \Sigma I) \cdot 100 \%,$$

де I_M – інтенсивність поліізотопного молекулярного іона;

ΣI – сумарна інтенсивність всіх іонів.

Стабільність молекули до електронного удару залежить від її будови: для гексану вона складає 2.8, циклогексану – 15.5, бензолу – 33.2.

При зниженні енергії іонізуючих електронів до 10-15 еВ інтенсивність осколкових іонів сильно зменшується, а інтенсивність M^+ значно збільшується, що використовується при кількісному аналізові складних вуглеводневих сумішей.

При більш високих енергіях можлива втрата молекулою зразу двох або кількох електронів, що веде до утворення багатозарядних іонів з $m/z = m/2$, $m/z = m/3$ тощо. Якщо маса непарна, то двозарядний іон буде мати дробову, половинну масу.

Визначення характеру метастабільних переходів.

Для встановлення шляхів фрагментації широко використовуються метастабільні іони, енергія яких менше повної кінетичної енергії, що передається іонам в іншому джерелі. На відміну від звичайних такі іони розпадаються до детектування.

Якщо іон з масою m_1^+ розпадається з утворенням іону з масою m_2^+ і нейтральною частинки m_0 , то в мас-спектрі з'являється розмитий дифузний пік

низької інтенсивності m^* , часто значення масового числа m/z (m^*), що не є цілими числами. При цьому маси вихідного і похідного іонів і уявна маса метастабільного іону пов'язані між собою співвідношеннями:

$$m^* = m_2^+ / m_1^+$$

Так, в мас-спектрі бутана спостерігаються інтенсивні піки з m/z 58 і 43. Поява метастабільного (несправжнього) піку з уявною масою 31.9 свідчить про те, що деяка частина іонів з $m/z = 43$ (C_3H_7) утворюється шляхом викиду радикала CH_3 іоном з $m/z=58$, оскільки: $31.9=43^2/58$. Таким чином, виявлення метастабільного іону підтверджує фрагментацію вихідного іону з утворенням похідного іона.

Виявлення метастабільних переходів методом підбору часто супроводжується трудомісткими розрахунками, для чого використовуються спеціальні номограми для встановлення походження метастабільних іонів [7, 10].

Розрахунок інтенсивності ізотопних піків і молекулярної формули.

Більшість елементів яляють собою суміш ізотопів, відносний вміст яких в природі є сталим. Тому в мас-спектрах сполук з'являються додаткові, ізотопні піки, і маса M^{++} відрізняється від розрахункової. Так, молекулярна вага брометана (CH_3Br) становить 95, а в мас-спектрові цієї сполуки є два піки майже однакової інтенсивності, бо природний вміст ізотопів бромю майже однаковий (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 - Природний вміст ізотопів деяких елементів [11]

M	1H	^{12}C	^{14}N	^{16}O	^{28}Si	^{32}S	^{35}Cl	^{79}Br
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
M+1	2D	^{13}C	^{15}N	^{17}O	^{29}Si	^{33}S	-	-
	0,16	1,12	0,38	0,04	5,11	0,79		
M+2	-	-	-	^{18}O	^{30}Si	^{34}S	^{37}Cl	^{81}Br
				0,20	3,39	4,44	32,4	97,9

В мас-спектрі метану поряд з піком M^{++} з $m/z=16$ є пік іону з $m/z=17$ ($^{13}CH_4$) з співвідношенням інтенсивностей 100:1,12. Якщо в молекулі міститься двадцять атомів вуглецю ($C_{20}H_{34}$) поряд з піком M^{++} , якому відповідає комбінація найбільш легких ізотопів, буде пік M+1, інтенсивність якого приблизно складає $20 \cdot 1,12 = 22,4$ %.

Інтенсивність моноізотопного піку (M+1) дається у відсотках до інтенсивності M^{++} для сполук, молекулярний іон яких має формулу $C_n H_n Cl_{Cl} Br_{Br} N_n O_n S_n Si_{Si} \dots$, може бути розрахована за таким рівнянням:

$$I_{M+1} = \sum_1^n k_i m_i,$$

де k_i – природне розповсюдження важкого ізотопу i -ого елементу, що різниться від найбільш легкого на одиницю; m_i – кількість атомів i -ого елементу в молекулі [11].

В інтенсивність ліній M+2 значний внесок дають кремній, сірка і, особливо, хлор або бром. В інтенсивність лінії M+2 також дають внесок парні комбінації тих

атомів, які поодиноці дають внески лише в інтенсивність лінії M+1. Таким чином, сумарна інтенсивність лінії M+2 визначається за таким виразом:

$$I_{M+2} = \sum_1^n p_i m_i + A,$$

де p_i – розповсюдження важкого ізотопу i -ого елементу, що різниться від найбільш легкого за масою на 2 а.о.м.; m_i – кількість атомів i -ого елементу в молекулі; A – внесок парних комбінацій ізотопів, що відрізняються від найбільш легких на 1 а.о.м.. Останній знаходиться з виразу:

$$A = 10^{-2} \cdot [(1,12 \cdot 0,016 \cdot n_C \cdot n_H + 1,12 \cdot 0,38 \cdot n_C \cdot n_N + \dots + 5,11 \cdot 0,79 \cdot n_S \cdot n_{Si}) + 1/2 \cdot [1,12^2 \cdot n_C \cdot (n_C - 1) + 0,016^2 \cdot n_H (n_H - 1) + \dots + 0,79^2 \cdot n_S (n_S - 1)]], \%$$

Якщо в молекулі є кілька атомів хлору або бромів, відносні інтенсивності M, M+2, M+4, M+6 і тощо одержують розкладанням біному $(a + b)^n$, де n – кількість атомів, що розглядаються; a і b – відносний природний вміст ізотопів.

В загальному випадкові, якщо молекула вміщує елементи A і B, що складаються з ізотопів $A_1 A_2 A_3$ і $B_1 B_2 B_3 \dots$, відносно розповсюдження яких, відповідно, $a_1 a_2 a_3 \dots$ і $b_1 b_2 b_3 \dots$, а кількість атомів A – n і атомів B – m , тоді відносна інтенсивність різних комбінацій ізотопів цих елементів визначається за формулою:

$$(a_1 + a_2 + a_3)^n \cdot (b_1 + b_2 + b_3)^m$$

За ізотопним піком можна розрахувати елементний склад іону [3, 10].

Наприклад, в мас-спектрі сполуки для M^+ з масою 116 інтенсивність піку дорівнює 8,5, а для $M+1$ – 0,6 %. Розрахуємо інтенсивність піків іонів з $m/z=117$ відносно піку молекулярного іону:

$$8,5 - 100 \%$$

$$0,6 - x \quad x = 7,08 \%$$

В таблицях “Маси і відносне розповсюдження ізотопів для різних комбінацій вуглецю, водню, азоту і кисню” [7, 10], для маси 116 в третьому стовпчиківі для $M+1$ виписуємо формули з відсотковим вмістом ізотопного піку біля 7,08 %:

$$1. C_5H_{14}N_3 - 6,711$$

$$2. C_6H_{12}N_3 - 7,660$$

$$3. C_6H_{16}N_2 - 7,503$$

Згідно “азотного правила” молекула з парною кількістю атомів азоту має парний молекулярний іон. Непарній молекулярній масі відповідає непарна кількість атомів азоту. Виходячи з цього найбільш ймовірною є формула 3.

Зі співвідношення інтенсивностей піків іонів M^+ і $(M+1)$ можна приблизно визначити кількість атомів C, N, O, ступінь насиченості молекули і кількість циклів. Але цей метод є точним лише для сполук, що вміщують не більш ніж 10-12 атомів вуглецю.

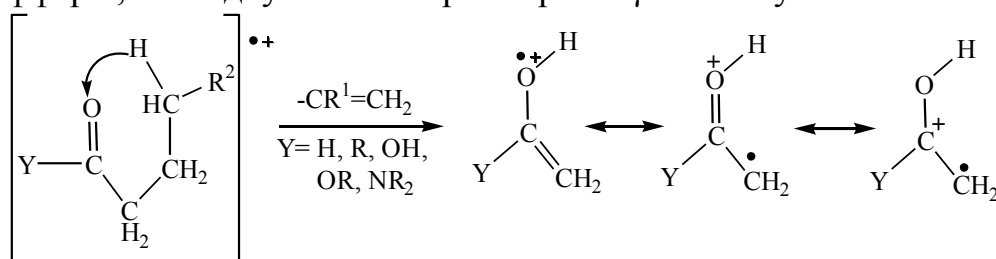
$$\text{Кількість атомів вуглецю: } n_C = \frac{I_{M+1}/I_M}{1,12} \cdot 100$$

$$\text{Кількість атомів азоту: } n_N = \frac{I_{M+1} / I_M \cdot 100 - 1,12 \cdot n_C}{0,38}$$

$$\text{Кількість атомів кисню: } n_O = \frac{I_{M+2} \cdot 100 - \frac{(1,1 - n_C)^2}{200}}{I_M} \cdot 0,2$$

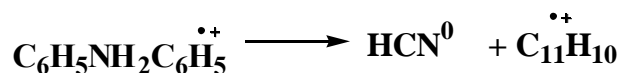
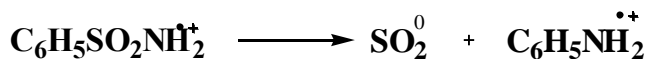
$$\text{Кількість кратних зв'язків і колець } H = n_C - \frac{n_H}{2} + \frac{n_N}{2} + 1$$

Інформацію про структуру речовини несуть також іони, що виникають при перегрупуваннях. Ці іони утворюються як результат внутрішньо-молекулярного атомного перегрупування в процесі фрагментації. Особливо широко розповсюджені перегрупування, що включають міграцію водню в молекулах, вміщуючих гетероатом. Прикладом такого перегрупування є перегрупування Мак-Лафферті, яке відбувається через переніс γ -H-атому:



Такі перегрупування часто ведуть до появи характерних інтенсивних піків, що корисні для ідентифікації. Ці піки можна відрізнити, розглядаючи масові числа осколкових і молекулярного (M^+) іонів. Звичайний без перегрупування розпад молекулярного іона з парним масовим числом дає осколковий іон з непарним m/z , але M^+ з непарним m/z дає осколковий іон з парним значенням m/z .

Якщо маса осколкового іону, яка спостерігається, відрізняється на одиницю від очікуваної маси, що утворюється при звичайному розриві, то це говорить про міграцію водню, що супроводжує фрагментацію (*прототронне перегрупування*). Розпади, які супроводжуються процесами міграції інших груп таких, як CO , CO_2 , SO_2 , CH_2O , HCN , S тощо, називають *скелетними перегрупуваннями*. Нейтральна частинка, що відщеплюється, має діагностичне значення. Наприклад:



Розглянемо, як використовуючи характер фрагментації, можна визначити належність сполуки до того чи іншого класу сполук.

Характер спектру залежить від природи досліджуваної сполуки: спектр аліфатичних вуглеводнів вміщує багато піків осколкових іонів, інтенсивність яких збільшується зі зменшенням значень m/z . Спектр з невеликою кількістю піків, який вміщує інтенсивний пік M^+ і піки двозарядних іонів, як правило, відповідає ароматичній структурі.

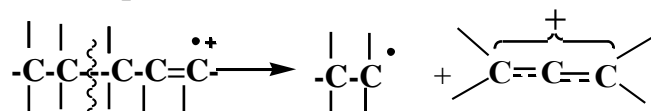
Міцність зв'язку С-С і С-Н у молекулярному іоні істотно зменшується у порівнянні з вихідною молекулою. Нижче для порівняння наведені міцності зв'язків С-С і С-Н в етані та катіон-радикалі ккал/моль і кДж/моль:

	С-С	С-Н
C_2H_6	83 (347)	96 (402)
$C_2H_6^+$	44 (184)	25 (109)

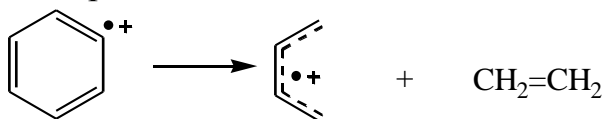
Тому загальний вигляд розпаду ускладнено процесами переугруповання, перебудови молекули та деяким переміщенням (рандомізацією) атомів вуглецю і водню. Низка піків з $m/z=15,29,43,57,85$ тощо є характеристичною для аліфатичних вуглеводнів.

У випадку розгалуджених алканів найбільш інтенсивний розрив зв'язків спостерігається в місцях розгалудження. Було помічено, що при розщепленні іону заряд залишається переважно на фрагменті, який має нижчий потенціал іонізації (правило Стивенсона) [3].

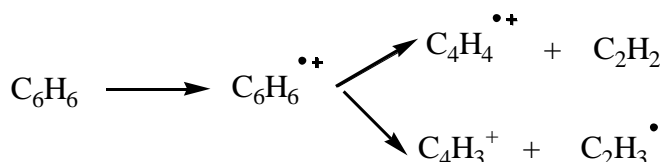
Мас-спектр алкенів мало відрізняється від спектрів алканів, за винятком явно переважного розщеплення в спільному або пропаргільному положенні, що пояснюється резонансною стабілізацією іонів, які утворюються:



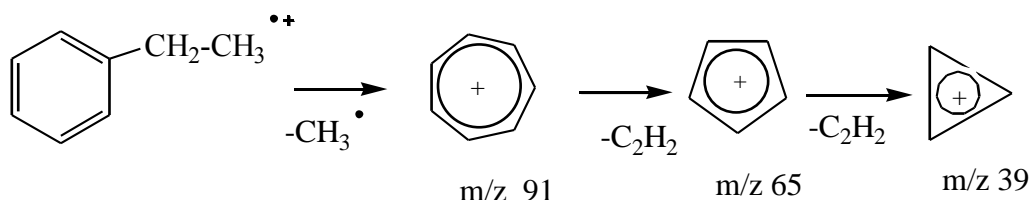
Якщо подвійний зв'язок знаходиться в циклові, то спостерігається аналогія з ретро-реакцією Дільса-Альдера:



Ароматичні сполуки дають порівняно стійкі і інтенсивні молекулярні іони. Фрагментація бензолу здійснюється за схемою:



Для алкілбензолів характерне бензильне розщеплення. Іону з $m/z=91(C_7H_7)$, виходячи з того, що всі водні рандомізовані, приписують структуру тропілієвого іону:

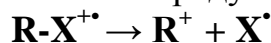


Первинна фрагментація аліфатичних гетероатомних сполук.

За впливом на мас-спектри гетероатоми розглядають як насичений чи ненасичений замісник. До гетероатомних насичених сполук належать галоген-похідні, спирти, аміни та інші, до ненасичених – альдегіди, кетони, кислоти, аміді тощо, тобто гетероатом цих сполук має не лише неподілені електронні пари, а й ще π -електрони.

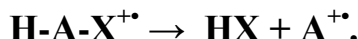
Найважливіші особливості мас-спектрометричного розпаду сполук першої групи – R-X, де X = F, Cl, Br, I, OH, NH₂, NR₂, SH, SR, метал:

а) розрив зв'язку C-X зі збереженням заряду на вуглеводневому фрагменті:

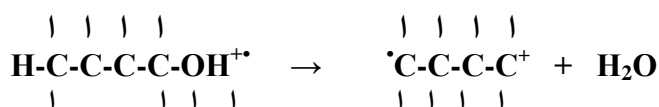


Цей процес здійснюється для Cl- і Br-похідних (але не для F) і майже є непомітним у тіолах, амінах, що залежить від міцності зв'язку C-X в M⁺.

б) розрив зв'язку вуглець-гетероатом з одночасним переносом водню. Такий розпад включає одночасний розрив декількох зв'язків, що свідчить про можливість процесів перегрупування. Осколкові іони в цьому випадкові мають парні m/z і відповідають фрагментам:

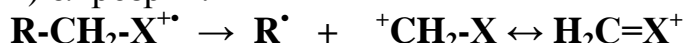


Дейтерометкою було показано, що втрата води в спиртах відбувається з захопленням протону переважно з γ- або δ-положення (перегрупування Мак-Лафферті [3, 7] :



Аналогічний процес спостерігається в тіолах, аміни важко відщеплюють NH₃ або NH₂.

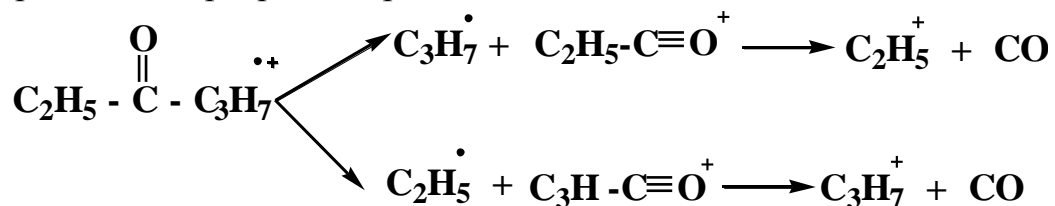
в) α-розрив:



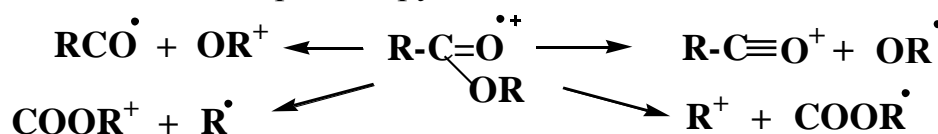
Чим ефективніша стабілізуюча здатність групи C-X, тим більш домінуючим є такий тип розпаду. Ці процеси легше за все йдуть для амінів, спостерігаються для етерів, тіоетерів тощо. Якісне уявлення про переважний напрям розпаду можна одержати на основі різниці в міцності зв'язку в іонах R-X [5].

г) розщеплення інших зв'язків, наприклад, зв'язку C-C, особливо в довголанцюгових сполуках.

Друга група сполук містить такі ненасичені замісники –C=O, -C=O, -COOH, -COOR, -CONH₂, а також групи –SO, -SO₂, POOR, CN тощо. Для кетонів спостерігається α-розрив з переважним відщепленням більш об'ємного радикалу:



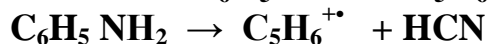
В альдегідах також має місце відщеплення атому водню. Поряд с цими процесами спостерігаються перегрупування. В мас-спектрах кислот, естерів і амідів процеси відщеплення груп OH, NR₂, OR все ще значні. Більш інтенсивний процес пов'язаний з втратою груп -COOH, -CONR₂, COOR :



Такі розриви спостерігаються у випадку сульфоксидів і сульфонів. Ароматичні гетероатомні сполуки показують складну поведінку в реакціях фрагментації. Лише хлор і нітробензол відщеплюють Cl і NO₂-групи, для C₆H₅F цей процес не йде:

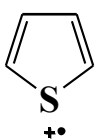
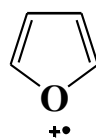
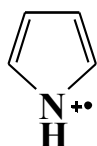


Фенол, анізол, анілін розпадаються так:



Якщо ароматичне кільце містить не один, а кілька замісників, процеси фрагментації часто залежать від їх положення, що використовується для ідентифікації цих речовин.

При фрагментації піролу, піридину, фурану і тіофену спостерігається відщеплення частинок СНХ:



Більш повний опис напрямків і особливостей фрагментації окремих класів сполук наведений в [3-5,10].

4. МОЛЕКУЛЯРНА СПЕКТРОСКОПІЯ

Одним з найефективніших методів дослідження будови органічних речовин можна вважати молекулярну або оптичну спектроскопію, до складу якої входять ультрафіолетова (УФ), інфрачервона (ІЧ) та спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР).

Оптична спектроскопія – це розділ фізики, який займається вивченням закономірностей взаємодії електромагнітної радіації (світла) з речовиною, що супроводжується процесами поглинання, випромінювання та розсіювання світла.

Здатність до поглинання електромагнітного випромінювання є загальною властивістю всіх молекул, проте світло поглинається речовиною вибірково: тобто випромінювання певної довжини хвилі дана речовина сильно поглинає, тоді як випромінювання інших хвиль поглинається слабо.

Область інтенсивного поглинання випромінювання називається смугою. Сукупність смуг складає спектр поглинання.

Таким чином, оптична спектроскопія досліджує залежність інтенсивності поглинання світла речовиною від довжини хвилі (енергії) випромінювання.

Поглинання називається характеристичним, якщо воно пов'язане з поглинанням певної групи атомів, причому характер поглинання мало залежить від того в молекулі якої речовини знаходиться ця група.

Присутність в спектрах характеристичних смуг поглинання дозволяє виявити у речовин певні структурні елементи, тобто доказати структуру молекули.

Основні поняття та визначення

Електромагнітне випромінювання має хвильові та корпускулярні властивості. Корпускулярні властивості світла виявляються в тому, що

випромінювання та поглинання енергії відбувається квантами, енергія яких описується рівнянням: $E=hv$, де h - постійна Планка ($6,5 \cdot 10^{-27}$ ерг.с); ν - частота випромінювання (Гц); c – швидкість світла у пустоті ($3 \cdot 10^{10}$ см/с). Енергію (E) визначають в електронвольтах (еВ) або в кілоджоулях (кДж): $1\text{еВ} = 0,24$ кДж.

Теорія молекулярної спектроскопії будується на двох постулатах Бора:

1. Атом (або молекули) існують без зміни своєї енергії тільки в певних стаціонарних становищах (енергетичних рівнях), енергії яких утворюють дискретний ряд значень $E_1, E_2, E_3 \dots E_x$ (рис.4).

2. Атом (або молекула) стрибкоподібно переходить з одного стаціонарного стану в інший, якщо поглинає або випромінює енергію. Такий перехід супроводжується зміною енергії системи і визначається співвідношенням Бора:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu = hc/\lambda$$

З рівняння виходить, що енергія кванта світла пропорційна частоті електромагнітної хвилі та обернена довжині хвилі: $\nu = c/\lambda$; $c = \nu\lambda$

В оптичній спектроскопії для характеристики світлової хвилі використовується величина, що обернена довжині хвилі - $\bar{\nu}$ - хвильове число:

$$\bar{\nu} = 1/\lambda = 1/c \nu$$

Величина	Одиниця вимірювання	Співвідношення між одиницями	Співвідношення між величинами
Довжина хвилі: λ	метр (м) мікрон (мк) або мікромметр (мкм) мілімікрон (ммк) або нанометр (нм) ангстрем	$1\text{м} = 10^6\text{мк} = 10^9\text{ммк} = 10^{10}\text{Å}$ $1\text{мк} = 10^{-6}\text{м} = 10^3\text{ммк} = 10^4\text{Å}$ $1\text{нм} = 10^{-9}\text{м} = 10^{-3}\text{мк} = 10\text{Å}$ $1\text{Å} = 10^{-10}\text{м} = 10^{-4}\text{мк} = 10^{-1}\text{нм}$	$\lambda = hc/E$; $\lambda(\text{Å}) = 12397/E(\text{еВ})$ $\lambda(\text{Å}) = 10^8/\bar{\nu}(\text{см}^{-1})$ $\lambda = 1/\bar{\nu}$; $\lambda(\text{мк}) = 10^4/\bar{\nu}(\text{см}^{-1})$
Частота ν	Герц (Гц) МегаГерц (МГц)	$1\text{МГц} = 10^6\text{Гц}$	$\nu = c/\lambda$; $\nu = E/h$; $\nu = c\bar{\nu}$
Хвильове число $\bar{\nu}$	Обернений метр (м^{-1}) Обернений сантиметр (см^{-1})	$1\text{м}^{-1} = 10^{-2}\text{см}^{-1}$ $1\text{см}^{-1} = 10^2\text{м}^{-1}$	$\nu = E/hc$; $1\text{см}^{-1} = 2.858\text{ кал/моль}$ $\bar{\nu} = 1/\lambda(\text{см})$; $\bar{\nu}(\text{см}^{-1}) = 10^4/\lambda(\text{см})$

Хвильове число $\bar{\nu}$ показує число хвиль певної довжини, що містяться на 1 см світлового променя, і вимірюється у см^{-1} (обернені сантиметри). Хвильове число прямо пропорційне частоті, завдяки цьому хвильове число часто називають частотою. Випромінювання, яке має певне постійне хвильове число, тобто однакову енергію квантів, називається монохроматичним. В таблиці 3 наведені величини, якими користуються в оптичній спектроскопії, і співвідношення між ними.

Електромагнітне випромінювання або спектр електромагнітних хвиль можна поділити на декілька ділянок в залежності від довжини хвилі та енергії.

При цьому випромінювання кожної ділянки при поглинанні змінює один з видів або декілька видів внутрішньої енергії молекули, що визначає область спектроскопії та відповідний метод дослідження.

Повна енергія молекули E може бути виражена як сума електронної $E_{\text{ел.}}$, коливальної $E_{\text{кол.}}$ та обертальної $E_{\text{об.}}$ енергій:

$$E = E_{\text{ел.}} + E_{\text{кол.}} + E_{\text{об.}}$$

Теорія та експеримент доводять, що ці види енергій знаходяться у співвідношенні:

$$E_{\text{ел.}} : E_{\text{кол.}} : E_{\text{об.}} = 1 : (m/M)^{0.5} : (m/M), \text{ де } m - \text{ маса електрону, } M - \text{ маса ядра.}$$

Таким чином, $E_{\text{ел.}} \gg E_{\text{кол.}} \gg E_{\text{об.}}$ і тому знаходяться в різних частинах електромагнітного спектру.

Випромінювання	Енергія E (eV)	Довжина хвилі λ (нм)	Хвильове число $\bar{\nu}$ (см^{-1})	Зміна в енергетичному стані	Область спектроскопії	Метод
Радіохвилі	10^{-6} - 10^{-4}	10^6 - 10^9	10^2 - 10	Спінів ядер	Радіо-спектроскопія	ЯМР ЕПР
Інфрачервона область дальня середня ближня	10^{-2} - 10^{-1}	2.5×10^4 - 10^5 10^3 - 10^4 7.0×10^3 - 2.5×10^4	10^2 - 4×10^2 10^2 - 10^3 14×10^2 - 4×10^3	Атомів завдяки коливанням, обертанням зовнішніх валентних електронів	оптична	ІЧ
Видима область	10	400 - 10^3	10^4 - 2.5×10^4		спектроскопія	електронні спектри поглинання
Ультрафіолетова область ближня вакуумна	10^2 - 10^3	200-400 100-200	2.5×10^4 - 5×10^4 5×10^4 - 10^5			

Хіміки для дослідження структури молекули користуються ультрафіолетовою, видимою, інфрачервоною та радіочастотною областями спектру.

Якщо енергія випромінювання мала ($\lambda \div 1$ - 0.1 мм, $\bar{\nu} \div 10$ - 100 см^{-1}), молекула переходить в збуджений обертальний стан, а коливальне і тим більше електронне становище не змінюються. Таким чином, суто обертальний спектр потрапляє в далеку інфрачервону область і навіть в область радіочастот. Подальше підвищення енергії електромагнітного випромінювання викликає коливальні переходи, яким відповідають хвилі довжиною 2.5 - 100 мкм або частоти 100 - 4000 см^{-1} . Звичайно, разом з коливаннями збуджуються і обертання, тому

спостерігається коливально-обертальний спектр, який знаходиться в інфрачервоній області.

Для збудження електронів потрібні великі енергії, відповідні частоти лежать у видимій та ультрафіолетовій частинах спектру ($\lambda \div 100-800$ нм, $\nu \div 10^5-10^4$ см⁻¹). При поглинанні такої енергії одночасно змінюються коливальне і обертальне становища молекули.

Іншою характеристикою електромагнітного випромінювання є його інтенсивність, яка пов'язана з кількістю квантів світла, що проходять за одиницю часу крізь одиницю площі. Якщо випромінювання монохроматичне, його інтенсивність при проходженні крізь речовину визначається законом Бугера-Ламберта-Бера: $\lg(I_0/I) = K \cdot N$,

де I_0 - інтенсивність падаючого світла, I - інтенсивність світла, що пройшло, N - кількість молей поглинаючої речовини, K - постійна, що визначається природою речовини.

Для розчинів речовини у розчиннику, який є прозорим для частот, що вимірюються, те саме рівняння має вигляд $D = \lg I_0/I$; $D = \epsilon c l$, де l - товщина шару розчинника або довжина світлового шляху (см); c - концентрація речовини (моль/л); ϵ - мольний коефіцієнт поглинання або коефіцієнт екстинкції (л/моль·см), D - оптична густина розчину; T -процент пропускання:

$$T = I/I_0 \times 100\%; D = -\lg T$$

Мольний коефіцієнт поглинання розчину ϵ характеризує поглинання розчину, концентрація якого дорівнює 1 моль/л у кюветі з довжиною світлового шляху 1 см. В спектроскопії цей коефіцієнт прийнятий як міра інтенсивності поглинання даною речовиною монохроматичного світла. Величина ϵ залежить від природи речовини та довжини хвилі світла, яке поглинається.

Оптичною спектроскопія названа тому, що дослідження речовини відбувається за допомогою спектральних приладів, в основі яких лежить оптичний метод розкладення випромінювання. такі прилади містять джерело випромінювання, монохроматор, приймач випромінювання та пристрій для реєстрування. Джерелами випромінювання можуть бути воднева лампа (195-350 нм), лампа розжарювання (350-1000 нм) або стержень з карбіду кремнію (600-4000 см⁻¹). Щоб отримати монохроматичне випромінювання користуються наступними оптичними матеріалами: кварц (УФ-область), скло (видима область), солі металів (ІЧ-область).

5. ЕЛЕКТРОННІ СПЕКТРИ ПОГЛИНАННЯ

Електронний спектр речовини - це графічна залежність інтенсивності поглинання (пропускання) або оптичної густини розчину (D), або молярного коефіцієнту поглинання (ϵ) від довжини хвилі (λ), або частоти (ν) світла, яке поглинається.

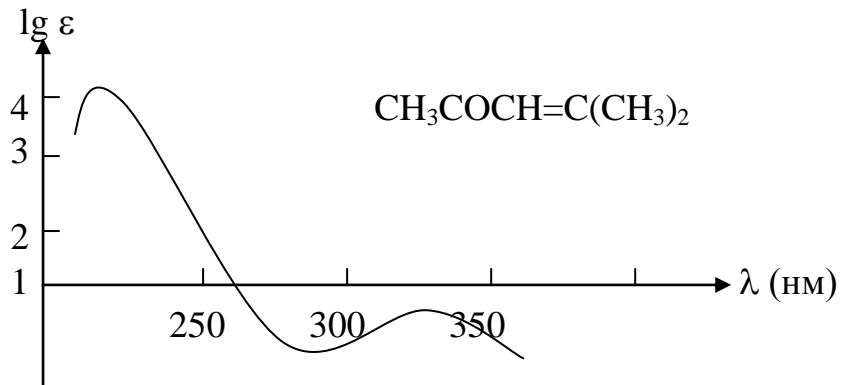


Рис. 5. Електронний спектр окису мезитилу

Якщо на одній кривій потрібно виставити інтенсивності поглинання, що значно відрізняються одне від одного, треба користуватися логарифмічною шкалою, тобто на осі ординат відкладати значення $\lg \epsilon$.

Електронну смугу поглинання характеризують:

1. Положення максимуму в одиницях довжини хвилі (нм) або хвильового числа (см^{-1});
2. Значення інтенсивності в точці максимуму;
3. Інтегральна інтенсивність або сила осцилятора інтегральної інтенсивності f ($f = 4.315 \times 10^{-9} \int \epsilon dv$). Величині f відповідає площа смуги. Значення f від 0.1 до 1.0 відповідає значенням ϵ в інтервалі від 10 000 до 100 000.

Основні терміни

Хромофор - ковалентно ненасичена група, яка обумовлює поглинання в ближній УФ- або видимій області спектру. Хромофори поділяють на ізольовані та супряджені. До ізольованих хромофорів належать групи з одним кратним, наприклад, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}=\text{N}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{N}=\text{O}$, $\text{S}=\text{O}$ та інші.

Супряджені хромофори - це ненасичені групи, які поділені одним простим зв'язком, наприклад, $-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$, $-\text{N}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$, $\text{R}(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{R}'$, $-\text{C}=\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-$, $-\text{C}=\text{C}-\text{N}=\text{N}-$ та інші. До супряджених хромофорів належать також хромофори бензольного ряду.

Ауксохром - ковалентно насичена група, яка пов'язана з хромофором і викликає зміщення смуги поглинання та збільшення її інтенсивності. Типові ауксохроми: OH , NH , NHR , SH , CH_3 , Cl та інші.

Батохромний зсув - зміщення смуги поглинання до області довгих хвиль (менших частот) - червоний зсув.

Гіпсохромний зсув - зміщення смуги поглинання в бік коротких хвиль (високих частот) - синій зсув.

Гіперхромний ефект - збільшення інтенсивності смуги поглинання.
Гіпохромний ефект - зменшення інтенсивності.

Класифікація електронних переходів

Електронні спектри пов'язані з переходом електронів з основного стану в збуджений. Електронні переходи класифікують відповідно типу валентних

електронів молекули. Молекула може мати декілька видів електронів: σ - або π -валентні електрони, які розташовані на зв'язуючих орбіталях, та n -електрони неподілених пар гетероатомів (N, O, S, тощо), які займають незв'язуючі n -орбіталі. Згідно теорії молекулярних орбіталей, виникнення електронних спектрів пов'язано з електронним переходом зі зв'язуючої (σ , π) орбіталі або n -орбіталі на вакантні розпушені σ^* або π^* орбіталі. Можливо 4 типи переходів: $\sigma \rightarrow \sigma^*$; $\pi \rightarrow \pi^*$; $n \rightarrow \sigma^*$; $n \rightarrow \pi^*$ (мал. 6).

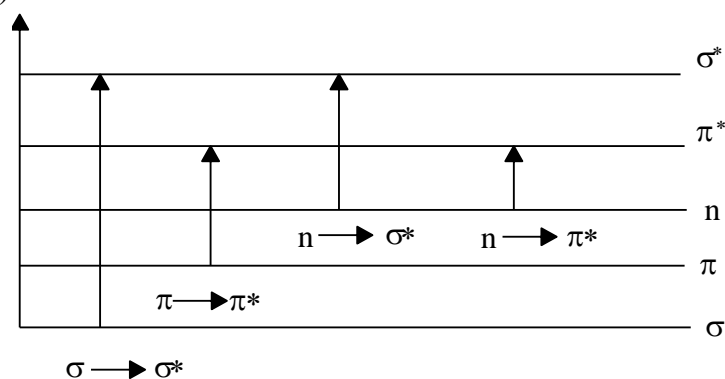


Рис.6. Типи електронних переходів

Найбільшій енергії для збудження потребують $\sigma \rightarrow \sigma^*$ переходи. Тому сполуки, які мають С-С, С-Н-зв'язки (насичені вуглеводні) звичайно поглинають у дальній (вакуумній) ультрафіолетовій області ($\lambda \leq 200$ нм). Так, для метану $\lambda_{\max} = 125$ нм, для етану $\lambda_{\max} = 135$ нм, циклопропан має смугу поглинання з $\lambda_{\max} = 190$ нм, що пов'язано з деякою ненасиченістю трьохчленного циклу.

Значно меншій енергії потребують $\pi \rightarrow \pi^*$ переходи, які характерні для ненасичених сполук і розташовані у видимій та ближній УФ-області. Так, для етилену $\lambda_{\max} = 163$ нм, алкільвміщуючі етилені мають широкі інтенсивні смуги ($\epsilon \sim 10000$) в області 173-190 нм. Положення смуг залежить від числа алкільних замісників та від характеру їх положення при подвійному зв'язку (цис, транс).

Якщо молекула має супряджені кратні зв'язки (ефект $\pi\pi$ -супрядження), смуга поглинання, яка пов'язана з $\pi \rightarrow \pi^*$ переходом, значно зміщується у довгохвильовий бік (батохромний зсув), зростає її інтенсивність (гіперхромний ефект). Такі смуги позначають як К-смуги супрядженого хромофору. Наприклад, для ряду полієнових кислот $\text{CH}_3-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{COOH}$ величина максимуму поглинання змінюється від 210 нм у випадку, коли $n=1$, до 320 нм, коли $n=4$. Смуги поглинання довгих полієнових ланцюгів завдяки ефекту $\pi\pi$ -супрядження потрапляють до видимої області, тобто сполуки становляться забарвленими.

Переходи $n \rightarrow \sigma^*$ (наприклад, у CH_3NH_2) та $n \rightarrow \pi^*$ (у кетонах, альдегідах та ін.) відбуваються з атомної n -орбіталі, енергія якої більша за енергію σ та π -орбіталей, тому $n \rightarrow \sigma^*$ переходи потребують найменшої енергії і проявляються в ближній УФ-області та видимій частині спектру.

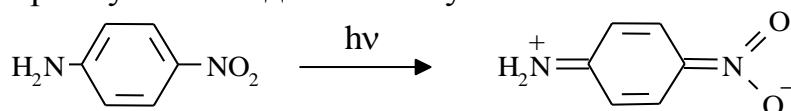
Найбільш характерним є поглинання, яке відповідає $n \rightarrow \pi^*$ переходу у сполуках, що містять кратні зв'язки: С=О, С=N, N=O, С=S та інші; воно проявляється у вигляді довгохвильової низько інтенсивної смуги - R-смуги. К- та R- смуги відрізняються перш за все інтенсивністю. Так, К-смуги мають значення ϵ

від 10000 і вище (дозволений $\pi \rightarrow \pi^*$ перехід), а R-смуги - від декількох одиниць до декількох сотень ($n \rightarrow \pi^*$ переходи є недозволеними з міркувань симетрії).

Віднести ту чи іншу смугу до K або R можливо за правилом Мак-Конела, яке формулюється таким чином: якщо зміщення максимуму поглинання завдяки переходу від неполярних розчинників до полярних здійснюється гіпсохромно (в бік коротких хвиль), то цей максимум належить до K-смуги, якщо батохромно (в бік довгих хвиль) - до R-смуги.

Найнадійнішим засобом віднесення того чи іншого максимуму до R-смуги є його зникнення в кислих середовищах, що пояснюється протонуванням п-електронів, які завдяки цьому позбуваються свого незв'язуючого характеру і тому $n \rightarrow \pi^*$ перехід не відбувається.

Присутність в електронному спектрі деяких інтенсивних смуг поглинання ($\epsilon \geq 10^4$) пов'язано з перенесенням заряду в молекулі при переході з основного стану в збуджений. Переходи з перенесенням заряду, які проходять між молекулярними орбіталями, локалізованими на різних атомах, мають назву переходів з внутрішньомолекулярним перенесенням заряду (ВПЗ). Такі переходи супроводжуються зміщенням електронної густини з електронодонорної групи до електроноакцепторної у межах однієї молекули:

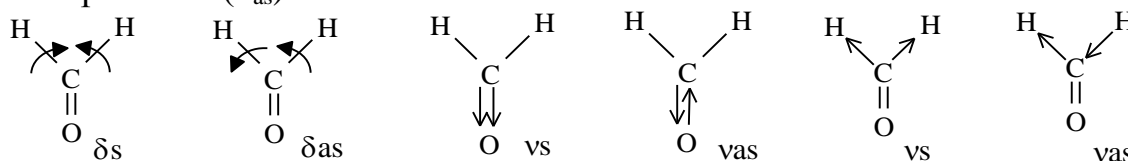


Критерієм віднесення того чи іншого максимуму до смуги ВПЗ, крім великої інтенсивності, є відповідність енергії переходу ($h\nu_{\text{ВПЗ}}$) різниці між енергіями іонізації донора (I_D) та спорідненості до електрона акцептора (E_A): $h\nu_{\text{ВПЗ}} = I_D - E_A$.

Інфрачервона спектроскопія

Область електромагнітного спектру від 25000 до 2500 нм (10^{-2} - 10^{-4} см) з енергією приблизно 0.1 еВ, частотою від 500 до 5000 см^{-1} пов'язана з коливанням атомів в молекулах. Коливальні частоти присутні в ІЧ-спектрах та спектрах комбінаційного розсіювання (КР) або Раман спектрах. В ІЧ-спектрах активні, тобто проявляють себе, такі коливання, які супроводжуються зміною дипольного моменту. В спектрах КР активними є коливання, які викликають зміну здатності молекули до поляризації.

Розглянемо, що відбувається, коли випромінювання з частотою від 500 до 5000 см^{-1} проходить крізь пари формальдегіду. В області енергій, які відповідають хвильовому числу приблизно 1400 см^{-1} , інтенсивність потоку енергії, що пройшла, різко падає (відбувається поглинання). Енергія випромінювання витрачається на зміну валентних кутів між атомами водню. Такого типу коливання атомів носять назву *деформаційних* (δ) та бувають симетричними (δ_s) і антисиметричними (δ_{as}):



При подальшому зростанні енергії випромінювання поглинання спостерігається при 1745 см^{-1} . Ця енергія витрачається на зміну довжини зв'язку карбонільної групи. Такого типу коливання називаються *валентними* (ν), вони також бувають симетричними (ν_s) та антисиметричними (ν_{as}). Відрізняють частоти характеристичні та скелетні. Експериментально доведено, що кожна хімічна група, у якій сполуці вона б не знаходилась, здібна поглинати енергію тільки певної довжини хвилі, тобто у вузькому інтервалі частот. Такі частоти мають назву характеристичних. До них належать частоти поглинання груп: C=O, NH, C=N та інші.

Таблиця 5

Характеристичні частоти поглинання функціональних груп в ІЧ-спектроскопії

Групи	Частоти поглинання, см^{-1}
O-H	3600-3200 (іноді нижче, сильна)
N-H	3500-3000 (сильна)
C-H	3000-2800 (сильна)
$\text{C}\equiv\text{N}$	2250-2200 (слабка)
$\text{C}\equiv\text{C}$	2250-2150 (слабка)
C=O	1850-1650 (дуже сильна)
C=C	1680-1600 (слабка)
NH_2	3500-3300 (подвійний пік, середня)

З таблиці видно, що характеристичні частоти у спектрі з'являються звичайно вище 1500 см^{-1} . Скелетні коливання знаходяться в області $1500\text{-}800 \text{ см}^{-1}$, де виявляються валентні коливання зв'язків C-C, N-O, C-O та деформаційні коливання зв'язків N-H, O-H, C-H. Набір різких смуг поглинання в цій області є індивідуальною характеристикою кожної сполуки, тому ця частина спектру має назву області "відбитків пальців" або дактилоскопії (від *dactilos* - палець, *scopeo* - дивлюсь).

ІЧ-спектри записують графічно як поглинання або пропускання (Т%) у відсотках (по осі ординат) відносно хвильового числа (см^{-1}) або довжини хвилі в мікронах (λ мкм або $\lambda_{\text{нм}}$) (по осі абсцис). $1 \text{ мкм} = 10^{-4} \text{ см} = 10000 \text{ см}^{-1}$, тому $(\text{см}^{-1}) \times \lambda (\text{мкм}) = 10^4$.

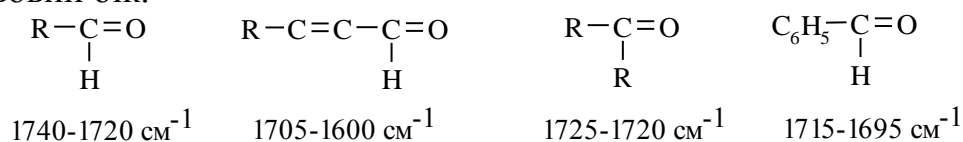
ІЧ-спектр зразка знімають у розчині, у вигляді тонкої твердої плівки, у вигляді рідкої пасти, що містить тонкий шар речовини (2-5 мг) у невеликій кількості нуйлона (1 мл) або у вигляді пресованих таблеток речовини з KBr або KCl (1 мг сполуки на 100-200 мг галогенідів).

Найчастіше спектри знімають у нуйлоні - суміші високо киплячих фракцій нафти; замість нуйлону з успіхом користуються звичайним вазелиновим та парафіновим маслами або гексахлорбутадієном (ГХБ). Тому необхідно пам'ятати, що ці речовини самі по собі дають декілька сильних смуг поглинання, в області яких неможливо проводити інтерпретацію спектру:

нуйлон - 2920-2720	ГХБ - 1640-1510
1470-1410	1200-1140
1380-1350	1010-760

За допомогою ІЧ-спектроскопії досліджують будову органічних сполук, наявність або відсутність різних функціональних груп. Так, характеристична смуга поглинання карбонільної групи завжди інтенсивна і знаходиться в області 1810-1620 cm^{-1} . Точне значення частоти дає можливість хіміку зробити вибір між ймовірними структурами.

В аліфатичних альдегідах поглинання групи $\text{C}=\text{O}$ знаходиться в інтервалі 1740-1720 cm^{-1} , у насичених кетонах в області 1725-1705 cm^{-1} , у карбонових кислотах - 1790-1720 cm^{-1} . Супрядження викликає зсув смуги поглинання у довгохвильовий бік.



За допомогою ІЧ-спектроскопії вивчають міжмолекулярні та внутрішньомолекулярні взаємодії. Так, вільна, неасоційована гідроксильна група спиртів та фенолів має вузьку смугу поглинання в області 3670-3580 cm^{-1} . Участь гідроксильної групи в утворенні міжмолекулярних водневих зв'язків викликає зсув смуги поглинання в бік менших частот (3400-3200 cm^{-1}), поширення смуги поглинання та значне підвищення її інтенсивності. Якщо зразок розчинити у неполярному розчинникові, водневі зв'язки руйнуються і частоти поглинання у такому розчині підвищуються. Таке явище не спостерігається у випадку внутрішньомолекулярного водневого зв'язку, якому в спектрі відповідає вузька смуга в області 3590-3420 cm^{-1} .

ІЧ-спектри використовуються для встановлення ідентичності сполук, для контролю за ходом реакцій, для виявлення ізомерії, конфігурації та конформації молекул.

Ядерний магнітний резонанс (ЯМР)

Загальні уявлення

Спектроскопія ЯМР є ще одним абсорбційним методом, спорідненим з ІЧ- та УФ-спектроскопією. Для неї характерні дуже малі значення енергії в рівнянні Бора (10^{-6} еВ), носіями енергії є радіохвилі ($\lambda \approx 100$ см), в зв'язку з чим метод також називають радіоспектроскопічним. Розвиток методу ЯМР розпочався після відкриття Парсела і Блоха в 1946 р., зараз воно визнано одним з найбільш важливих для органічної хімії з початку її розвитку. Спектроскопія ЯМР є найбільш потужним та інформативним методом досліджень сполук, за допомогою якого встановлюють будову, конфігурацію і конформацію молекул, проводять кінетичні дослідження, розв'язують задачі по встановленню якісного та кількісного складу хімічних сполук.

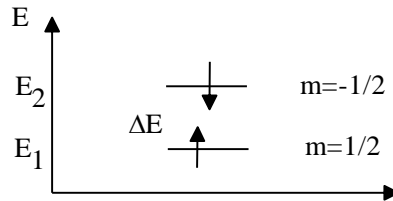
За допомогою методу ЯМР досліджують ядра елементів, у яких є власний момент кількості руху (спін) і магнітний момент; для таких ядер сума протонів і нейтронів є непарне число. Спін ядра характеризують значенням спінового квантового числа, кратного половині.

$$I = 1/2 \text{ (} ^1\text{H, } ^{13}\text{C, } ^{15}\text{N, } ^{19}\text{F, } ^{31}\text{P)}$$

$$I = 1 \text{ (} ^2\text{H, } ^{14}\text{N, } ^{17}\text{O)}$$

$$I = 3/2 \text{ (} ^{14}\text{B, } ^{35}\text{Cl, } ^{79}\text{Br, } ^{81}\text{Br, } ^7\text{Li, } ^{23}\text{Na)}$$

Альтернативну групу складають немагнітні ядра (^{12}C , ^{16}O , ^{32}S). Магнітні ядра в магнітному полі ведуть себе як маленьки магніти. Так, для протонів ($I = 1/2$) вектор магнітного моменту орієнтується паралельно або антипаралельно зовнішньому магнітному полю. В загальному випадку число можливих орієнтацій складає $2I+1$. Кожній з них відповідає визначена енергія (для водню E_1 та E_2) і відповідне значення магнітного квантового числа ($m = 1/2, -1/2$).



Якщо перпендикулярно до напрямку силових ліній магнітного поля прикласти змінне електромагнітне поле, частоту якого можна змінювати, то при строго визначеному значенні частоти ядра поглинають енергію $\Delta E = E_2 - E_1$ і переходять з нижчого на вищий рівень. Умови резонансу:

$$E_2 - E_1 = h\nu = \mu H_0 / I \text{ або } \nu = \mu H_0 / hI; \text{ для протонів } \nu = 2\mu H_0 / h$$

μ - магнітний момент ядра; H_0 - напруженість зовнішнього магнітного поля; h - стала Планка, I - значення спінового квантового числа.

Отже, для спостереження резонансу ядер речовину поміщують в сильне і однорідне магнітне поле з напруженістю H_0 і прикладають до нього змінне магнітне поле визначеної частоти, яке створюється генератором. За робочою частотою генератора прийнято характеризувати спектрометри ПМР: 60, 80, 90, 100, 200, 250, 300, 360, 400, 500 мегагерц (Мгц). Робоча схема спектрометру ЯМР приведена на (рис. 7).

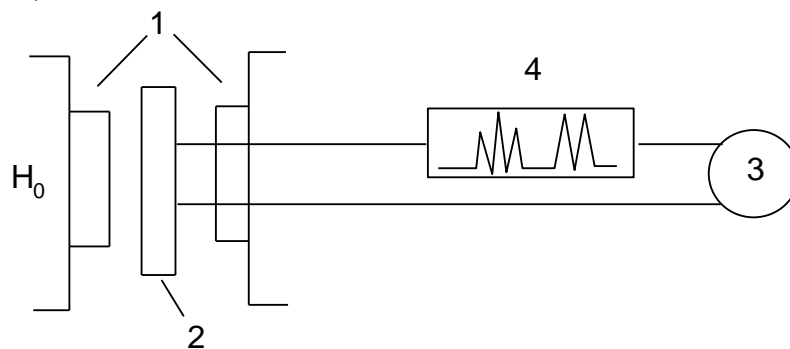


Рис. 7. Блок-схема спектрометру ЯМР.

Потужний магніт створює однорідне магнітне поле напруженістю H_0 (1); між полюсами магніту в середині катушки генератора змінного радіовипромінювання (3) поміщують ампулу з речовиною (2); катушка сполучена з реєструючим пристроєм (4), яке записує графічну залежність інтенсивності поглинання від напруженості поля або частоти - спектр ЯМР. У спектрі ЯМР інформація міститься у зашифрованому вигляді, цю інформацію необхідно на основі аналізу спектру виразити у вигляді наступних параметрів:

- значення хімічних зсувів сигналів,
- інтеграл спектру,
- значення констант спин-спінової взаємодії.

Хімічний зсув

Основне рівняння спектроскопії ЯМР приводить до припущення, що положення сигналу в спектрі залежить лише від величини магнітного моменту ядра (μ), тобто різниця пов'язана тільки з типом ядра. Але це не відповідає дійсності, частота резонансу залежить від електронного оточення ядер одного типу, наприклад ядер водню в молекулі. В загальному вигляді константа магнітного екранування ядра (σ) включає кілька складових:

$$\sigma = \sigma_A + \sigma_M + \sigma'$$

σ_A - атомний внесок в екранування (вплив електронегативності сусідніх груп),

σ_M - молекулярний внесок (вплив токів молекули в цілому),

σ' - міжмолекулярний внесок (вплив зовнішніх факторів - концентрації розчину, температури, характеру розчину та ін.).

Внесок σ_A (локальне діаманітне екранування) пов'язаний з тим, що оточуючі ядро електрони під впливом прикладеного магнітного поля (H_0) індуціюють власні магнітні поля, які направлені проти зовнішнього поля H_0 і зменшують його. Тому на ядро діє не поле H_0 , а трохи менше поле:

$$H_{\text{еф.}} = H_0 - \sigma H_0 = H_0(1 - \sigma)$$

Тому для ядер з різним електронним оточенням положення сигналу буде різним. Зміщення сигналу під впливом різного електронного оточення називається хімічним зсувом. Хімічний зсув виражають по відношенню до загальноприйнятого стандарту - тетраметилсилану (ТМС) за наступними причинами:

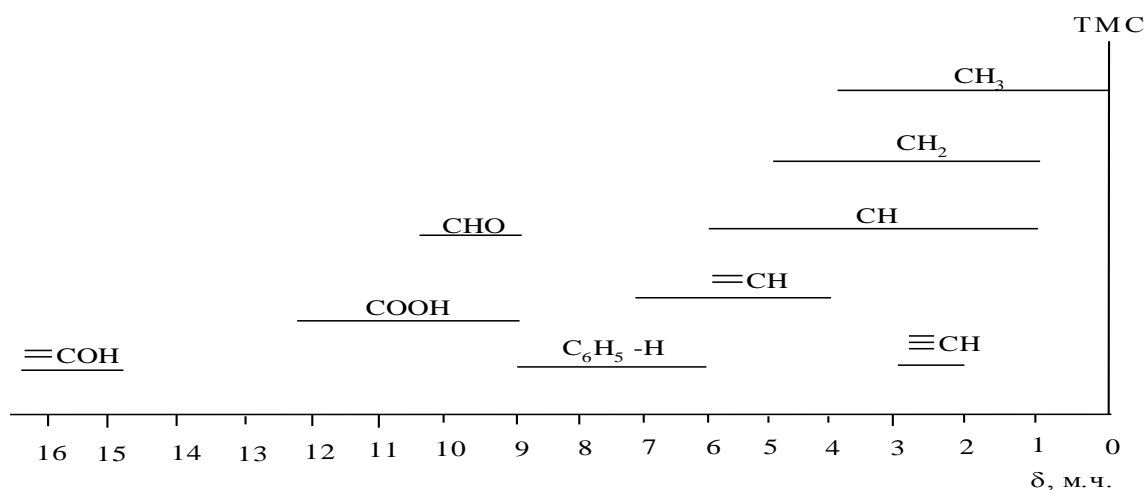
- ТМС дає одиничний вузький сигнал в області поля, де не резонують другі протони;
- ТМС інертний;
- він має високий вміст протонів;
- має низьку температуру кипіння і легко відділяється від речовини після вимірювання спектру.

Крім нього також використовується гексаметилдисилоксин (ГМДС), сигнал якого майже співпадає з сигналом ТМС в спектрі ЯМР.

Хімічний зсув може бути виміряний в герцах, але при цьому його значення залежить від робочої частоти генератору електромагнітних коливань. Звичайно хімічний зсув визначається в мільйонних частках (м. ч.); при цьому хімічний зсув ТМС дорівнює нулю. В шкалі τ хімічний зсув ТМС дорівнює 10

$$\tau = 10 - \delta; \delta = 10 - \tau$$

Приблизна шкала хімічних зсувів ядер ^1H має наступний вигляд:



В табл. 6 наведені хімічні зсуви протонів різних типів.

Таблица 6

Хімічні зсуви протонів різних типів

Метильна група	δ, м. ч.	Метиленова група	δ, м. ч.
CH ₃ -C	0.8-1.9	CH ₂ - тричленний цикл	0.3-0.9
CH ₃ -C=	1.6-2.7	CH ₂ інші цикли	1.2-1.5
CH ₃ -C≡	1.8-2.1	-CH ₂ -	1.2-1.4
CH ₃ -S	2.0-2.6	-CH ₂ -Hal (крім F)	1.3-1.9
CH ₃ -Ar	2.1-2.8	-CH ₂ -CO	2.1-2.4
CH ₃ -N	2.7-3.1	-CH ₂ -N	2.1-2.8
CH ₃ -O	3.2-4.0	-CH ₂ -Ar	2.6-3.0
		-CH ₂ -O	3.4-4.4
		CH ₂ =C- (несупрядж.)	4.6-5.0
		CH ₂ =C- (супрядж.)	5.3-5.7
Метиний протон	δ, м. ч.	Протони при гетероатомах	δ, м. ч.
-CH-	1.4-1.9	R-OH	1.0-4.5
-CH-CO	2.4-2.7	Ar-OH	4.3-8.0
CH-C-	2.4-3.1	єноли	15-19
-CH-Ar	2.8-3.1	R-SH	1.2-2.1
-CH-S	3.1-3.2	Ar-SH	3.0-3.6
-CH-O	3.8-5.1	R-NH- (аміни)	0.5-3.3
-CH-Hal	4.0-4.2	Ar-NH-	2.9-4.7
-CH= (несупрядж.)	5.2-5.7	-NH- (аміди)	5.4-8.1
-CH= (супрядж.)	5.7-6.7	RN ⁺ H ₃	7.7-8.1
-CH= (аромат.)	6.1-9.3	R-COOH	9.2-13.2
-CH=O	9.3-10.1		
-CH- містковий	2.1-2.5		

Найпростіші оцінки хімічних зсувів можна здійснити з використанням адитивних схем. Для аліфатичних сполук це схема Приміса, Арнута, Ернста і Бомера, схема Шулері. Для похідних циклогексана - емпіричне рівняння Ілієла, для ароматичних сполук - адитивна схема Мартіна і Дейлі та ін. В основі всіх

схем полягає встановлення реляції хімічного зсуву з електронегативністю замісника при найближчому атомі вуглецю.

Другий внесок у константу екранування (σ_M) проявляється в основному при дії магнітних полів за рахунок віддалених молекулярних фрагментів. Найбільш яскравий приклад пов'язаний з електронами π -зв'язків бензольного кільця. Магнітне поле, яке при цьому виникає, є анізотропним. У середині кільця його напрямок протилежний зовнішньому магнітному полю H_0 . За межами кільця силові лінії виникаючого поля напрямлені згідно із зовнішнім полем, що призводить до деекранування протонів кільця і високих значень хімічного зсуву (7-9 м.ч.). Конус анізотропії дає наявне уявлення про те, в яких ділянках простору здійснюється зсув сигналів у сильне та слабе поле – у площині кільця лежить область деекранування, вище та нижче цієї площини знаходяться області екранування. Взагалі ці зсуви ($\Delta\delta$) залежать від відстані та орієнтації протонів відносно системи зв'язків, які індуюють магнітне поле. Для оцінки значення $\Delta\delta$ використовують рівняння Мак-Конела:

$$\Delta\delta = (\Delta X \cdot 10^6 / 3R^3) \cdot (\cos^2\theta - 1)$$

$\Delta\delta$ - внесок у хімічний зсув; ΔX - різниця діамагнітних сприймань зв'язків у двох напрямках простору; R - довжина вектору, що сполучає центр зв'язку з протоном; θ - кут між віссю зв'язку та вектором R .

Зовнішні дії на хімічний зсув, які визначають величину третьої складової в константу магнітного екранування ($\Delta\sigma'$), включають в себе вплив температури, концентрації розчину, характеру розчинника, використання хіральных розчинників та парамагнітних комплексів європію та празеодіму - зсуваючих реагентів (ЗР).

Варіювання температури та концентрації забезпечує ідентифікацію сигналів протонів при гетероатомах (OH, NH, SH), оскільки резонанс тільки цієї групи протонів значно залежить від ступеню асоціації та помітно змінюється при порушенні структури водневих зв'язків.

Значення хімізсувів у неполярних розчинниках (CCl_4 , CS_2 , $CHCl_3$, циклогексані, гексані), ароматичних (бензолі, піридині, толуолі) та полярних (CH_3NO_2 , CH_3CN , CF_3COOH , $(CH_3)_2CO$, діоксані та ін.) відрізняються один від іншого, і ця різниця інформативна. Зсув за рахунок розчинника дозволяє одержати дані про структуру сполуки. Ароматичні розчинники утворюють комплекси з полярними молекулами, які при усередненні в часі мають визначену просторову орієнтацію фрагментів. В цьому випадку ароматичні молекули спричиняють різний вплив на резонанс деяких протонів речовини, що вивчають, і зсув, який індуює ароматичний розчинник (ЗІАР), перетворюється в інструмент для встановлення структури органічних сполук.

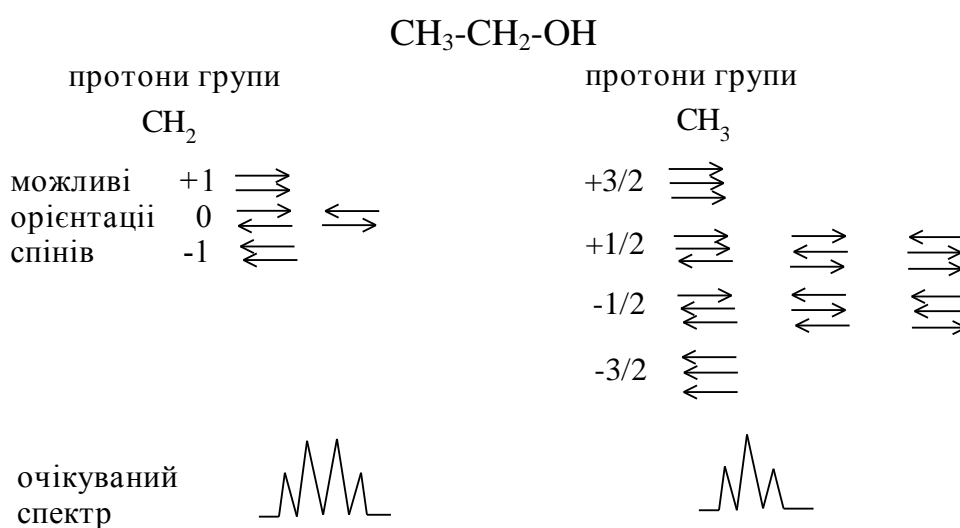
Інтегрування сигналів спектру

Площі сигналів у спектрі ЯМР завжди пропорційні кількості резонуючих протонів (ядер). Вона вимірюється електронним інтегралом і проводиться на спектрі у вигляді складчастої кривої, висота східця якої пропорційна площі сигналу та кількості протонів. Число сигналів у спектрі свідчить про те, скільки різновидів протонів є в молекулі. Положення сигналів дозволяє визначити, якого типу є протони: ароматичні, аліфатичні, вінільні або альдегідні. Інтегральна крива

допомагає встановити кількість резонуючих ядер, відповідаючих кожному сигналу.

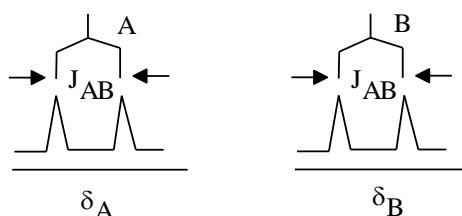
Спін-спінова взаємодія

Хімічний зсув відноситься до тонкої структури спектрів ЯМР високої розрізняювальної здатності. Надтонка (мультиплетна) структура спектру залежить від спін-спінової взаємодії, в якій проявляється вплив сусідніх нееквівалентних магнітних ядер. Два протона метиленової групи молекули етанолу можуть мати одну з чотирьох можливих комбінацій значень їх магнітних квантових чисел; наприклад, обидва магнітних квантових числа (m) можуть бути однакові чи мати знак $+$ або $-$, вони можуть бути різними (два можливих стана) і компенсувати один одного. При цьому для протонів метильної групи повинні спостерігатися три резонансних лінії, які обумовлені взаємодією з протонами метиленової групи.



Якщо використати аналогічні міркування для дослідження резонансного поглинання протонів метилу (CH_3) в присутності протонів метилу, ми можемо передбачувати появу в спектрі чотирьох ліній з відносною інтенсивністю 1:3:3:1.

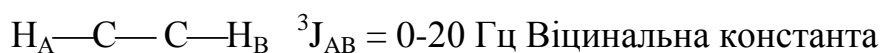
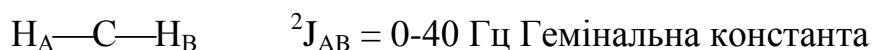
В групі $-\text{C}(\text{H}_\text{A})-\text{C}(\text{H}_\text{B})-$ сигнали двох нееквівалентних протонів H_A і H_B розщеплюються в дублети однакової інтенсивності. Відстань між компонентами дублетів в герцах (J_{AB}) називають константою спін-спінової взаємодії (КССВ):



При роботі із спектрами слід знати деякі властивості КССВ:

1. КССВ вимірюється в герцах та на відміну від хімічного зсуву не залежить від робочої частоти прибору.
2. КССВ ядер з однаковим хімічним зсувом не спостерігається безпосередньо, але може бути розрахована.

3. Абсолютна величина КССВ, в принципі, тим менша, чим більше число зв'язків між взаємодіючими ядрами:



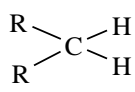
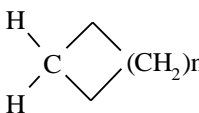

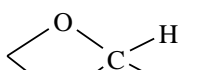
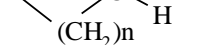
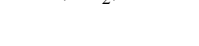
$\text{H}_A-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H}_B \quad {}^4J_{AB} = 0-4 \text{ Гц}$ Виміряні тільки при наявності кратних зв'язків в ланцюгу.

4. Величина КССВ залежить від геометрії молекули та електронного оточення.

Типові значення ${}^2J_{\text{HH}}$ та ${}^3J_{\text{HH}}$ приведені у табл. 7.

Таблиця 7

Значення ${}^2J_{\text{HH}}$ та ${}^3J_{\text{HH}}$ деяких структурних фрагментах

${}^2J_{\text{HH}}$		${}^3J_{\text{HH}}$		
Фрагмент	Інтервал, Гц	Фрагмент		Інтервал, Гц
	10-15	H-C-C-H	вільне обертання навколо зв'язку C-C	6-9
 n=0	4-9	H-C=C-H	цис	6-12
 n=1	11-16		транс	10-19
 n=0	4-6	=CH-CH=X	X=C	9-13
 n=1	6-7		X=O	6-8
 n>2	9-13			

Існують загальні правила оцінки мультиплетності сигналів:

1. Розщеплення має місце тільки на нееквівалентних протонах сусідніх груп.
2. При розщепленні на n протонах кількість ліній мультиплету складає n+1, тобто при розщепленні на сусідній метиновій групі одержим дублет, метиленовій - триплет, метильній - кватрет ліній.

3. Інтенсивність ліній мультиплетів відповідає біноміальним коефіцієнтам в розв'язку біному Ньютона $(a + b)^n$

$n=1$, дублет, інтенсивність ліній 1:1

$n=2$, триплет 1:2:1

$n=3$, квадруплет 1:3:3:1 і т.д.

4. Якщо є n і n' не взаємодіючих між собою протонів і обидві ці групи взаємодіють з третьою групою, ця взаємодія є незалежною. Спочатку сигнал групи розщеплюється на $n+1$ лінію, потім кожна з них - на $n'+1$ компоненту.

5. Якщо магнітні ядра молекули можна розділити на декілька угруповань, між якими відсутня спін-спінова взаємодія, спектр всієї молекули можна представити як результат накладання спектрів окремих угруповань.

6. Якщо зразок містить суміш речовин, які не взаємодіють хімічно, його спектр є результатом накладання спектрів окремих сполук.

Додаток

Дані ІЧ-, УФ- та ПМР-спектрів для найважливіших структурних елементів органічних сполук.

ІЧ		УФ		ПМР	
Характеристичні смуги, см^{-1}		Інші смуги, см^{-1}		$\lambda_{\text{макс}}$, нм (lgε)	Хімічний зсув (Δ), м.д.
3640-3650 пер.	O-H	1050 с., 1100 с., 1150 с., 1200 с., 1250 д.с.	перв.-ОН втор.-ОН трет.-ОН феноли COOH	Спирти : немає поглинання ArOH: ароматичне поглинання	RO-H 0.5 5.5 (H- зв'язки) ArO-H 4.5 7.0 (H- зв'язки) COO-H 9.5-13
3500-3400 сер. 3400-3300 сер.	RN-H ₂ RCON-H ₂ R ₂ N-H RCONR-H	1690-1560 с.		RNH ₂ : немає поглинання вище 200 ArNH ₂ : ароматичное поглинання	N-H унаслідок квадрупольної взаємодії широкий пік майже непомітний CH-N 2.0 – 3.8
3300 с. 3080 сер. 2975 сер. }	≡C-H -CH=CH ₂	2100-2250 с. 700-600 с. 1645 с. 990 с. 910 с. 1655 сер. 890 с. 1670 сл. 840-800 сер. 1670 сер.		< 250	≡C-H 2.0 – 3.2 $J_{\text{CH-C}\equiv\text{C-H}} = 2-3$ Гц 4.5-7.5 (3 сигнали) $J_{\text{цис}} = 6-14$ Гц $J_{\text{транс}} = 11-18$ Гц 5.3 – 6.3 (2 сигнали) $J_{1,1} = 0 – 3.5$ Гц 5 – 6 (1 сигнал) 4.5 – 7.5 (2 сигнали) $J_{1,2} = 6-14$ Гц

3080 сер.	$\diagup\text{C}=\text{CH}_2$	1670 сл. 960 с.			5.8 – 7.1 (2 сигнали) $J_{1,2} = 11-18$ Гц
3030 сер.	$-\text{C}=\text{C}-\text{H}$ 	1620 пер. 1520 пер. 1500 пер. 770-730 с.	205-206 (4) 260-300 (≈ 3)	$=\underset{ }{\text{C}}-\text{H}$	6.5 – 8,5 $J_{орто} = 7-10$ Гц $J_{мета} = 2-3$ Гц $J_{пара} = 1$ Гц
3030 сер.	$\text{H}\diagdown\text{C}=\text{C}\diagup$ 	710-690 с. } монозаміщені			
3030 сер.	$\text{H}\diagdown\text{C}=\text{C}\diagup$ 	770-735 } 1,2-дизаміщені			
	$\text{H}\diagdown\text{C}=\text{C}\diagup$ 	810-750 } 1,3-дизаміщені			
	$\text{H}\diagdown\text{C}=\text{C}\diagup$ 	860-800 } 1,4-дизаміщені		$\text{Ar}-\underset{ }{\text{C}}-\text{H}$	2.2-2.8
3100–3000 сер. (звичайно 3 смуги) нах)	$=\underset{ }{\text{C}}-\text{H}$ (в аре-	900-860 } 1,2,3,4,5- пента- заміщені			
2960-2850 сер.	$-\text{CH}_3$ $-\text{CH}_2-$ $-\underset{ }{\text{C}}\text{H}-$	1380 с.	$-\text{CH}_3$	Алкани: немає поглинання вище 210	$-\text{CH}_3$ $-\underset{ }{\text{C}}\text{H}-$ $-\text{CH}_2-$ } 0.5-4.3 $J_{\text{CH}-\text{CH}} = 6-7$ Гц
2850-2800 сер. 2820 с., сер.	$-\text{OCH}_3$ NCH_3	1150-1070 с.			$\text{O}-\underset{ }{\text{C}}-\text{H}$ 3.2-4.0 $\text{N}-\underset{ }{\text{C}}-\text{H}$ 2.1-3.1
3000-2000 шир.					
2900-2400 сер.	$\text{O}-\text{D}$ $\text{N}-\text{D}$		250 (2.5)	$\text{S}-\text{H}$	1-2

2600-2500 сл.	-S-H					
2943 сер.	CO ₂					$\begin{array}{c} \\ \text{S}-\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$ <p style="text-align: right;">2-3</p>
2260-210 с. 2260 сер. 2260-2210 пер. 2270-2000 с.	-C≡C- -N ⁺ ≡N -C≡N -N=C=O -N=C=N-, -N ₃			210 260-400 (4-5) < 200		$\begin{array}{c} \\ -\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$ <p style="text-align: right;">2-3</p> $\begin{array}{c} \\ \text{N}=\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$ <p style="text-align: right;">2 - -2.5</p> $\begin{array}{c} \\ \text{N}=\text{C}-\text{S}-\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$ <p style="text-align: right;">2.5-3</p>
2100 сер.	-S-C≡N -N=C=S -C-D					
1800 д.с. 1760 д.с. } 1800 д.с. 1770 д.с. 1760 д.с.	R-CO-O-CO-R R-CO-Hal γ-лактон -CO-O-Ar	1300-1100 д.с. Ароматичні смуги	2 смуги	210	Ароматичне поглинання	$\begin{array}{c} \\ \text{ROOC}-\text{C}-\text{H} \\ \end{array}$ <p style="text-align: right;">2-2.6 Аромат. сигнали</p>
1760 д.с.	-CO-O-C=C-					Олефінові сигнали
1760 д.с.	-COOH (моно)	3550 пер. 920 шир.		210		$-\text{COO}-\text{H}$ <p style="text-align: right;">9,5-13</p>
1710 д.с.	-COOH (ди)	920 шир.				
1750-1720	-COOR	1160-1250 д.с.	2 смуги	270-300 (1)		

1720 д.с.	Альдегіди	2820 сер. 2720 сер		270-300 (1)	$\text{HOOC}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}$	2.0-2.6
1715 д.с.	Кетони (аліциклічні та 6-7-членні)			270-300 (1)	$\text{O}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}$ $\text{H}-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}$	2.0-2.5 6.5-7.2
1690-1650 д.с.	$-\text{CONR}_2, -\text{CONHR}$ $-\text{CONH}_2$	3500-3300	$-\text{CON}-\text{H}$ (см. N-H)	< 210 < 230 (3-4)	$\text{O}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$ $\text{O}=\text{CH}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$ $\text{O}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$	9.4-10.0 2.0-2.6 2.0-2.6
1675-1530 с.	$\text{>C}=\text{C}<$	3100-300	- “ -	210	$\text{O}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}-\text{H}$	сл., шир.
1650 д.с.	$-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}=\text{O}$ OH $-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}=\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}=\text{O}$ NH ₂	700-950	- “ -		$\text{H}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{CON}<$ $-\text{CO}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}}-\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$	2.0-2.6 3.0-3.8
1610-1550 с. -COO ⁻		1615 $\text{>C}=\text{O}$ 2500-2700	зовнішньомолекулярні Н-зв'язки Н-зв'язки		$\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}<$	7.0-13.0
1600-1500 с.		1420		280 (1)		
1420-1330 с.	R-SO ₂ OR	1440-1300 с. 1200-1140		230 (3-4)		

1370-1330 с.	$-\text{SO}_2\text{N}<$		230		$\text{O}_2\text{N}-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$ 4.2-4.5 $-\text{O}_2\text{S}-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$ 2,5-3,5
800-500 с.	$-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{Cl}, -\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{Br}$		250	R-I, R-Br	$\text{Hal}-\overset{ }{\underset{ }{\text{C}}}-\text{H}$ 2.6-3.1

д.с. – дуже сильна; с. – сильна; сер. – середня; сл. – слабка; пер. – перемінна інтенсивність сигналу. Шир. – широка смуга.

Список літератури

- 1 Прикладна спектроскопія: Навчальний посібник / Капустяник В. Б., Мокрий В. І. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. – 302 с.
- 2 Д.Браун, А.Флойд, М.Сейнзбери. Спектроскопия органических веществ. – Москва, Мир, 1992
- 3 А.А. Полякова. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. // -М.: Химия, 1983. - 248 С.
- 4 Ю.С. Ходеев. Современный уровень и тенденции развития масс-спектрометрии для научных исследований. // -М.: ЦНИИТЭИ, 1980. - 31 С.
- 5 П.Б. Терентьев. Масс-спектроскопия в органической химии. // -М.: Высш. шк., 1979. - 223 С.
- 6 В.И. Хвостенко. Масс-спектрометрия отрицательных ионов в органической химии. // -М.: Наука, 1981. - 158 С.
- 7 Р. Джонстон. Руководство по масс-спектрологии для химиков-органиков. // - М.: Мир, 1975. - 235 С.
- 8 А.А. Полякова, Р.А. Хмельницкий. Масс-спектрометрия в органической химии. // -Л.: Химия, 1972. - 365 С.
- 9 Д. Бейнон. Масс-спектрометрия и ее применение в органической химии. // -М.: Мир, 1966. - 701 С.
- 10 П. Будзикевич, Д. Джирасси, Д. Уильямс. Интерпретация масс-спектров органических соединений. // -М.: Мир, 1966. - 320 С.
- 11 Р. Райд Курс физической органической химии // -М.: Мир, 1972. - 242 С.
- 12 Д. Сильверстейн, Г. Басслер, Т. Моррил. Спектрометрическая идентификация органических соединений. // М.: Мир, 1977. - 591 С.
- 13 Л.А. Казичина, Н.Б. Куплетская. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектрологии в органической химии. // -М.: Изд-во МГУ, 1979. - 240 С.
- 14 Б.В. Иоффе, Р.Р. Костиков, В.В. Разин. Физические методы определения строения органических молекул. // -Л.: Изд-во ЛГУ, 1978. - 344 С.
- 15 О.В. Свердлова. Электронные спектры в органической химии. // -Л.: Химия, 1973. - 248 С.
- 16 Э. Штерн, К. Тиммонс. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии. // -М.: Мир, 1974. - 295 С.
- 17 Л. Беллами. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. // -М.: Мир, 1971. - 318 С.
18. К. Наканиси. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. // -М.: Мир, 1965. - 210 С.
19. Т.Я. Паперно, В.П. Поздняков и др. Физико-химические методы исследования в органической и биологической химии. // -М.: Просвещение, 1977. - 155 С.
- 20 Л.М. Свердлова, М.А. Ковнер, Е.П. Крайнов. Колебательные спектры многоатомных молекул. // -М.: Наука, 1970. - 559 С.
21. Б.Т. Ионин, Б.А. Ершов. ЯМР-спектроскопия в органической химии. // - Л.: Химия, 1967. - 328 С.
22. Х. Гюнтер. Введение в курс спектроскопии ЯМР. // -М.: Мир, 1984. - 478 С.
- 23 Ядерный магнитный резонанс. // -Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. - 344 С.

Навчальне видання

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ХІМІЧНИХ СПОЛУК

Скорочений конспект лекцій для студентів
спеціальності «Хімія»

Укладач

ЮСІНА Ганна Леонідівна

За авторською редакцією

/2020. Формат 60 x 84/16. Ум. друк. арк. .
Обл.-вид. арк. . Тираж пр. Зам. №

Видавець і виготівник
Донбаська державна машинобудівна академія
84313, м. Краматорськ, вул. Шкадінова, 72.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК №1633 від 24.12.2003